



(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)



1-0042073

(51)⁷ C12N 15/82; A01H 5/00; A01N 63/00

(13) B

(21) 1-2013-01819

(22) 15/12/2011

(86) PCT/IB2011/055701 15/12/2011

(87) WO/2012/080975 21/06/2012

(30) 61/423604 16/12/2010 US

(45) 25/12/2024 441

(43) 27/01/2014 310A

(73) BASF Agro B.V. (NL)

Velperplein 23, 6811 AH Arnhem, Netherlands

(72) HUTZLER, Johannes (DE); APONTE, Raphael (CA); MIETZNER, Thomas (DE);

WITSCHER, MATTHIAS (DE); SIMON, Anja (DE); LERCHL, Jens (DE);

TRESCH, Stefan (DE); MANKIN, S. Luke (US).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) PHƯƠNG PHÁP TĂNG CƯỜNG SỰ SINH TRƯỞNG CỦA CÂY TRỒNG BẰNG CÁCH KIỂM SOÁT THỰC VẬT KHÔNG MONG MUỐN, VÀ CÂY CHUYỂN GEN CÓ KHẢ NĂNG CHỊU ĐƯỢC THUỐC DIỆT CỎ TĂNG

(57) Sáng chế đề xuất phương pháp phòng trừ thực vật không mong muốn tại vị trí cạnh tác cây, phương pháp này bao gồm các bước cung cấp, tại vị trí này, cây mà chứa ít nhất một axit nucleic chứa trình tự nucleotit mã hóa cho protoporphyrinogen oxidaza (PPO) kiểu đại hoặc đột biến mà kháng hoặc chịu được thuốc diệt cỏ chứa dẫn xuất benzoxazinon bằng cách cấp cho vị trí này lượng hữu hiệu của thuốc diệt cỏ này. Sáng chế còn đề cập đến cây chứa enzym PPO kiểu đại hoặc đột biến, và phương pháp tạo ra cây này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Nói chung, sáng chế đề cập đến phương pháp mang lại cho cây tính dung chịu ở cấp độ nông nghiệp đối với thuốc diệt cỏ. Cụ thể, sáng chế đề xuất cây có tính dung chịu tăng đối với thuốc diệt cỏ chứa “dẫn xuất benzoxazinon”. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến phương pháp và cây thu được bằng cách gây đột biến và lai chéo và biến nạp mà có tính dung chịu tăng đối với thuốc diệt cỏ chứa “dẫn xuất benzoxazinon”.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các thuốc diệt cỏ mà ức chế protoporphyrinogen oxidaza (sau đây được gọi là Protox hoặc PPO; EC:1.3.3.4), là enzym chủ chốt trong quá trình sinh tổng hợp protoporphyrin IX, được sử dụng để kiểm soát cỏ dại chọn lọc từ những năm 1960. PPO xúc tác cho bước phổ biến chung cuối cùng trong quá trình sinh tổng hợp chất diệp lục và hem, là sự oxy hóa protoporphyrinogen IX thành protoporphyrin IX. (Matringe et al. 1989. Biochem. 1. 260: 231). Các thuốc diệt cỏ ức chế PPO bao gồm nhiều lớp phân tử có cấu trúc khác nhau (Duke et al. 1991. Weed Sci. 39: 465; Nandihalli et al. 1992. Pesticide Biochem. Physiol. 43: 193; Matringe et al. 1989. FEBS Lett. 245: 35; Yanase and Andoh. 1989. Pesticide Biochem. Physiol. 35: 70). Các hợp chất diệt cỏ này bao gồm diphenylete {ví dụ lactofen, (+)-2-etoxy-1-metyl-2-oxoetyl 5-{2-clo-4-(triflometyl)phenoxy}-2-nitrobenzoat; axiflofen, axit 5-{2-clo-4-(triflometyl)phenoxy}-2-nitrobenzoic; metyl este của nó; hoặc oxyflofen, 2-clo-1-(3-etoxy-4-nitrophenoxy)-4-(triflobenzen)}, oxidiazol, (ví dụ oxidiazon, 3-{2,4-diclo-5-(1-metyloxy)phenyl}-5-(1,1-dimetyletyl)-1,3,4-oxadiazol-2-(3H)-on), imit vòng (ví dụ S-23142, N-(4-clo-2-flo-5-propargyloxyphenyl)-3,4,5,6-tetrahydrophtalimit; clorophtalim, N-(4-clophenyl)-3,4,5,6-tetrahydrophtalimit), phenyl pyrazol (ví dụ TNPP-etyl, etyl 2-{1-(2,3,4-triclophenyl)-4-nitropyrazolyl-5-oxy}propionat; M&B 39279), dẫn xuất pyridin (ví dụ LS 82-556), và phenopylat và thể tương tự O-phenylpyrolidino- và piperidinocacbammat của nó. Nhiều hợp chất trong số các hợp chất này ức chế theo cách cạnh tranh phản ứng thông thường được xúc tác bởi enzym, rõ ràng là hoạt động dưới dạng thể tương tự cơ chất.

Việc sử dụng các thuốc diệt cỏ ức chế PPO gây ra sự tích lũy protoporphyrinogen

IX trong lục lạp và ty thể, mà được cho là rò rỉ vào phần bào tan, nơi mà nó được oxy hóa bởi peroxidaza. Khi được phơi nhiễm với ánh sáng, protoporphyrin IX gây ra sự tạo thành của oxy đơn trong phần bào tan và sự tạo thành của các gốc oxy có tính phản ứng khác, mà có thể gây ra sự peroxy hóa lipid và phá vỡ màng, làm chết tế bào nhanh chóng (Lee et al. 1993. *Plant Physiol.* 102: 881).

Không phải tất cả các enzym PPO đều miễn cảm với các thuốc diệt cỏ mà ức chế các enzym PPO thực vật. Các enzym PPO của cả *Escherichia coli* và *Bacillus subtilis* (Sasarmen et al. 1993. *Can. J. Microbiol.* 39: 1155; Dailey et al. 1994. *J. Biol. Chem.* 269: 813) đều có tính kháng đối với các chất ức chế diệt cỏ này. Các thể đột biến của tảo đơn bào *Chlamydomonas reinhardtii* mà có tính kháng đối với thuốc diệt cỏ chứa phenylimit S-23142 đã được báo cáo (Kataoka et al. 1990. *J. Pesticide Sci.* 15: 449; Shibata et al. 1992. In *Research in Photosynthesis*, Vol. III, N. Murata, ed. Kluwer:Netherlands. pp. 567-70). Ít nhất một trong số các thể đột biến này có vẻ như có hoạt tính PPO được làm thay đổi mà có tính kháng không chỉ chất ức chế diệt cỏ mà thể đột biến này được chọn lọc trên đó, mà còn kháng các lớp chất ức chế protox khác (Oshio et al. 1993. *Z. Naturforsch.* 48c: 339; Sato et al. 1994. In *ACS Symposium on Porphyrin Pesticides*, S. Duke, ed. ACS Press: Washington, D.C.). Dòng tế bào thuốc lá đột biến cũng đã được báo cáo là có tính kháng đối với chất ức chế S-21432 (Che et al. 1993. *Z. Naturforsch.* 48c: 350). Các thể đột biến *E. coli* dinh dưỡng thụ động được sử dụng để xác nhận tính kháng thuốc diệt cỏ của các PPO thực vật đã được tách dòng.

Có ba chiến lược chính để tạo ra cây mà dung chịu đối với thuốc diệt cỏ, tức là (1) giải độc thuốc diệt cỏ bằng enzym mà chuyển hóa thuốc diệt cỏ này, hoặc chất chuyển hóa hoạt tính của nó, thành các sản phẩm không độc, như, ví dụ, các enzym để dung chịu đối với bromoxynil hoặc đối với basta (EP242236, EP337899); (2) gây đột biến enzym đích thành enzym chức năng mà ít miễn cảm hơn với thuốc diệt cỏ, hoặc với chất chuyển hóa hoạt tính của nó, như, ví dụ, các enzym để dung chịu đối với glyphosat (EP293356, Padgett S. R. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 266, 33, 1991); hoặc (3) biểu hiện quá mức enzym miễn cảm sao cho tạo ra lượng enzym đích ở cây mà đủ so với thuốc diệt cỏ, xét về các hệ số động lực của enzym này, sao cho có sẵn đủ enzym chức năng bất chấp sự có mặt của chất ức chế của nó. Chiến lược thứ ba được mô tả để thu nhận thành công cây có tính dung chịu đối với các chất ức chế PPO (xem ví dụ

US5,767,373 hoặc US5,939,602, và các đơn thuộc họ patent của chúng). Ngoài ra, US 2010/0100988 và WO 2007/024739 bộc lộ trình tự nucleotit mã hóa cho trình tự axit amin có hoạt tính enzym sao cho trình tự axit amin này có tính kháng đối với các hóa chất diệt cỏ ức chế PPO, đặc biệt là các thể đột biến PPO đặc hiệu chất ức chế 3-phenyluraxil.

Đến nay, tình trạng kỹ thuật của lĩnh vực này chưa mô tả cây dung chịu thuốc diệt cỏ chứa dẫn xuất benzoxazinon mà chứa ít nhất một axit nucleic PPO kiểu đại hoặc được gây đột biến. Tình trạng kỹ thuật của lĩnh vực này cũng chưa mô tả cây thời vụ dung chịu thuốc diệt cỏ chứa dẫn xuất benzoxazinon mà chứa các đột biến trên các hệ gen mà không phải là hệ gen mà gen PPO có nguồn gốc từ đó. Do đó, việc cần thiết trong lĩnh vực này là việc nhận diện các gen dung chịu thuốc diệt cỏ chứa dẫn xuất benzoxazinon từ các loài và hệ gen bổ sung. Cũng cần thiết trong lĩnh vực này là cây thời vụ và cây thời vụ có tính dung chịu tăng đối với thuốc diệt cỏ như thuốc diệt cỏ chứa dẫn xuất benzoxazinon và chứa ít nhất một axit nucleic PPO kiểu đại và/hoặc được gây đột biến. Cũng cần thiết là phương pháp kiểm soát sự sinh trưởng của cỏ dại trong vùng lân cận của cây thời vụ hoặc cây thời vụ này. Các thành phần và phương pháp này sẽ cho phép sử dụng kỹ thuật phun trong số các kỹ thuật khi cấp thuốc diệt cỏ cho các vùng chừcây thời vụ hoặc cây thời vụ.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề này được giải quyết bởi sáng chế, đề cập đến phương pháp phòng trừ thực vật không mong muốn tại vị trí canh tác cây, phương pháp này bao gồm các bước:

- a) cung cấp, tại vị trí này, cây mà chứa ít nhất một axit nucleic chứa trình tự nucleotit mã hóa cho protoporphyrinogen oxidaza kiểu đại (PPO) hoặc protoporphyrinogen oxidaza đã được gây đột biến (mut-PPO) mà kháng hoặc dung chịu đối với thuốc diệt cỏ chứa dẫn xuất benzoxazinon,
- b) cấp cho vị trí này lượng hữu hiệu của thuốc diệt cỏ này.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất phương pháp nhận diện thuốc diệt cỏ chứa dẫn xuất benzoxazinon bằng cách sử dụng PPO kiểu đại hoặc mut-PPO được mã hóa bởi axit nucleic mà chứa trình tự nucleotit thuộc SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19,

21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, hoặc 45, hoặc biến thể của nó.

Phương pháp này bao gồm các bước:

- a) tạo ra cây hoặc tế bào chuyển gen chứa axit nucleic mã hóa cho mut-PPO, trong đó mut-PPO được biểu hiện;
- b) cấp thuốc diệt cỏ chứa dẫn xuất benzoxazinon cho cây hoặc tế bào chuyển gen nêu trong a) và cho cây hoặc tế bào đối chứng thuộc cùng một giống;
- c) xác định sự sinh trưởng hoặc khả năng sống sót của cây hoặc tế bào chuyển gen và cây hoặc tế bào đối chứng sau khi cấp hợp chất thử nghiệm này, và
- d) chọn lọc hợp chất thử nghiệm mà mang lại sự sinh trưởng giảm cho cây hoặc tế bào đối chứng so với sự sinh trưởng của cây hoặc tế bào chuyển gen.

Mục đích khác là đề xuất phương pháp nhận diện trình tự nucleotit mã hóa cho mut-PPO mà kháng hoặc dung chịu đối với thuốc diệt cỏ chứa dẫn xuất benzoxazinon, phương pháp này bao gồm các bước:

- a) tạo ra thư viện của các axit nucleic mã hóa cho mut-PPO,
- b) sàng lọc tập hợp các axit nucleic mã hóa cho mut-PPO tạo thành bằng cách biểu hiện mỗi trong số các axit nucleic này ở tế bào hoặc cây và xử lý tế bào hoặc cây này bằng thuốc diệt cỏ chứa dẫn xuất benzoxazinon,
- c) so sánh mức độ dung chịu thuốc diệt cỏ chứa dẫn xuất benzoxazinon được tạo ra bởi tập hợp các axit nucleic mã hóa cho PPO này với mức độ dung chịu thuốc diệt cỏ chứa dẫn xuất benzoxazinon được tạo ra bởi axit nucleic mã hóa cho PPO đối chứng,
- d) chọn lọc ít nhất một axit nucleic mã hóa cho mut-PPO mà tạo ra mức độ dung chịu đối với thuốc diệt cỏ chứa dẫn xuất benzoxazinon tăng đáng kể so với mức độ chịu được tạo ra bởi axit nucleic mã hóa cho PPO đối chứng

Theo phương án được ưu tiên, axit nucleic mã hóa cho mut-PPO được chọn lọc trong bước d) tạo ra tính dung chịu đối với thuốc diệt cỏ chứa dẫn xuất benzoxazinon nhiều đến mức là ít nhất 2 lần so với tính chịu được tạo ra bởi axit nucleic mã hóa cho PPO đối chứng

Tính kháng hoặc tính dung chịu có thể được xác định bằng cách tạo ra cây

chuyển gen chứa trình tự axit nucleic thuộc thư viện trong bước a) và so sánh cây chuyển gen này với cây đối chứng.

Mục đích khác là đề xuất phương pháp nhận diện cây hoặc tảo chứa axit nucleic mã hóa cho mut-PPO mà kháng hoặc dung chịu đối với thuốc diệt cỏ chứa dẫn xuất benzoxazinon, phương pháp này bao gồm các bước:

- a) nhận diện lượng hữu hiệu của thuốc diệt cỏ chứa dẫn xuất benzoxazinon trong giống cây của tế bào cây hoặc tảo xanh.
- b) xử lý tế bào cây hoặc tảo xanh này bằng tác nhân gây đột biến,
- c) cho quần thể tế bào đã được gây đột biến tiếp xúc với lượng hữu hiệu của thuốc diệt cỏ chứa dẫn xuất benzoxazinon, được nhận diện trong a),
- d) chọn lọc ít nhất một tế bào sống sót trong các điều kiện thử nghiệm này,
- e) khuếch đại bằng PCR và xác định trình tự của các gen PPO từ các tế bào được chọn lọc trong d) và so sánh các trình tự này với các trình tự gen PPO kiểu dại, một cách tương ứng.

Theo phương án được ưu tiên, tác nhân gây đột biến là etylmetansulfonat.

Mục đích khác là đề xuất axit nucleic đã được phân lập mã hóa cho mut-PPO, axit nucleic này là có thể nhận diện được bằng phương pháp nêu trên.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất tế bào cây được biến nạp bởi axit nucleic PPO kiểu dại hoặc mut-PPO hoặc cây được gây đột biến để thu nhận cây mà biểu hiện, tốt hơn là biểu hiện quá mức axit nucleic PPO kiểu dại hoặc mut-PPO, trong đó sự biểu hiện của axit nucleic này ở tế bào cây tạo ra tính kháng hoặc dung chịu tăng đối với thuốc diệt cỏ chứa dẫn xuất benzoxazinon so với giống kiểu dại của tế bào cây.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất cây chứa tế bào cây theo sáng chế, trong đó sự biểu hiện của axit nucleic này ở cây tạo ra tính kháng tăng của cây đối với thuốc diệt cỏ chứa dẫn xuất benzoxazinon so với giống kiểu dại của cây.

Cây theo sáng chế có thể là chuyển gen hoặc không chuyển gen.

Tốt hơn là, sự biểu hiện của axit nucleic này ở cây tạo ra tính kháng tăng của cây đối với thuốc diệt cỏ chứa dẫn xuất benzoxazinon so với giống kiểu dại của cây.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất hạt giống được tạo ra bởi cây chuyển gen

chứa tế bào cây theo sáng chế, trong đó hạt giống này là thuần chủng về tính kháng tăng đối với thuốc diệt cỏ chứa dẫn xuất benzoxazinon so với giống kiểu đại của hạt giống.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra tế bào cây chuyển gen với tính kháng tăng đối với thuốc diệt cỏ chứa dẫn xuất benzoxazinon so với giống kiểu đại của tế bào cây, bao gồm bước biến nạp tế bào cây với kết cấu biểu hiện chứa axit nucleic PPO kiểu đại hoặc mut-PPO.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra cây chuyển gen bao gồm các bước, (a) biến nạp tế bào cây với kết cấu biểu hiện chứa axit nucleic PPO kiểu đại hoặc mut-PPO, và (b) tạo ra cây với tính kháng tăng đối với thuốc diệt cỏ chứa dẫn xuất benzoxazinon từ tế bào cây này.

Tốt hơn là, kết cấu biểu hiện còn chứa thêm vùng điều tiết sự khởi động phiên mã và vùng điều tiết sự khởi động dịch mã mà có chức năng ở cây.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất việc sử dụng mut-PPO theo sáng chế làm yếu tố đánh dấu có thể chọn lọc. Sáng chế đề xuất phương pháp nhận diện hoặc chọn lọc tế bào cây, mô cây, cây đã được biến nạp hoặc phần của chúng bao gồm các bước a) cung cấp tế bào cây, mô cây, cây đã được biến nạp hoặc phần của chúng, trong đó tế bào cây, mô cây, cây đã được biến nạp hoặc phần của chúng này chứa axit nucleic đã được phân lập mã hóa cho polypeptit mut-PPO theo sáng chế như được mô tả sau đây, trong đó polypeptit này được sử dụng làm yếu tố đánh dấu chọn lọc, và trong đó tế bào cây, mô cây, cây đã được biến nạp hoặc phần của chúng này có thể tùy ý chứa axit nucleic đã được phân lập đang quan tâm khác nữa; b) cho tế bào cây, mô cây, cây đã được biến nạp hoặc phần của chúng tiếp xúc với ít nhất một hợp chất ức chế dẫn xuất benzoxazinon; c) xác định xem liệu tế bào cây, mô cây, cây hoặc phần của chúng có bị tác động bởi tác nhân ức chế hoặc hợp chất ức chế hay không; và d) nhận diện hoặc chọn lọc tế bào cây, mô cây, cây đã được biến nạp hoặc phần của chúng.

Sáng chế còn đề xuất protein mut-PPO được tinh chế mà chứa các đột biến được nêu trong bản mô tả này, mà hữu dụng trong các nghiên cứu lập mô hình phân tử để thiết kế các cải thiện thêm nữa cho tính dung chịu thuốc diệt cỏ. Các phương pháp tinh chế protein đã được biết rõ, và có thể được thực hiện dễ dàng bằng cách sử dụng các sản phẩm có bán trên thị trường hoặc các phương pháp được thiết kế chuyên biệt, như

được nêu, ví dụ, trong ấn phẩm Protein Biotechnology, Walsh and Headon (Wiley, 1994).

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 thể hiện sự sắp hàng trình tự axit amin của các trình tự PPO từ *Amaranthustuberculatus* (*A.tuberculatus*), *Amaranthustuberculatus* có tính kháng (*A.tuberculatus_R*), *Arabidopsis thaliana* dài (*A.thaliana_2*), *Spinacia oleracea* ngắn (*S.oleracea_2*), *Nicotiana tabacum* ngắn (*N.tabacum_2*), *Glycine max* (*Glycine_max*), *Arabidopsis thaliana* ngắn (*A.thaliana_1*), *Nicotiana tabacum* dài (*N.tabacum_1*), *Chlamydomonas reinhardtii* dài (*C.reinhardtii_1*), *Zea mays* (*Z.mays*), *Oryza sativa* (*O.sativa_1*), *Solanum tuberosum* (*S.tuberosum*), *Cucumis sativus* (*C.sativus*), *Cichorium intybus* (*C.intybus_1*), *Spinacia oleracea* dài (*S.oleracea_1*), *Polytomella* sp. Pringsheim 198.80 (*Polytomella*). Các vùng được bảo toàn được thể hiện bằng màu ghi sáng, màu ghi và màu đen.

Fig. 2 thể hiện việc chọn lọc các chủng *Chlamydomonas reinhardtii* có tính kháng đối với thuốc diệt cỏ chứa dẫn xuất benzoxazinon 1.a.35. (A) Các tế bào đã được gây đột biến được đặt trên môi trường rắn mà không có tác nhân chọn lọc. (B) Các tế bào đã được gây đột biến được đặt trên môi trường rắn chứa 1×10^{-7} M dẫn xuất benzoxazinon 1.a.35. Các tế bào mà có tính kháng đối với thuốc diệt cỏ chứa dẫn xuất benzoxazinon tạo thành các khuẩn lạc (được khoanh tròn và đánh số 33, 34, 35 và 36), trong khi các tế bào mẫn cảm không sinh trưởng. Số lượng khuẩn lạc trên đĩa A cao hơn so với B, thể hiện rằng các khuẩn lạc trên đĩa B có tính kháng đối với dẫn xuất benzoxazinon 1.a.35.

Fig. 3 thể hiện sự tái sinh trưởng của các chủng *Chlamydomonas reinhardtii* được chọn như được thấy trong Fig. 2, có tính kháng đối với thuốc diệt cỏ chứa dẫn xuất benzoxazinon 1.a.35. (A) Các tế bào kiểu dại trong môi trường lỏng không có tác nhân chọn lọc. (B) Các tế bào kiểu dại trong môi trường lỏng chứa dẫn xuất benzoxazinon 1.a.35 tăng dần (nằm trong khoảng từ 1×10^{-9} đến 5×10^{-6} M). (C) Các tế bào đã được gây đột biến trong môi trường lỏng không có tác nhân chọn lọc. (D1, D2, E1, E2) Các chủng đã được gây đột biến và được chọn trong môi trường lỏng chứa dẫn xuất benzoxazinon 1.a.35 tăng dần (nằm trong khoảng từ 1×10^{-9} đến 5×10^{-6} M). Các chủng có tính kháng đối với thuốc diệt cỏ chứa dẫn xuất benzoxazinon 1.a.35 cấy thành màu

đậm hơn thể hiện sự sinh trưởng. Các chủng mất cảm không cây và vẫn còn sáng màu. Mật độ tế bào cao hơn trong môi trường lỏng có các tế bào đang sinh trưởng gây ra màu đậm hơn. Giống cây có mật độ thấp hơn xuất hiện ở trạng thái sáng màu hơn hoặc hoàn toàn trong suốt

Danh mục trình tự

Bảng 1

SEQ ID NO:	Mô tả	Sinh vật	Gen	Số truy nhập
1	Axit nucleic PPO	Amaranthus	PPX2L_WC	DQ386114
2	Axit amin PPO	Amaranthus		ABD52326
3	Axit nucleic PPO	Amaranthus	PPX2L_AC	DQ386117
4	Axit amin PPO	Amaranthus		ABD52329
5	Axit nucleic PPO	Amaranthus	PPX2L_CC_R	DQ386118
6	Axit amin PPO	Amaranthus		ABD52330
7	Axit nucleic PPO	Amaranthus	PPX2L_AC_R	DQ386116
8	Axit amin PPO	Amaranthus		ABD52328
9	Axit nucleic PPO	Arabidopsis	PPX	AB007650
10	Axit amin PPO	Arabidopsis		BAB08301
11	Axit nucleic PPO	Nicotiana	ppxI	AF044128
12	Axit amin PPO	Nicotiana		AAD02290
13	Axit nucleic PPO	Cichorium	PPX1	AF160961
14	Axit amin PPO	Cichorium		AF160961_1
15	Axit nucleic PPO	Spinacia	SO-POX1	AB029492
16	Axit amin PPO	Spinacia		BAA96808
17	Axit nucleic PPO	Spinacia	SO-POX2	AB046993
18	Axit amin PPO	Spinacia		BAB60710
19	Axit nucleic PPO	Solanum	PPOX	AJ225107
20	Axit amin PPO	Solanum		CAA12400
21	Axit nucleic PPO	Zea	ZM_BFc0091B03	BT063659
22	Axit amin PPO	Zea		ACN28356
23	Axit nucleic PPO	Zea	prpo2	NM_001111534
24	Axit amin PPO	Zea		NP_001105004
25	Axit nucleic PPO	Chlamydomonas	Ppx1	AF068635
26	Axit amin PPO	Chlamydomonas		AAC79685
27	Axit nucleic PPO	Polytomella	PPO	AF332964
28	Axit amin PPO	Polytomella		AF332964_1
29	Axit nucleic PPO	Sorghum	Hyp. Protein	XM_002446665
30	Axit amin PPO	Sorghum		XP_002446710
31	Axit nucleic PPO	Chlorella		
32	Axit amin PPO	Chlorella		51538
33	Axit nucleic PPO	Oryza	PPOX1	AB057771
34	Axit amin PPO	Oryza		BAB39760
35	Axit nucleic PPO	Amaranthus	PPX2	DQ386113

36	Axit amin PPO	Amaranthus		ABD52325
37	Axit nucleic PPO	Arabidopsis	PPOX	NM_178952
38	Axit amin PPO	Arabidopsis		NP_849283
39	Axit nucleic PPO	Nicotiana	ppxII	AF044129
40	Axit amin PPO	Nicotiana		AAD02291
41	Axit nucleic PPO	Glyxin	hemG	AB025102
42	Axit amin PPO	Glyxin		BAA76348
43	Axit nucleic PPO	Cucumis	CsPPO	AB512426
44	Axit amin PPO	Cucumis		BAH84864,1
45	Axit nucleic PPO	Oryza	Hyp. Protein	AL606613
46	Axit amin PPO	Oryza		CAE01661

Mô tả chi tiết sáng chế

Mạo từ số ít “một” được sử dụng trong bản mô tả này để chỉ một hoặc nhiều hơn một (tức là, đến ít nhất một) của đối tượng ngữ pháp của mạo từ này. Ví dụ, “một yếu tố” có nghĩa là một hoặc nhiều yếu tố.

Trong bản mô tả này, từ “chứa,” hoặc các biến thể như “có chứa” hoặc “chứa” sẽ được hiểu là nhằm để bao gồm yếu tố, số nguyên hoặc bước, hoặc nhóm các yếu tố, số nguyên hoặc bước được nêu, nhưng không loại trừ bất kỳ yếu tố, số nguyên hoặc bước, hoặc nhóm các yếu tố, số nguyên hoặc bước nào khác.

Sáng chế đề xuất phương pháp phòng trừ thực vật không mong muốn tại vị trí canh tác cây, phương pháp này bao gồm các bước:

- a) cung cấp, tại vị trí này, cây mà chứa ít nhất một axit nucleic chứa trình tự nucleotit mã hóa cho protoporphyrinogen oxidaza kiểu dại hoặc protoporphyrinogen oxidaza đã được gây đột biến (mut-PPO) mà kháng hoặc dung chịu đối với thuốc diệt cỏ chứa dẫn xuất benzoxazinon,
- b) cấp cho vị trí này lượng hữu hiệu của thuốc diệt cỏ này.

Thuật ngữ “phòng trừ thực vật không mong muốn” cần được hiểu là có nghĩa là việc tiêu diệt cỏ dại và/hoặc theo cách khác làm chậm hoặc ức chế sự sinh trưởng bình thường của cỏ dại. Cỏ dại, theo nghĩa rộng nhất, được hiểu là có nghĩa là tất cả các thực vật mà sinh trưởng ở các vị trí mà chúng không được mong muốn. Cỏ dại theo sáng chế bao gồm, ví dụ, cỏ dại hai lá mầm và cỏ dại một lá mầm. Cỏ dại hai lá mầm bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, cỏ dại thuộc các chi: Sinapis, Lepidium,

Galium, Stellaria, Matricaria, Anthemis, Galinsoga, Chenopodium, Urtica, Senecio, Rau dềnus, Portulaca, Xanthium, Convolvulus, Ipomoea, Polygonum, Sesbania, Ambrosia, Cirsium, Carduus, Sonchus, Solanum, Rorippa, Rotala, Lindernia, Lamium, Veronica, Abutilon, Emex, Datura, Viola, Galeopsis, Papaver, Centaure, Trifolium, Ranunculus, và Taraxacum. Cỏ dại một lá mầm bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, cỏ dại thuộc các chi: Echinochloa, Setaria, Panicum, Digitaria, Phleum, Poa, Festuca, Eleusine, Brachiaria, Lolium, Bromus, Avena, Cyperus, Sorghum, Agropyron, Cynodon, Monochoria, Fimbristylis, Sagittaria, Eleocharis, Scirpus, Paspalum, Ischaemum, Sphenoclea, Dactyloctenium, Agrostis, Alopecurus, và Apera. Ngoài ra, cỏ dại theo sáng chế có thể bao gồm, ví dụ, cây thời vụ mà đang sinh trưởng ở vị trí không mong muốn. Ví dụ, cây ngô mọc tự nhiên ở trên cánh đồng mà chủ yếu bao gồm cây đậu tương có thể bị coi là cỏ dại, nếu cây ngô là không mong muốn trên cánh đồng đậu tương này.

Thuật ngữ “cây” được sử dụng theo nghĩa rộng nhất của nó vì nó đi kèm với nguyên liệu hữu cơ và được dự định bao gồm các sinh vật nhân chuẩn là thành viên của giới thực vật, các ví dụ về chúng bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở các cây có mạch, rau, hạt, hoa, cây gỗ, cây thảo dược, cây bụi, thảm cỏ, cây nho, cây dương xỉ, rêu, nấm và tảo, v.v., cũng như các dòng vô tính, mầm cây, và các bộ phận của cây được dùng để nhân giống vô tính (ví dụ cành giâm, trồng bằng cành giâm, cành non, thân rễ, thân ở dưới đất, lùm cây, vòng hoa, thân hành, hành, thân củ, thân rễ, cây/ngô được tạo ra trong môi trường nuôi cấy mô, v.v.). Thuật ngữ “cây” còn bao gồm toàn bộ cây, thể hệ con và giống cây và các phần cây, bao gồm hạt giống, cành non, gốc, lá, rễ (bao gồm thân củ), hoa, hoa nhỏ, quả, cuống nhỏ, cuống, nhị hoa, bao phấn, đầu nhụy, vòi nhụy, bầu nhụy, cánh hoa, đài hoa, lá noãn, chóp rễ, đỉnh rễ, lông rễ, lông lá, lông hạt, hạt phấn, tiểu bào tử, lá mầm, trụ dưới lá mầm, trụ trên lá mầm, xylem, Libe, nhu mô, nội nhũ, tế bào kèm, tế bào bảo vệ, và cơ quan đã biết khác bất kỳ, mô. và các tế bào của cây, và mô và các cơ quan, trong đó mỗi trong số cơ quan nêu trên bao gồm gen/axit nucleic đang quan tâm. Thuật ngữ “cây” còn bao gồm các tế bào cây, môi trường nuôi cấy thể huyền phù, mô thể chai, phôi, vùng mô phân sinh, thể giao tử, thể bào tử, phấn hoa và các tiểu bào tử, một lần nữa trong đó mỗi trong các phần nêu trên bao gồm gen/axit nucleic đang quan tâm.

Cây mà đặc biệt hữu dụng trong phương pháp theo sáng chế bao gồm tất cả các

cây thuộc siêu họ Viridiplantae, cụ thể là cây một lá mầm và hai lá mầm bao gồm cỏ hoặc đậu cho súc vật, cây cảnh, cây thức ăn, cây gỗ hoặc cây bụi được chọn từ danh sách bao gồm *Acer* spp., *Actinidia* spp., *Abelmoschus* spp., *Agave sisalana*, *Agropyron* spp., *Agrostis stolonifera*, *Allium* spp., *Amaranthus*spp., *Ammophila arenaria*, *Ananas comosus*, *Annona* spp., *Apium graveolens*, *Arachis* spp., *Artocarpus* spp., Mãng tây *officinalis*, *Avena* spp. (ví dụ *Avena sativa*, *Avena fatua*, *Avena byzantina*, *Avena fatua* var. *sativa*, *Avena hybrida*), *Averrhoa carambola*, *Bambusa* sp., *Benincasa hispida*, *Bertholletia excelsea*, *Beta vulgaris*, *Brassica* spp. (ví dụ *Brassica napus*, *Brassica rapa* ssp. [cải canola, cải hạt dầu, cây củ cải]), *Cadaba farinosa*, *Camellia sinensis*, *Canna indica*, *Cannabis sativa*, *Capsicum* spp., *Carex elata*, *Carica papaya*, *Carissa macrocarpa*, *Carya* spp., *Carthamus tinctorius*, *Castanea* spp., *Ceiba pentandra*, *Cichorium endivia*, *Cinnamomum* spp., *Citrullus lanatus*, *Citrus* spp., *Cocos* spp., *Coffea* spp., *Colocasia esculenta*, *Cola* spp., *Corchorus* sp., *Coriandrum sativum*, *Corylus* spp., *Crataegus* spp., *Crocus sativus*, *Cucurbita* spp., *Cucumis* spp., *Cynara* spp., *Daucus carota*, *Desmodium* spp., *Dimocarpus longan*, *Dioscorea* spp., *Diospyros* spp., *Echinochloa* spp., *Elaeis* (ví dụ *Elaeis guineensis*, *Elaeà Oleifera*), *Eleusine coracana*, *Eragrostis tef*, *Erianthus* sp., *Eriobotrya japonica*, *Eucalyptus* sp., *Eugenia uniflora*, *Fagopyrum* spp., *Fagus* spp., *Festuca arundinacea*, *Ficus carica*, *Fortunella* spp., *Fragaria* spp., *Ginkgo biloba*, *Glycine* spp. (ví dụ *Glycine max*, *Soja hispida* hoặc *Soja max*), *Gossypium hirsutum*, *Helianthus* spp. (ví dụ *Helianthus annuus*), *Hemercallis fulva*, *Hibiscus* spp., *Hordeum* spp. (ví dụ *Hordeum vulgare*), *Ipomoea batatas*, *Juglans* spp., *Lactuca sativa*, *Lathyrus* spp., *Lens culinaris*, *Linum usitatissimum*, *Litchi chinensis*, *Lotus* spp., *Luffa acutangula*, *Lupinus* spp., *Luzula sylvatica*, *Lycopersicon* spp. (ví dụ *Lycopersicon esculentum*, *Lycopersicon lycopersicum*, *Lycopersicon pyriforme*), *Macrotyloma* spp., *Malus* spp., *Malpighia emarginata*, *Mammea americana*, *Mangifera indica*, *Manihot* spp., *Manilkara zapota*, *Medicago sativa*, *Melilotus* spp., *Mentha* spp., *Miscanthus sinensis*, *Momordica* spp., *Morus nigra*, *Musa* spp., *Nicotiana* spp., *Olea* spp., *Opuntia* spp., *Ornithopus* spp., *Oryza* spp. (ví dụ *Oryza sativa*, *Oryza latifolia*), *Panicum miliaceum*, *Panicum virgatum*, *Passiflora edulis*, *Pastinaca sativa*, *Pennisetum* sp., *Persea* spp., *Petroselinum crispum*, *Phalaris arundinacea*, *Phaseolus* spp., *Phleum pratense*, *Phoenix* spp., *Phragmites australis*, *Physalis*

H ° *Pinus* spp., *Pistacia vera*, *Pisum* spp., *Poa* spp., *Populus* spp., *Prosopis* spp.,

Prunus spp., *Psidium* spp., *Punica granatum*, *Pyrus communis*, *Quercus* spp., *Raphanus sativus*, *Rheum rhabarbarum*, *Ribes* spp., *Ricinus communis*, *Rubus* spp., *Saccharum* spp., *Salix* sp., *Sambucus* spp., *Secale cereale*, *Sesamum* spp., *Sinapis* sp., *Solanum* spp. (ví dụ *Solanum tuberosum*, *Solanum integrifolium* hoặc *Solanum lycopersicum*), *Sorghum bicolor*, *Spinacia* spp., *Syzygium* spp., *Cúc vạn thọ* spp., *Tamarindus indica*, *Theobroma cacao*, *Trifolium* spp., *Tripsacum dactyloides*, *Triticosecale rimpaui*, *Triticum* spp. (ví dụ *Triticum aestivum*, *Triticum durum*, *Triticum turgidum*, *Triticum hybernum*, *Triticum macha*, *Triticum sativum*, *Triticum monococcum* hoặc *Triticum vulgare*), *Tropaeolum minus*, *Tropaeolum majus*, *Vaccinium* spp., *Vicia* spp., *Vigna* spp., *Viola odorata*, *Vitis* spp., *Zea mays*, *Zizania palustris*, *Ziziphus* spp., rau dền, atisô, măng tây, cây bông cải xanh, Cải Bruxen, cây cải bắp, cải canola, carot, cây súp lơ, cần tây, cải bắp xanh, cây lanh, cải xoăn, cây đậu lăng, cải hạt dầu, cây mướp tây, cây hành, cây khoai tây, cây lúa, cây đậu tương, cây dâu tây, củ cải đường, cây mía, cây hướng dương, cây cà chua, cây bí, chè và táo, trong số các cây khác. Theo phương án được ưu tiên của sáng chế, cây là cây thời vụ. Các ví dụ về cây thời vụ không kể những cây khác bao gồm cây đậu tương, cây hướng dương, cải canola, cỏ linh lăng, cải hạt dầu, cây bông, cây cà chua, cây khoai tây hoặc cây thuốc lá. Tốt hơn nữa là, cây là cây một lá mầm, như cây mía. Tốt hơn nữa là, cây là cây ngũ cốc, như cây lúa, cây ngô, cây lúa mỳ, cây lúa mạch, cây kê, cây lúa mạch đen, cây lúa miến hoặc cây yến mạch.

Theo phương án được ưu tiên, cây được tạo ra trước đó bằng quy trình bao gồm bước tạo ra cây theo cách tái tổ hợp bằng cách đưa vào và biểu hiện quá mức gen chuyển PPO kiểu đại hoặc mut-PPO, như được mô tả chi tiết hơn dưới đây.

Theo phương án được ưu tiên khác, cây được tạo ra trước đó bằng quy trình bao gồm bước gây đột biến tế bào cây in situ, để thu nhận tế bào cây biểu hiện mut-PPO.

Như được bộc lộ trong bản mô tả này, axit nucleic theo sáng chế có thể được sử dụng trong việc tăng cường tính dung chịu thuốc diệt cỏ của các cây mà chứa, trong hệ gen của chúng, gen mã hóa cho protein PPO kiểu đại hoặc mut-PPO dung chịu thuốc diệt cỏ. Gen này có thể là gen nội sinh hoặc gen chuyển, như được mô tả sau đây. Ngoài ra, theo một số phương án nhất định, axit nucleic theo sáng chế có thể được xếp với hỗn hợp bất kỳ của trình tự polynucleotit đang quan tâm để tạo ra các cây có kiểu hình mong muốn. Ví dụ, axit nucleic theo sáng chế có thể được xếp với các polynucle-

otit khác bất kỳ mã hóa cho các polypeptit có hoạt tính diệt côn loài gây hại/điệt côn trùng, như, ví dụ, protein có độc tố *Bacillus thuringiensis* (như được mô tả trong các patent Mỹ số 5,366,892; 5,747,450; 5,737,514; 5,723,756; 5,593,881; và Geiser et al (1986) Gene 48: 109). Các hỗn hợp được tạo ra có thể còn bao gồm nhiều phiên bản của bất kỳ một trong các polynucleotit đang quan tâm.

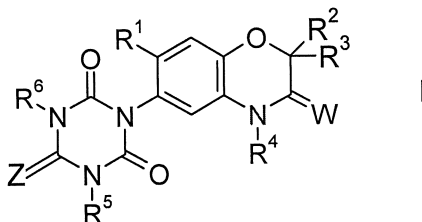
Theo phương án được ưu tiên đặc biệt, cây chứa ít nhất một axit nucleic khác loại bổ sung chứa trình tự nucleotit mã hóa cho enzym kháng thuốc diệt cỏ được chọn, ví dụ, từ nhóm bao gồm 5-enolpyruvylshikimat-3-phosphat syntaza (EPSPS), Glyphosat/axetyl transferaza (GAT), Cytochrome P450, phosphinothrixin axetyltransferaza (PAT), Axetohydroxyaxit syntaza (AHAS; EC 4,1,3,18, còn được gọi là axetolactat syntaza hoặc ALS), hydroxyphenyl pyruvat dioxyaza (HPPD), Phytoen desaturaza (PD) và các enzym phân rã dicamba như được bộc lộ trong WO 02/068607, hoặc các enzym phân rã phenoxyaxeticaxit- và dẫn xuất phenoxypropionicaxit như được bộc lộ trong WO 2008141154 hoặc WO 2005107437.

Nói chung, thuật ngữ "thuốc diệt cỏ" được sử dụng trong bản mô tả này có nghĩa là thành phần hoạt tính mà tiêu diệt, kiểm soát hoặc theo cách khác làm thay đổi theo hướng bất lợi sự sinh trưởng của cây. Lượng hoặc nồng độ được ưu tiên của thuốc diệt cỏ là "lượng hữu hiệu" hoặc "nồng độ hữu hiệu." Thuật ngữ "lượng hữu hiệu" và "nồng độ hữu hiệu" là lượng và nồng độ, một cách tương ứng, đủ để tiêu diệt hoặc ức chế sự sinh trưởng của cây, mô cây, tế bào cây, hoặc tế bào chủ kiểu dại, tương tự, nhưng lượng này không tiêu diệt hoặc ức chế đến mức khắc nghiệt sự sinh trưởng của cây, mô cây, tế bào cây, và tế bào chủ kháng thuốc diệt cỏ theo sáng chế. Thông thường, lượng hữu hiệu của thuốc diệt cỏ là lượng thường được sử dụng trong các hệ sản xuất nông nghiệp để tiêu diệt cỏ dại đang quan tâm. Lượng như vậy là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Hoạt tính diệt cỏ được thể hiện bởi thuốc diệt cỏ chứa dẫn xuất benzoxazinon theo sáng chế khi chúng được cấp trực tiếp cho cây hoặc cho nơi sống của cây vào giai đoạn sinh trưởng bất kỳ hoặc trước khi trồng hoặc nhúng mầm. Tác dụng quan sát được phụ thuộc vào loài cây cần được kiểm soát, giai đoạn sinh trưởng của cây, các thông số ứng dụng về sự pha loãng và cỡ giọt phun, cỡ hạt của các thành phần rắn, các điều kiện môi trường tại thời điểm sử dụng, hợp chất cụ thể được sử dụng, các chất phụ trợ và chất mang cụ thể được sử dụng, loại đất trồng, và các thông số tương tự, cũng như lượng hóa chất được cấp. Các

yếu tố này và các yếu tố khác có thể được điều chỉnh như đã biết trong tình trạng kỹ thuật để thúc đẩy hoạt tính diệt cỏ chọn lọc và không chọn lọc. Nói chung, ưu tiên nếu cấp thuốc diệt cỏ chứa dẫn xuất benzoxazinon sau khi nhũ mầm cho thực vật không mong muốn tương đối chưa trưởng thành để đạt được sự kiểm soát cỏ dại tối đa.

Thuật ngữ cây "dung chịu thuốc diệt cỏ" hoặc "kháng thuốc diệt cỏ" có nghĩa là cây có tính dung chịu hoặc có tính kháng đối với ít nhất một thuốc diệt cỏ ở mức mà thường sẽ tiêu diệt, hoặc ức chế sự sinh trưởng của, cây bình thường hoặc cây kiểu dại. Thuật ngữ "protein mut-PPO dung chịu thuốc diệt cỏ" hoặc "protein mut-PPO kháng thuốc diệt cỏ" có nghĩa là protein mut-PPO này thể hiện hoạt tính PPO cao hơn, so với hoạt tính PPO của protein mut-PPO kiểu dại, khi có mặt của ít nhất một thuốc diệt cỏ mà được biết là cản trở hoạt tính PPO và ở nồng độ hoặc mức độ thuốc diệt cỏ được biết là ức chế hoạt tính PPO của protein mut-PPO kiểu dại. Ngoài ra, hoạt tính PPO của protein mut-PPO dung chịu thuốc diệt cỏ hoặc kháng thuốc diệt cỏ này có thể được gọi trong bản mô tả này là hoạt tính PPO "dung chịu thuốc diệt cỏ" hoặc "kháng thuốc diệt cỏ".

“Thuốc diệt cỏ chứa dẫn xuất benzoxazinon” theo sáng chế bao gồm benzoxazinon có công thức I như được mô tả sau đây:



trong đó

R¹ là hydro hoặc halogen;

R² là halogen;

R³ là hydro hoặc halogen;

R⁴ là hydro, C₁-C₆-alkyl, C₁-C₆-haloalkyl, C₃-C₆-cycloalkyl, C₃-C₆-alkenyl, C₃-C₆-haloalkenyl, C₃-C₆-alkynyl, C₃-C₆-haloalkynyl, C₁-C₆-alkoxy hoặc C₃-C₆-xycloalkyl-C₁-C₆-alkyl;

R⁵ là hydro, NH₂, C₁-C₆-alkyl hoặc C₃-C₆-alkynyl;

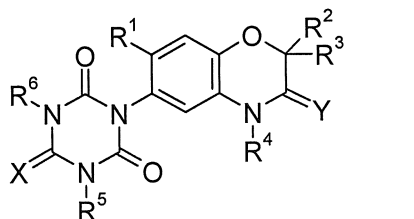
R⁶ là hydro hoặc C₁-C₆-alkyl; và

W là O hoặc S;

Z là O hoặc S.

Theo phương án được ưu tiên khác, “thuốc diệt cỏ chứa dẫn xuất benzoxazinon” theo sáng chế bao gồm benzoxazinon có công thức I như được mô tả sau đây:

A) ít nhất một benzoxazinon có công thức I



trong đó

R¹ là hydro hoặc halogen;

R² là halogen;

R^3 là hydro hoặc halogen;

R⁴ là hydro, C₁-C₆-alkyl, C₁-C₆-haloalkyl, C₃-C₆-xycloalkyl, C₃-C₆-alkenyl, C₃-C₆-haloalkenyl, C₃-C₆-alkynyl, C₃-C₆-haloalkynyl, C₁-C₆-alkoxy hoặc C₃-C₆-xycloalkyl-C₁-C₆-alkyl;

R⁵ là hydro, NH₂, C₁-C₆-alkyl hoặc C₃-C₆-alkynyl;

R⁶ là hydro hoặc C₁-C₆-alkyl; và

X là O hoặc S;

Y là O hoặc S;

và ít nhất một hoạt chất khác nữa được chọn từ

B) các thuốc diệt cỏ thuộc lớp b1) đến b15):

b1) các chất ức chế sinh tổng hợp lipid;

b2) các chất ức chế axetolactat syntaza (các chất ức chế ALS);

b3) các chất ức chế sự quang hợp;

b4) các chất ức chế protoporphyrinogen-IX oxidaza,

- b5) các thuốc diệt cỏ tẩy trắng;
- b6) các chất ức chế enolpyruvyl shikimat 3-phosphat syntaza (các chất ức chế EPSP);
- b7) các chất ức chế glutamin synthetaza;
- b8) các chất ức chế 7,8-dihydropteroat syntaza (các chất ức chế DHP);
- b9) các chất ức chế mitozơ;
- b10) các chất ức chế sự tổng hợp của axit béo mạch rất dài (các chất ức chế VLCFA);
- b11) các chất ức chế sinh tổng hợp xenlulozơ;
- b12) các thuốc diệt cỏ khử liên hợp;
- b13) các thuốc diệt cỏ auxin;
- b14) các chất ức chế vận chuyển auxin; và
- b15) các thuốc diệt cỏ khác được chọn từ nhóm bao gồm brombutide, cloflurenol, cloflurenol-metyl, cinmetylin, cumyluron, dalapon, dazomet, difenzoquat, difenzoquat-metilsulfat, dimethipin, DSMA, dymron, endo-thal và muối của nó, etobenzanid, flamprop, flamprop-isopropyl, flamprop-metyl, flamprop-M-isopropyl, flamprop-M-metyl, flurenol, flurenol-butyl, flurprimidol, fosamin, fosamin-amoni, indanofan, indaziflam, maleic hydrazit, mefluidit, metam, metyl azit, metyl bromua, metyl-dymron, metyl iodua, MSMA, axit oleic, oxaziclomefon, axit pelargonit, pyributicarb, quinoclamin, triaziflam, tridiphan và 6-clo-3-(2-xyclopropyl-6-metylphenoxy)-4-pyridazinol (CAS 499223-49-3) và muối và este của nó;

và

C) các chất an toàn.

Thuốc diệt cỏ chứa dẫn xuất benzoxazinon mà hữu dụng cho sáng chế còn có thể là hợp phần ở dạng hợp phần bảo vệ mùa màng có hoạt tính diệt cỏ chứa lượng hữu hiệu để diệt cỏ của sản phẩm kết hợp của hoạt chất chứa ít nhất một benzoxazinon có công thức I và ít nhất một hoạt chất khác nữa được chọn từ các thuốc diệt cỏ B và các

chất an toàn C như nêu trên, và cả ít nhất một chất mang lỏng và/hoặc rắn và/hoặc một hoặc nhiều chất hoạt động bề mặt và, nếu muốn, một hoặc nhiều chất bổ trợ khác nữa thường dùng cho hợp phần bảo vệ mùa màng.

Hơn nữa, thuốc diệt cỏ chứa dẫn xuất benzoxazinon mà hữu dụng cho sáng chế còn có thể là hợp phần ở dạng hợp phần bảo vệ mùa màng được phối trộn dưới dạng hợp phần 1 thành phần chứa sản phẩm kết hợp của hoạt chất chứa ít nhất một benzoxazinon có công thức I và ít nhất một hoạt chất khác nữa được chọn từ các thuốc diệt cỏ B và các chất an toàn C, và ít nhất một chất mang rắn hoặc lỏng và/hoặc một hoặc nhiều chất hoạt động bề mặt và, nếu muốn, một hoặc nhiều chất bổ trợ khác nữa thường dùng cho hợp phần bảo vệ mùa màng.

Hơn nữa, thuốc diệt cỏ chứa dẫn xuất benzoxazinon mà hữu dụng cho sáng chế còn có thể là hợp phần ở dạng hợp phần bảo vệ mùa màng được phối trộn dưới dạng hợp phần 2 thành phần bao gồm thành phần thứ nhất chứa ít nhất một benzoxazinon có công thức I, chất mang rắn hoặc lỏng và/hoặc một hoặc nhiều chất hoạt động bề mặt, và thành phần thứ hai chứa ít nhất một hoạt chất khác nữa được chọn từ các thuốc diệt cỏ B và các chất an toàn C, chất mang rắn hoặc lỏng và/hoặc một hoặc nhiều chất hoạt động bề mặt, trong đó ngoài ra, cả hai thành phần này còn có thể chứa các chất bổ trợ khác nữa thường dùng cho hợp phần bảo vệ mùa màng.

Nếu benzoxazinon có công thức I được nêu trong bản mô tả này có khả năng tạo thành các chất đồng phân hình học, ví dụ chất đồng phân E/Z, có thể sử dụng cả hai, chất đồng phân tinh khiết và hỗn hợp của chúng, trong hợp phần theo sáng chế.

Nếu benzoxazinon có công thức I được nêu trong bản mô tả này có một hoặc nhiều tâm không đối xứng và, kết quả là tồn tại dưới dạng chất đồng phân đối ảnh hoặc chất đồng phân không đối quang, có thể sử dụng cả hai, chất đồng phân đối ảnh và chất đồng phân không đối quang tinh khiết và hỗn hợp của chúng, trong hợp phần theo sáng chế.

Các gốc hữu cơ được nêu trong các định nghĩa về các giá trị biến đổi R^1 đến R^6 , là - như thuật ngữ halogen – các thuật ngữ tổng quát cho sự liệt kê riêng biệt của các thành viên nhóm riêng biệt. Thuật ngữ halogen chỉ, trong từng trường hợp, flo, clo, brom hoặc iot. Tất cả các chuỗi hydrocacbon, tức là tất cả alkyl, có thể là mạch thẳng

hoặc mạch nhánh, tiền tố C_n-C_m chỉ, trong từng trường hợp, số lượng nguyên tử cacbon có thể có trong nhóm.

Ví dụ về các nghĩa này là:

- C_1-C_4 -alkyl và cả các gốc C_1-C_4 -alkyl của C_3-C_6 -xycloalkyl- C_1-C_4 -alkyl: ví dụ CH_3 , C_2H_5 , n-propyl, và $CH(CH_3)_2$ n-butyl, $CH(CH_3)-C_2H_5$, $CH_2-CH(CH_3)_2$ và $C(CH_3)_3$;
- C_1-C_6 -alkyl và cả các gốc C_1-C_6 -alkyl của C_1-C_6 -alkoxy- C_1-C_6 -alkyl: C_1-C_4 -alkyl như nêu trên, và cả, ví dụ, n-pentyl, 1-metylbutyl, 2-metylbutyl, 3-metylbutyl, 2,2-dimetylpropyl, 1-etylpropyl, n-hexyl, 1,1-dimetylpropyl, 1,2-dimetylpropyl, 1-metylpentyl, 2-metylpentyl, 3-metylpentyl, 4-metylpentyl, 1,1-dimetylbutyl, 1,2-dimetylbutyl, 1,3-dimetylbutyl, 2,2-dimetylbutyl, 2,3-dimetylbutyl, 3,3-dimetylbutyl, 1-etylbutyl, 2-etylbutyl, 1,1,2-trimetylpropyl, 1,2,2-trimetylpropyl, 1-etyl-1-metylpropyl hoặc 1-etyl-2-metylpropyl, tốt hơn là metyl, etyl, n-propyl, 1-metyletyl, n-butyl, 1,1-dimetyletyl, n-pentyl hoặc n-hexyl;
- C_1-C_4 -haloalkyl: gốc C_1-C_4 -alkyl như nêu trên mà được thế một phần hoặc hoàn toàn bởi flo, clo, brom và/hoặc iot, ví dụ, clometyl, diclometyl, triclometyl, flometyl, diflometyl, triflometyl, cloflometyl, dicloflometyl, clodiflometyl, brommetyl, iotmetyl, 2-floetyl, 2-cloetyl, 2-brometyl, 2-iotetyl, 2,2-difloetyl, 2,2,2-trifloetyl, 2-clo-2-floetyl, 2-clo-2,2-difloetyl, 2,2-diclo-2-floetyl, 2,2,2-tricloetyl, pentaflloetyl, 2-flopropyl, 3-flopropyl, 2,2-diflopropyl, 2,3-diflopropyl, 2-clopropyl, 3-clopropyl, 2,3-diclopropyl, 2-brompropyl, 3-brompropyl, 3,3,3-triflopropyl, 3,3,3-triclopropyl, 2,2,3,3,3-pentafllopropyl, heptafllopropyl, gốc C_1-C_3 -haloalkyl như nêu trên, và cả, ví dụ, 1-(flometyl)-2-floetyl, 1-(clometyl)-2-cloetyl, 1-(brommetyl)-2-brometyl, 4-flobutyl, 4-clobutyl, 4-brombutyl, nonafllobutyl, 1,1,2,2-tetraflloetyl và 1-triflometyl-1,2,2,2-tetraflloetyl;
- C_1-C_6 -haloalkyl: C_1-C_4 -haloalkyl như nêu trên, và cả, ví dụ, 5-flopentyl, 5-clopentyl, 5-brompentyl, 5-iotpentyl, undecafllopentyl, 6-flohexyl, 6-clohexyl, 6-bromhexyl, 6-iothexyl và dodecafllohexyl;
- C_3-C_6 -xycloalkyl và cả các gốc xycloalkyl của C_3-C_6 -xycloalkyl- C_1-C_4 -alkyl: các hydrocacbon no đơn vòng có từ 3 đến 6 thành phần vòng, như xyclopropyl, xy-

clobutyl, xyclopentyl và xyclohexyl;

- C₃-C₆-alkenyl: ví dụ 1-propenyl, 2-propenyl, 1-metylethenyl, 1-butenyl, 2-butenyl, 3-butenyl, 1-metyl-1-propenyl, 2-metyl-1-propenyl, 1-metyl-2-propenyl, 2-metyl-2-propenyl, 1-pentenyl, 2-pentenyl, 3-pentenyl, 4-pentenyl, 1-metyl-1-butenyl, 2-metyl-1-butenyl, 3-metyl-1-butenyl, 1-metyl-2-butenyl, 2-metyl-2-butenyl, 3-metyl-2-butenyl, 1-metyl-3-butenyl, 2-metyl-3-butenyl, 3-metyl-3-butenyl, 1,1-dimetyl-2-propenyl, 1,2-dimetyl-1-propenyl, 1,2-dimetyl-2-propenyl, 1-etyl-1-propenyl, 1-etyl-2-propenyl, 1-hexenyl, 2-hexenyl, 3-hexenyl, 4-hexenyl, 5-hexenyl, 1-metyl-1-pentenyl, 2-metyl-1-pentenyl, 3-metyl-1-pentenyl, 4-metyl-1-pentenyl, 1-metyl-2-pentenyl, 2-metyl-2-pentenyl, 3-metyl-2-pentenyl, 4-metyl-2-pentenyl, 1-metyl-3-pentenyl, 2-metyl-3-pentenyl, 3-metyl-3-pentenyl, 4-metyl-3-pentenyl, 1-metyl-4-pentenyl, 2-metyl-4-pentenyl, 3-metyl-4-pentenyl, 4-metyl-4-pentenyl, 1,1-dimetyl-2-butenyl, 1,1-dimetyl-3-butenyl, 1,2-dimetyl-1-butenyl, 1,2-dimetyl-2-butenyl, 1,2-dimetyl-3-butenyl, 1,3-dimetyl-1-butenyl, 1,3-dimetyl-2-butenyl, 1,3-dimetyl-3-butenyl, 2,2-dimetyl-3-butenyl, 2,3-dimetyl-1-butenyl, 2,3-dimetyl-2-butenyl, 2,3-dimetyl-3-butenyl, 3,3-dimetyl-1-butenyl, 3,3-dimetyl-2-butenyl, 1-etyl-1-butenyl, 1-etyl-2-butenyl, 1-etyl-3-butenyl, 2-etyl-1-butenyl, 2-etyl-2-butenyl, 2-etyl-3-butenyl, 1,1,2-trimetyl-2-propenyl, 1-etyl-1-metyl-2-propenyl, 1-etyl-2-metyl-1-propenyl và 1-etyl-2-metyl-2-propenyl;
- C₃-C₆-haloalkenyl: gốc C₃-C₆-alkenyl như nêu trên mà được thế một phần hoặc hoàn toàn bởi flo, clo, brom và/hoặc iot, ví dụ 2-cloprop-2-en-1-yl, 3-cloprop-2-en-1-yl, 2,3-dicloprop-2-en-1-yl, 3,3-dicloprop-2-en-1-yl, 2,3,3-triclo-2-en-1-yl, 2,3-diclobut-2-en-1-yl, 2-bromprop-2-en-1-yl, 3-bromprop-2-en-1-yl, 2,3-dibromprop-2-en-1-yl, 3,3-dibromprop-2-en-1-yl, 2,3,3-tribrom-2-en-1-yl hoặc 2,3-dibrombut-2-en-1-yl;
- C₃-C₆-alkynyl: ví dụ 1-propynyl, 2-propynyl, 1-butynyl, 2-butynyl, 3-butynyl, 1-metyl-2-propynyl, 1-pentynyl, 2-pentynyl, 3-pentynyl, 4-pentynyl, 1-metyl-2-butynyl, 1-metyl-3-butynyl, 2-metyl-3-butynyl, 3-metyl-1-butynyl, 1,1-dimetyl-2-propynyl, 1-etyl-2-propynyl, 1-hexynyl, 2-hexynyl, 3-hexynyl, 4-hexynyl, 5-hexynyl, 1-metyl-2-pentynyl, 1-metyl-3-pentynyl, 1-metyl-4-pentynyl, 2-metyl-3-pentynyl, 2-metyl-4-pentynyl, 3-metyl-1-pentynyl, 3-metyl-4-pentynyl, 4-

- metyl-1-pentynyl, 4-metyl-2-pentynyl, 1,1-dimetyl-2-butynyl, 1,1-dimetyl-3-butynyl, 1,2-dimetyl-3-butynyl, 2,2-dimetyl-3-butynyl, 3,3-dimetyl-1-butynyl, 1-etyl-2-butynyl, 1-etyl-3-butynyl, 2-etyl-3-butynyl và 1-etyl-1-metyl-2-propynyl;
- C₃-C₆-haloalkynyl: gốc C₃-C₆-alkynyl như nêu trên mà được thế một phần hoặc hoàn toàn bởi flo, clo, brom và/hoặc iot, ví dụ 1,1-difloprop-2-yn-1-yl, 3-cloprop-2-yn-1-yl, 3-bromprop-2-yn-1-yl, 3-iotprop-2-yn-1-yl, 4-flobut-2-yn-1-yl, 4-clobut-2-yn-1-yl, 1,1-diflobut-2-yn-1-yl, 4-iotbut-3-yn-1-yl, 5-flopent-3-yn-1-yl, 5-iotpent-4-yn-1-yl, 6-flohex-4-yn-1-yl hoặc 6-iothex-5-yn-1-yl;
 - C₁-C₄-alkoxy và cả các gốc C₁-C₄-alkoxy của hydroxycarbonyl-C₁-C₄-alkoxy, C₁-C₆-alkoxycarbonyl-C₁-C₄-alkoxy: ví dụ metoxy, etoxy, propoxy, 1-metyloxy butoxy, 1-metylpropoxy, 2-metylpropoxy và 1,1-dimetyloxy;
 - C₁-C₆-alkoxy và cả các gốc C₁-C₆-alkoxy của C₁-C₆-alkoxycarbonyl-C₁-C₄-alkoxy: C₁-C₄-alkoxy như nêu trên, và cả, ví dụ, pentoxy, 1-metylbutoxy, 2-metylbutoxy, 3-metoxylbutoxy, 1,1-dimetylpropoxy, 1,2-dimetylpropoxy, 2,2-dimetylpropoxy, 1-etylpropoxy, hexoxy, 1-metylpentoxy, 2-metylpentoxy, 3-metylpentoxy, 4-metylpentoxy, 1,1-dimetylbutoxy, 1,2-dimetylbutoxy, 1,3-dimetylbutoxy, 2,2-dimetylbutoxy, 2,3-dimetylbutoxy, 3,3-dimetylbutoxy, 1-etylbutoxy, 2-etylbutoxy, 1,1,2-trimetylpropoxy, 1,2,2-trimetylpropoxy, 1-etyl-1-metylpropoxy và 1-etyl-2-metylpropoxy.

Theo phương án được ưu tiên của sáng chế, cũng được ưu tiên là dẫn xuất benzoxazinon có công thức I, trong đó các giá trị biến đổi, độc lập với nhau hoặc ở dạng kết hợp với nhau, có các nghĩa nêu dưới đây:

R¹ là hydro;

cũng được ưu tiên là halogen, được ưu tiên đặc biệt là F hoặc Cl, được ưu tiên rất đặc biệt là F;

R² là F;

R³ là hydro hoặc F, tốt hơn là hydro;

cũng được ưu tiên là F;

R⁴ là C₃-C₆-alkynyl hoặc C₃-C₆-haloalkynyl, tốt hơn là C₃-alkynyl hoặc C₃-haloalkynyl,

được ưu tiên đặc biệt là $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$, $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CCl}$ hoặc $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CBr}$;

cũng được ưu tiên là $\text{C}_3\text{-C}_6\text{-alkynyl}$ hoặc $\text{C}_3\text{-C}_6\text{-xycloalkyl-C}_1\text{-C}_6\text{-alkyl}$, được ưu tiên đặc biệt là propargyl hoặc xyclopropylmetyl;

cũng được ưu tiên là $\text{C}_3\text{-C}_6\text{-alkynyl}$, tốt hơn là $\text{C}_3\text{-alkynyl}$; được ưu tiên đặc biệt là $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$;

cũng được ưu tiên là $\text{C}_3\text{-C}_6\text{-halolalkynyl}$, tốt hơn là $\text{C}_3\text{-halolalkynyl}$, được ưu tiên đặc biệt là $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CCl}$ hoặc $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CBr}$;

R^5 là NH_2 , $\text{C}_1\text{-C}_6\text{-Alkyl}$ hoặc $\text{C}_3\text{-C}_6\text{-alkynyl}$; tốt hơn là $\text{C}_1\text{-C}_6\text{-alkyl}$; tốt hơn nữa là $\text{C}_1\text{-C}_4\text{-alkyl}$; tốt nhất là CH_3 ;

R^6 là $\text{C}_1\text{-C}_6\text{-alkyl}$; tốt hơn là $\text{C}_1\text{-C}_4\text{-alkyl}$; tốt nhất là CH_3 ;

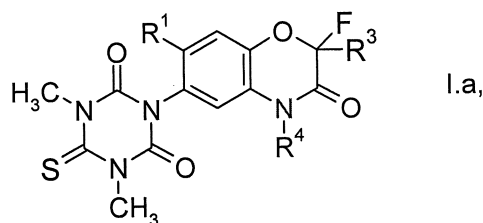
W là O,

cũng được ưu tiên là S;

Z là O,

cũng được ưu tiên là S.

Được ưu tiên đặc biệt là benzoxazinon có công thức I.a (tương ứng với công thức I trong đó R^2 là F, R^5 và R^6 là CH_3 , W là O và Z là S),



trong đó các giá trị biến đổi R^1 , R^3 , và R^4 có các nghĩa, cụ thể là các nghĩa được ưu tiên như nêu trên.

Được ưu tiên đặc biệt là dẫn xuất benzoxazinon có công thức I.a.1 đến I.a.48 của Bảng A được liệt kê dưới đây, trong đó các giá trị biến đổi R^1 , R^3 và R^4 cùng nhau có các nghĩa được nêu trong một dòng của Bảng A (benzoxazinon I.a.1 đến I.a.54); và trong đó các định nghĩa của các giá trị biến đổi R^1 , R^2 , R^3 và R^4 là đặc biệt quan trọng đối với hợp chất theo sáng chế không chỉ ở dạng kết hợp với nhau mà còn, trong từng trường hợp, chỉ riêng chúng.

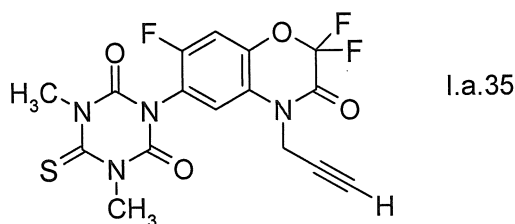
Bảng A

No.	R ¹	R ³	R ⁴
l.a.1.	H	H	H
l.a.2.	H	H	CH ₃
l.a.3.	H	H	C ₂ H ₅
l.a.4.	H	H	CH ₂ -C ₂ H ₅
l.a.5.	H	H	CH(CH ₃) ₂
l.a.6.	H	H	CH ₂ -CH ₂ -(CH ₃) ₂
l.a.7.	H	H	CH ₂ -CH=CH ₂
l.a.8.	H	H	CH ₂ C≡CH
l.a.9.	H	H	CH ₂ C≡C-Br
l.a.10.	H	F	H
l.a.11.	H	F	CH ₃
l.a.12.	H	F	C ₂ H ₅
l.a.13.	H	F	CH ₂ -C ₂ H ₅
l.a.14.	H	F	CH(CH ₃) ₂
l.a.15.	H	F	CH ₂ -CH ₂ -(CH ₃) ₂
l.a.16.	H	F	CH ₂ -CH=CH ₂
l.a.17.	H	F	CH ₂ C≡CH
l.a.18.	H	F	CH ₂ C≡C-Br
l.a.19.	F	H	H
l.a.20.	F	H	CH ₃
l.a.21.	F	H	C ₂ H ₅
l.a.22.	F	H	CH ₂ -C ₂ H ₅
l.a.23.	F	H	CH(CH ₃) ₂
l.a.24.	F	H	CH ₂ -CH ₂ -(CH ₃) ₂
l.a.25.	F	H	CH ₂ -CH=CH ₂
l.a.26.	F	H	CH ₂ C≡CH
l.a.27.	F	H	CH ₂ C≡C-Br
l.a.28.	F	F	H
l.a.29.	F	F	CH ₃
l.a.30.	F	F	C ₂ H ₅
l.a.31.	F	F	CH ₂ -C ₂ H ₅
l.a.32.	F	F	CH(CH ₃) ₂
l.a.33.	F	F	CH ₂ -CH ₂ -(CH ₃) ₂
l.a.34.	F	F	CH ₂ -CH=CH ₂
l.a.35.	F	F	CH ₂ C≡CH
l.a.36.	F	F	CH ₂ C≡C-Br
l.a.37.	Cl	H	H
l.a.38.	Cl	H	CH ₃
l.a.39.	Cl	H	C ₂ H ₅
l.a.40.	Cl	H	CH ₂ -C ₂ H ₅
l.a.41.	Cl	H	CH(CH ₃) ₂
l.a.42.	Cl	H	CH ₂ -CH ₂ -(CH ₃) ₂
l.a.43.	Cl	H	CH ₂ -CH=CH ₂
l.a.44.	Cl	H	CH ₂ C≡CH

I.a.45.	Cl	H	CH ₂ C≡C-Br
I.a.46.	Cl	F	H
I.a.47.	Cl	F	CH ₃
I.a.48.	Cl	F	C ₂ H ₅
I.a.49.	Cl	F	CH ₂ -C ₂ H ₅
I.a.50.	Cl	F	CH(CH ₃) ₂
I.a.51.	Cl	F	CH ₂ -CH ₂ -(CH ₃) ₂
I.a.52.	Cl	F	CH ₂ -CH=CH ₂
I.a.53.	Cl	F	CH ₂ C≡CH
I.a.54.	Cl	F	CH ₂ C≡C-Br

Benzoxazinon có công thức I được ưu tiên rất đặc biệt, làm thành phần A, là một phần của hợp phần theo sáng chế, là benzoxazinon có công thức I.a.35 như nêu trên

Theo phương án được ưu tiên đặc biệt của sáng chế, hợp phần hữu dụng cho phương pháp theo sáng chế chứa, làm thành phần A, benzoxazinon có công thức I.a.35.



Dẫn xuất benzoxazinon và hợp phần nêu trên được bộc lộ chi tiết trong đơn yêu cầu cấp Patent Châu Âu 09163242.2, cụ thể là các phần bộc lộ ở các trang 1 đến 7 về các dẫn xuất benzoxazinon và các phần tử thể có thể có của chúng được đưa toàn bộ vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn.

Dẫn xuất benzoxazinon theo sáng chế thường được ứng dụng tốt nhất ở dạng kết hợp với một hoặc nhiều thuốc diệt cỏ khác để thu được sự kiểm soát giống thực vật không mong muốn rộng hơn. Khi được sử dụng ở dạng kết hợp với các thuốc diệt cỏ nhằm đích khác, các hợp chất được yêu cầu bảo hộ của đơn này có thể được phối trộn với thuốc diệt cỏ hoặc các thuốc diệt cỏ còn lại, được trộn thùng với thuốc diệt cỏ hoặc các thuốc diệt cỏ còn lại, hoặc được cấp liên tiếp với thuốc diệt cỏ hoặc các thuốc diệt cỏ còn lại.

Hợp chất diệt cỏ theo sáng chế có thể còn được sử dụng ở dạng kết hợp với các thuốc diệt cỏ bổ sung mà cây thời vụ dung chịu trong tự nhiên đối với nó, hoặc kháng

đôi với nó thông qua việc biểu hiện một hoặc nhiều gen chuyển bổ sung như nêu trên. Một số trong số các thuốc diệt cỏ mà có thể được sử dụng ở dạng kết hợp với các hợp chất theo sáng chế bao gồm sulfonamid như metosulam, flumetsulam, cloransulam-metyl, diclosulam, penoxsulam và florasulam, sulfonylure như chlorimuron, tribenuron, sulfometuron, nicosulfuron, chlorsulfuron, amidosulfuron, triasulfuron, prosulfuron, tritosulfuron, thifensulfuron, sulfosulfuron và metsulfuron, imidazolinones như imazaquin, imazapic, ima-zethapyr, imzapyr, imazamethabenz và imazamox, axit phenoxycarboxylic như 2,4-D, MCPA, dicloprop và mecoprop, axit pyridinyloxyacetic như triclopyr và fluroxypyr, axit carboxylic như clopyralid, picloram, aminopyralid và dicamba, các dinitroanilin như trifluralin, benefin, benfluralin và pendimethalin, cloaxetanilit như alachlor, axetochlor và metolachlor, semicarbazones (các chất ức chế vận chuyển auxin) như cloflurenol và diflufenzopyr, aryloxyphenoxypionat như fluazifop, haloxyfop, diclofop, clodinafop và fenoxaprop và các thuốc diệt cỏ thông thường khác bao gồm glyphosat, glufosinat, axiflofen, bentazon, clomazon, fumiclorac, fluometuron, fomesafen, lactofen, linuron, isoproturon, simazin, norflurazon, paraquat, diuron, diflufenican, picolinafen, cinidon, setoxydim, tralkoxydim, quinmerac, isoxaben, bromoxynil, metribuzin và mesotrion.

Ví dụ, thuốc diệt cỏ chứa dẫn xuất benzoxazinon mà hữu dụng để thực hiện sáng chế có thể được sử dụng ở dạng kết hợp với glyphosat và glufosinat trên các cây trồng thời vụ dung chịu với glyphosat hoặc dung chịu với glufosinat.

Trừ khi đã được bao gồm trong phần bộc lộ ở trên, thuốc diệt cỏ chứa dẫn xuất benzoxazinon mà hữu dụng để thực hiện sáng chế có thể, hơn nữa, được sử dụng ở dạng kết hợp với các hợp chất:

b1) từ nhóm các chất ức chế sinh tổng hợp lipid:

Các thuốc diệt cỏ ACC như alloxydim, alloxydim-natri, butroxydim, clethodim, clodinafop, clodinafop-propargyl, xycloxydim, cyhalofop, cyhalofop-butyl, diclofop, diclofop-metyl, fenoxaprop, fenoxaprop-etyl, fenoxaprop-P, fenoxaprop-P-etyl, fluazifop, fluazifop-butyl, fluazifop-P, fluazifop-P-butyl, haloxyfop, haloxyfop-metyl, haloxyfop-P, haloxyfop-P-metyl, metamifop, pinoxaden, profoxydim, propaquizafop, quizalofop, quizalofop-etyl, quizalofop-tefuryl, quizalofop-P, quizalofop-P-etyl, quizalofop-P-tefuryl, setoxydim, tepraloxymid và tralkoxydim, và các thuốc diệt cỏ

không phải ACC như benfuresat, butylat, xycloat, dalapon, dimepiperat, EPTC, esprocarb, ethofumesat, flupropanat, molinat, orbencarb, pebulat, prosulfocarb, TCA, thio-bencarb, tiocarbazil, triallat và vernolat;

b2) từ nhóm của các chất ức chế ALS:

Các sulfonylure như amidosulfuron, azimsulfuron, bensulfuron, besulfuron, -metyl, chlorimuron, chlorimuron-etyl, chlorsulfuron, cinosulfuron, xyclosulfamuron, ethametsulfuron, etametsulfuron-metyl, etoxysulfuron, flazasulfuron, flucetosulfuron, flupyrsulfuron, flupyrsulfuron-metyl-natri, foramsulfuron, halosulfuron, halosulfuron-metyl, imazosulfuron, iotsulfuron, iotsulfuron-metyl-natri, mesosulfuron, metazosulfuron, metsulfuron, metsulfuron-metyl, nicosulfuron, orthosulfamuron, oxasulfuron, primisulfuron, primisulfuron-metyl, propyrisulfuron, prosulfuron, pyrazosulfuron, pyrazosulfuron-etyl, rimsulfuron, sulfometuron, sulfometuron-metyl, sulfosulfuron, thifensulfuron, thifensulfuron-metyl, triasulfuron, tribenuron, tribenuron-metyl, trifloxy-sulfuron, triflusulfuron, triflusulfuron-metyl và tritosulfuron, các imidazolinon như imazamethabenz, imazamethabenz-metyl, imazamox, imazapic, imazapyr, imazaquin và imazethapyr, thuốc diệt cỏ triazolopyrimidin và sulfonanilit như cloransulam, cloransulam-metyl, diclosulam, flumetsulam, florasulam, metosulam, penoxsulam, pyrimisulfan và pyroxsulam,

Các pyrimidinylbenzoat như bispyribac, bispyribac-natri, pyribenzoxim, pyriftalid, pyriminobac, pyriminobac-metyl, pyrithiobac, pyrithiobac-natri, axit 4-[[[2-[(4,6-dimetoxy-2-pyrimidinyl)oxy]phenyl]metyl]amino]-benzoic-1-metyletyl este (CAS 420138-41-6), propyl este của axit 4-[[[2-[(4,6-dimetoxy-2-pyrimidinyl)oxy]phenyl]metyl]amino]-benzoic (CAS 420138-40-5), N-(4-bromphenyl)-2-[(4,6-dimetoxy-2-pyrimidinyl)oxy] benzenmethanamin (CAS 420138-01-8) và các thuốc diệt cỏ sulfonylaminocarbonyl-triazolinon như flucarbazon, flucarbazon-natri, propoxycarbazon, propoxycarbazon- natri, thiencarbazon và thiencarbazon-metyl. Trong số các chất này, phương án được ưu tiên của sáng chế đề xuất các hợp phần chứa ít nhất một thuốc diệt cỏ imidazolinon;

b3) từ nhóm của các chất ức chế sự quang hợp:

amicarbazon, các chất ức chế của photosystem II, ví dụ thuốc diệt cỏ triazin, bao gồm clotriazin, triazinon, triazindion, metylthiotriazin và pyridazinon như ametryn,

atrazin, chloridazon, cyanazin, desmetryn, dimethametryn, hexazinon, metribuzin, prometon, prometryn, propazin, simazin, simetryn, terbumeton, terbuthylazin, terbutryn và trietazin, aryl ure như clobromuron, clotoluron, cloxuron, dimefuron, diuron, fluometuron, isoproturon, isouron, linuron, metamitron, methabenzthiazuron, metobenzuron, metoxuron, monolinuron, neburon, siduron, tebuthiuron và thiadiazuron, phenyl cacbammat như desmedipham, karbutilat, phenmedipham, phenmedipham-etyl, thuốc diệt cỏ nitril như bromfenoxim, bromoxynil và muối và este của nó, ioxynil và muối và este của nó, các uraxil như bromacil, lenacil và terbacil, và bentazon và bentazon-natri, pyridatre, pyridafol, pentanochlor và propanil và các chất ức chế của photosystem I như diquat, diquat-dibromua, paraquat, paraquat-dichloride và paraquat-dimetilsulfat. Trong số các chất này, phương án được ưu tiên của sáng chế đề xuất các hợp phần chứa ít nhất một thuốc diệt cỏ aryl ure. Trong số các chất này, tương tự phương án được ưu tiên của sáng chế đề xuất các hợp phần chứa ít nhất một triazin thuốc diệt cỏ. Trong số các chất này, tương tự phương án được ưu tiên của sáng chế đề xuất các hợp phần chứa ít nhất một thuốc diệt cỏ nitril;

b4) từ nhóm của các chất ức chế protoporphyrinogen-IX oxidaza:

axiflofen, axiflofen-natri, azafenidin, bencarbazon, benzfendizon, bifenox, butafenacil, carfentrazon, carfentrazon-etyl, chlometoxyfen, cinidon-etyl, fluazolat, flufenpyr, flufenpyr-etyl, flumiclorac, flumiclorac-pentyl, flumioxazin, floglycofen, floglycofen-etyl, fluthiacet, fluthiacet-metyl, fomesafen, halosafen, lactofen, oxadiargyl, oxadiazon, oxyflofen, pentoxazon, profluazol, pyraclonil, pyraflufen, pyraflufen-etyl, saflufenacil, sulfentrazon, thidiazimin, etyl [3-[2-clo-4-flo-5-(1-metyl-6-triflometyl-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidin-3-yl)phenoxy]-2-pyridyloxy]axetat (CAS 353292-31-6; S-3100), N-etyl-3-(2,6-diclo-4-triflometylphenoxy)-5-metyl-1*H*-pyrazol-1-carboxamit (CAS 452098-92-9), N-tetrahydrofurfuryl-3-(2,6-diclo-4-triflometylphenoxy)-5-metyl-1*H*-pyrazol-1-carboxamit (CAS 915396-43-9), N-etyl-3-(2-clo-6-flo-4-triflometylphenoxy)-5-metyl-1*H*-pyrazol-1-carboxamit (CAS 452099-05-7), N-tetrahydrofurfuryl-3-(2-clo-6-flo-4-triflometylphenoxy)-5-metyl-1*H*-pyrazol-1-carboxamit (CAS 45100-03-7) và 3-[7-flo-3-oxo-4-(prop-2-ynyl)-3,4-dihydro-2*H*-benzo[1,4]oxazin-6-yl]-1,5-dimetyl-6-thioxo-[1,3,5]triazinan-2,4-dion;

b5) từ nhóm của các thuốc diệt cỏ tẩy trắng:

Các chất ức chế PDS: beflubutamid, diflufenican, fluridon, flurochloridon, flurtamone, norflurazon, picolinafen, và 4-(3-triflometylphenoxy)-2-(4-triflometylphenyl)pyrimidin (CAS 180608-33-7), các chất ức chế HPPD: benzobixy-clon, benzofenap, isoxaflutol, mesotrion, pyrasulfotol, pyrazolynat, pyrazoxyfen, sulcotrion, tefuryltrion, tembotrion, topramezon và bixyclopyron, chất tẩy trắng, đích chưa biết: aclonifen, amitrol, clomazon và flumeturon;

b6) từ nhóm của các chất ức chế EPSP syntaza:

glyphosat, glyphosat-isopropylamoni và glyphosat-trimesium (sulfosat);

b7) từ nhóm của các chất ức chế glutamin syntaza:

bilanaphos (bialaphos), bilanaphos-natri, glufosinat, glufosinat-P và glufosinat-amoni;

b8) từ nhóm của các chất ức chế DHP syntaza:

asulam;

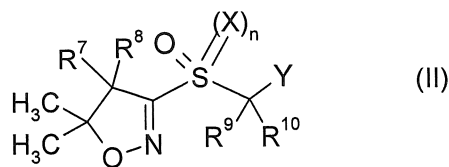
b9) từ nhóm của các chất ức chế mitoz:

các hợp chất của nhóm K1: dinitroanilin như benfluralin, butralin, dinitramin, ethalfluralin, fluchloralin, oryzalin, pendimethalin, prodiamin và trifluralin, phosphoramidates như amiprofos, amiprofos-metyl, và butamiphos, thuốc diệt cỏ axit benzoic như chlorthal, chlorthal-dimetyl, các pyridin như dithiopyr và thiazopyr, benzamit như propyzamit và tebutam; các hợp chất của nhóm K2: chlorpropham, propham và carbetamit, trong số các chất này, các hợp chất của nhóm K1, cụ thể là dinitroanilin là được ưu tiên;

b10) từ nhóm của các chất ức chế VLCFA:

cloaxetamit như axetochlor, alachlor, butachlor, dimethachlor, dimethenamid, dimethenamid-P, metazachlor, metolachlor, metolachlor-S, pethoxamid, pretilachlor, propachlor, propisochlor và thenylchlor, oxyaxetanilit như flufenacet và mefenacet, axetanilit như diphenamid, naproanilide và napropamit, tetrazolinones such fentrazamit, và các thuốc diệt cỏ khác như anilofos, cafenstrole, fenoxasulfon, ipfencarbazon, piperophos, pyroxasulfon và

hợp chất isoxazolin có công thức II,



trong đó $R^7, R^8, R^9, R^{10}, W, Z$ và n có các nghĩa nêu dưới đây:

R^7, R^8, R^9, R^{10} độc lập với nhau là hydro, halogen hoặc C_1 - C_4 -alkyl;

X oxy hoặc NH;

Y phenyl hoặc heteroxyclyl một vòng có 5, 6, 7, 8, 9 hoặc 10 cạnh chứa, ngoài thành phần cacbon trong vòng một, hai hoặc ba nguyên tử khác loại giống nhau hoặc khác nhau được chọn từ oxy, nitơ và lưu huỳnh làm các thành phần vòng, trong đó phenyl và heteroxyclyl là không được thể hoặc mang 1, 2 hoặc 3 phần tử thể R^{yy} được chọn từ halogen, C_1 - C_4 -alkyl, C_1 - C_4 -alkoxy, C_1 - C_4 -haloalkyl và C_1 - C_4 -haloalkoxy;

tốt hơn là phenyl hoặc heteroxyclyl thơm có 5 hoặc 6 cạnh (hetaryl) mà có chứa, ngoài thành phần vòng cacbon, một, hai hoặc ba nguyên tử nitơ làm các thành phần vòng, trong đó phenyl và hetaryl là không được thể hoặc mang 1, 2 hoặc 3 phần tử thể R^{yy} ; và

n bằng không hoặc một;

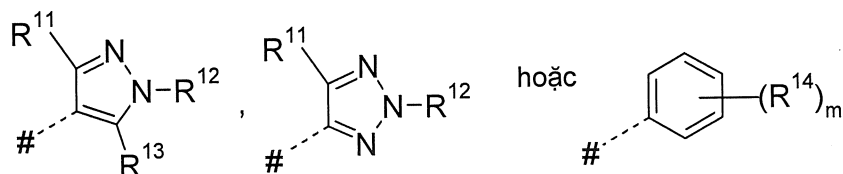
trong số các hợp chất isoxazolin có công thức II, ưu tiên được đưa ra là các hợp chất isoxazolin có công thức II, trong đó

R^7, R^8, R^9, R^{10} độc lập với nhau là H, F, Cl hoặc metyl;

X là oxy;

n bằng 0 hoặc 1; và

Y là phenyl, pyrazolyl hoặc 1,2,3-triazolyl, trong đó ba gốc được nêu cuối cùng là không được thể hoặc mang một, hai hoặc ba phần tử thể R^{yy} , đặc biệt là một trong số các gốc sau



trong đó

R^{11} là halogen, C₁-C₄-alkyl hoặc C₁-C₄-haloalkyl;

R^{12} là C₁-C₄-alkyl;

R^{13} là halogen, C₁-C₄-alkoxy hoặc C₁-C₄-haloalkoxy;

R^{14} là halogen, C₁-C₄-alkyl, C₁-C₄-haloalkyl hoặc C₁-C₄-haloalkoxy;

m bằng 0, 1, 2 hoặc 3; và

biểu thị điểm gắn vào nhóm $CR^{13}R^{14}$;

trong số các hợp chất isoxazolin có công thức II, được ưu tiên đặc biệt là các hợp chất isoxazolin có công thức II, trong đó

R^7 là hydro;

R^8 là flo;

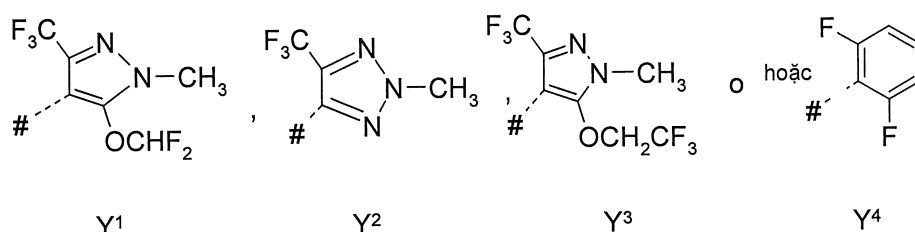
R^9 là hydro hoặc flo;

R^{10} là hydro hoặc flo;

X là oxy;

Y là một trong số các gốc có công thức Y^1 , Y^2 , Y^3 hoặc

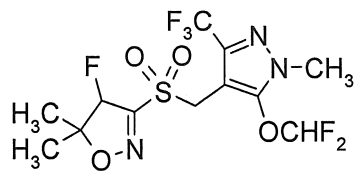
Y^4



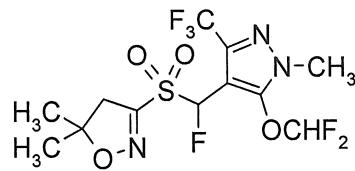
trong đó # biểu thị điểm gắn vào nhóm CR^9R^{10} ;

n bằng 0 hoặc 1, cụ thể là 1; và

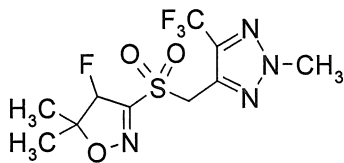
trong số các chất này, được ưu tiên đặc biệt là các hợp chất isoxazolin có công thức II.1, II.2, II.3, II.4, II.5, II.6, II.7, II.8 và II.9



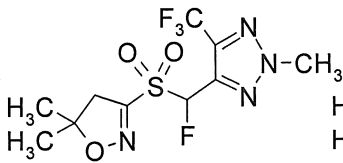
II.1



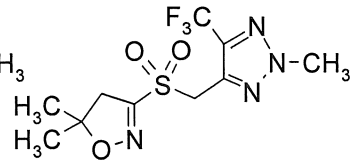
II.2



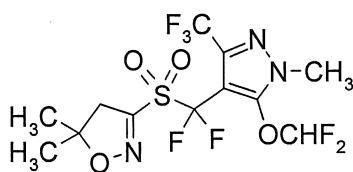
II.3



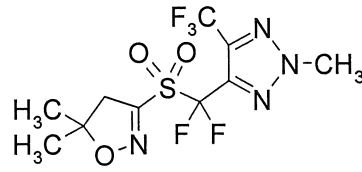
II.4



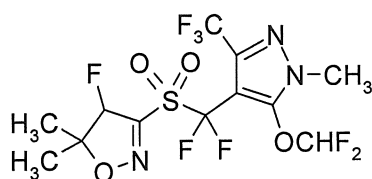
II.5



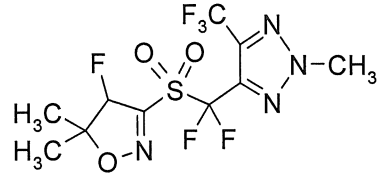
II.6



II.7



II.8



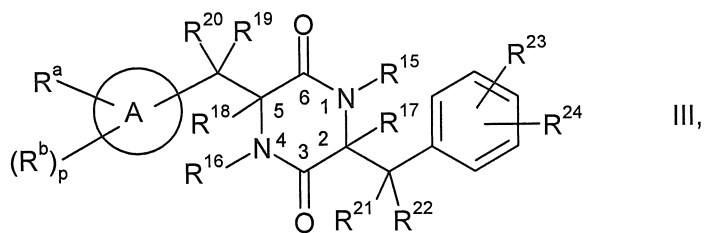
II.9

các hợp chất isoxazolin có công thức II đã được biết đến trong tình trạng kỹ thuật này, ví dụ từ WO 2006/024820, WO 2006/037945, WO 2007/071900 và WO 2007/096576;

trong số các chất ức chế VLCFA, ưu tiên được đưa ra là cloaxetamit và oxyaxetamit, đặc biệt là đến pyroxasulfon;

b11) từ nhóm của các chất ức chế sinh tổng hợp xenluloza:

chlorthiamid, dichlobenil, flupoxam, isoxaben, 1-xyclohexyl-5-pentafluorophenyl-1⁴-[1,2,4,6]thiatriazin-3-ylamin và các hợp chất piperazin có công thức III,



trong đó

- A là phenyl hoặc pyridyl trong đó R^a được gắn vào vị trí ortho vào điểm gắn của A vào nguyên tử cacbon;
- R^a là CN, NO_2 , $\text{C}_1\text{-C}_4\text{-alkyl}$, $\text{D-C}_3\text{-C}_6\text{-xycloalkyl}$, $\text{C}_1\text{-C}_4\text{-haloalkyl}$, $\text{C}_1\text{-C}_4\text{-alkoxy}$, $\text{C}_1\text{-C}_4\text{-haloalkoxy}$, $\text{O-D-C}_3\text{-C}_6\text{-xycloalkyl}$, $\text{S(O)}_q\text{R}^y$, $\text{C}_2\text{-C}_6\text{-alkenyl}$, $\text{D-C}_3\text{-C}_6\text{-xycloalkenyl}$, $\text{C}_3\text{-C}_6\text{-alkenyloxy}$, $\text{C}_2\text{-C}_6\text{-alkynyl}$, $\text{C}_3\text{-C}_6\text{-alkynyloxy}$, $\text{NR}^{\text{A}}\text{R}^{\text{B}}$, tri- $\text{C}_1\text{-C}_4\text{-alkylsilyl}$, $\text{D-C(=O)-R}^{\text{a1}}$, $\text{D-P(=O)(R}^{\text{a1}}\text{)}_2$, phenyl, naphthyl, dị vòng một vòng có 3 đến 7 cạnh hoặc dị vòng no, không no hoặc thơm có 9 đến 10 cạnh được gắn qua nguyên tử carbon hoặc nitơ, mà có chứa 1, 2, 3 hoặc 4 nguyên tử khác loại được chọn từ nhóm bao gồm O, N và S, và mà có thể được thay thế một phần hoặc toàn bộ bằng các nhóm R^{aa} và/hoặc R^{a1} , và, nếu R^a được gắn vào nguyên tử cacbon, ngoài ra halogen;
- R^y là $\text{C}_1\text{-C}_6\text{-alkyl}$, $\text{C}_3\text{-C}_4\text{-alkenyl}$, $\text{C}_3\text{-C}_4\text{-alkynyl}$, $\text{NR}^{\text{A}}\text{R}^{\text{B}}$ hoặc $\text{C}_1\text{-C}_4\text{-haloalkyl}$ và q bằng 0, 1 hoặc 2;
- $\text{R}^{\text{A}}, \text{R}^{\text{B}}$ độc lập với nhau là hydro, $\text{C}_1\text{-C}_6\text{-alkyl}$, $\text{C}_3\text{-C}_6\text{-alkenyl}$ và $\text{C}_3\text{-C}_6\text{-alkynyl}$; cùng với nguyên tử nitơ mà chúng gắn vào, $\text{R}^{\text{A}}, \text{R}^{\text{B}}$ còn có thể tạo thành vòng no, chưa no một phần hoặc hoàn toàn, có năm hoặc 6 cạnh mà, ngoài các nguyên tử cacbon, có thể chứa 1, 2 hoặc 3 nguyên tử khác loại được chọn từ nhóm bao gồm O, N và S, vòng này có thể được thế bằng từ 1 đến 3 nhóm R^{aa} ;
- D là liên kết cộng hóa trị, $\text{C}_1\text{-C}_4\text{-alkylen}$, $\text{C}_2\text{-C}_6\text{-alkenyl}$ hoặc $\text{C}_2\text{-C}_6\text{-alkynyl}$;

R^{a1} là hydro, OH, C_1 - C_8 -Alkyl, C_1 - C_4 -haloalkyl, C_3 - C_6 -xycloalkyl, C_2 - C_8 -alkenyl, C_5 - C_6 -xycloalkenyl, C_2 - C_8 -alkynyl, C_1 - C_6 -alkoxy, C_1 - C_4 -haloalkoxy, C_3 - C_8 -alkenyloxy, C_3 - C_8 -alkynyloxy, $NR^A R^B$, C_1 - C_6 -alkoxyamino, C_1 - C_6 -alkylsulfonylamino, C_1 - C_6 -alkylaminosulfonylamino, [di- $(C_1$ - C_6)alkylamino]sulfonylamino, C_3 - C_6 -alkenylamino, C_3 - C_6 -alkynylamino, N- $(C_2$ - C_6 -alkenyl)-N- $(C_1$ - C_6 -alkyl)amino, N- $(C_2$ - C_6 -alkynyl)-N- $(C_1$ - C_6 -alkyl)amino, N- $(C_1$ - C_6 -alkoxy)-N- $(C_1$ - C_6 -alkyl)amino, N- $(C_2$ - C_6 -alkenyl)-N- $(C_1$ - C_6 -alkoxy)amino, N- $(C_2$ - C_6 -alkynyl)-N- $(C_1$ - C_6 -alkoxy)-amino, C_1 - C_6 -alkylsulfonyl, tri- C_1 - C_4 -alkylsilyl, phenyl, phenoxy, phenylamino hoặc dị vòng một vòng có 5 hoặc 6 cạnh hoặc dị vòng hai vòng có 9 hoặc 10 cạnh mà có chứa 1, 2, 3 hoặc 4 nguyên tử khác loại được chọn từ nhóm bao gồm O, N và S, trong đó các nhóm vòng chưa được thế hoặc đã được thế bằng 1, 2, 3 hoặc 4 nhóm R^{aa} ;

R^{aa} là halogen, OH, CN, NO_2 , C_1 - C_4 -alkyl, C_1 - C_4 -haloalkyl, C_1 - C_4 -alkoxy, C_1 - C_4 -haloalkoxy, $S(O)_q R^y$, D-C(=O)- R^{a1} và tri- C_1 - C_4 -alkylsilyl;

R^b độc lập với nhau là hydro, CN, NO_2 , halogen, C_1 - C_4 -alkyl, C_1 - C_4 -haloalkyl, C_2 - C_4 -alkenyl, C_3 - C_6 -alkynyl, C_1 - C_4 -alkoxy, C_1 - C_4 -haloalkoxy, benzyl hoặc $S(O)_q R^y$,

R^b cùng với nhóm R^a hoặc R^b được gắn vào nguyên tử vòng liền kề còn có thể tạo thành vòng no hoặc chưa no một phần hoặc hoàn toàn có 5 hoặc 6 cạnh mà, ngoài các nguyên tử cacbon, có thể chứa 1, 2 hoặc 3 nguyên tử khác loại được chọn từ nhóm bao gồm O, N và S, vòng này có thể được thế một phần hoặc toàn bộ bằng R^{aa} ;

p bằng 0, 1, 2 hoặc 3;

R^{15} là hydro, OH, CN, C_1 - C_{12} -alkyl, C_3 - C_{12} -alkenyl, C_3 - C_{12} -alkynyl, C_1 - C_4 -alkoxy, C_3 - C_6 -xycloalkyl, C_5 - C_6 -xycloalkenyl, $NR^A R^B$,

$S(O)_nR^y$, $S(O)_nNR^{AB}$, $C(=O)R^{25}$, $CONR^{AB}$, phenyl hoặc dị vòng thơm một vòng có 5 hoặc 6 cạnh hoặc hai vòng có 9 hoặc 10 cạnh mà có chứa 1, 2, 3 hoặc 4 nguyên tử khác loại được chọn từ nhóm bao gồm O, N và S, trong đó nhóm vòng được gắn qua D^1 và chưa được thế hoặc được thế bằng 1, 2, 3 hoặc 4 nhóm R^{aa} , và cả nhóm được thế bằng R^{aa} một phần hoặc hoàn toàn sau đây: C_1 - C_4 -alkyl, C_3 - C_4 -alkenyl, C_3 - C_4 -alkynyl, C_1 - C_4 -alkoxy, C_3 - C_6 -xycloalkyl, C_5 - C_6 -xycloalkenyl, NR^{AB} , $S(O)_nR^y$, $S(O)_nNR^{AB}$, $C(=O)R^{25}$, $CONR^{AB}$;

tốt hơn là là hydro, OH, CN, C_1 - C_{12} -alkyl, C_3 - C_{12} -alkenyl, C_3 - C_{12} -alkynyl, C_1 - C_4 -alkoxy, C_3 - C_6 -xycloalkyl, C_5 - C_6 -xycloalkenyl, NR^{AB} , $S(O)_nR^y$, $S(O)_nNR^{AB}$, $C(=O)R^{25}$, $CONR^{AB}$, phenyl hoặc dị vòng thơm một vòng có 5 hoặc 6 cạnh hoặc hai vòng có 9 hoặc 10 cạnh mà có chứa 1, 2, 3 hoặc 4 nguyên tử khác loại được chọn từ nhóm bao gồm O, N và S, trong đó nhóm vòng được gắn qua D^1 và chưa được thế hoặc được thế bằng 1, 2, 3 hoặc 4 nhóm R^{aa} , và cả nhóm được thế bằng R^{aa} một phần hoặc hoàn toàn sau đây: C_1 - C_4 -alkyl, C_3 - C_4 -alkenyl và C_3 - C_4 -alkynyl;

R^{25} là hydro, C_1 - C_4 -alkyl, C_1 - C_4 -haloalkyl, C_1 - C_4 -alkoxy hoặc C_1 - C_4 -haloalkoxy;

D^1 là carbonyl hoặc nhóm D;

trong đó trong nhóm R^{15} , R^a và các phần tử thế phụ của chúng mạch cacbon và/hoặc nhóm vòng có thể mang 1, 2, 3 hoặc 4 phần tử thế R^{aa} và/hoặc R^{a1} ;

R^6 là C_1 - C_4 -alkyl, C_3 - C_4 -alkenyl hoặc C_3 - C_4 -alkynyl;

R^{17} là OH, NH_2 , C_1 - C_4 -alkyl, C_3 - C_6 -xycloalkyl, C_3 - C_6 -alkenyl, C_3 - C_6 -alkynyl, C_1 - C_4 -hydroxyalkyl, C_1 - C_4 -cyanoalkyl, C_1 - C_4 -haloalkyl, C_1 - C_4 -alkoxy- C_1 - C_4 -alkyl hoặc $C(=O)R^{25}$;

R^{18} là hydro, halogen, C_1 - C_4 -alkyl hoặc C_1 - C_4 -haloalkyl, hoặc R^{18} và R^{19} cùng nhau là liên kết cộng hóa trị;

$R^{19}, R^{20}, R^{21}, R^{21}$ độc lập với nhau là hydro, halogen, OH, CN, NO_2 , C_1 - C_4 -alkyl, C_1 - C_4 -haloalkyl, C_2 - C_6 -alkenyl, C_2 - C_6 -alkynyl, C_1 - C_4 -alkoxy, C_1 - C_4 -haloalkoxy, C_3 - C_6 -xycloalkyl, C_3 - C_6 -xycloalkenyl và C_3 - C_6 -xycloalkynyl;

R^{23}, R^{24} độc lập với nhau là hydro, halogen, OH, haloalkyl, $NR^A R^B$, $NR^A C(O)R^{26}$, CN, NO_2 , C_1 - C_4 -alkyl, C_1 - C_4 -haloalkyl, C_2 - C_4 -alkenyl, C_3 - C_6 -alkynyl, C_1 - C_4 -alkoxy, C_1 - C_4 -haloalkoxy, $O-C(O)R^{26}$, phenoxy hoặc benzyloxy, trong đó trong nhóm R^{23} và R^{24} mạch cacbon và/hoặc nhóm vòng có thể mang 1, 2, 3 hoặc 4 phân tử thể R^{aa} ;

R^{26} là C_1 - C_4 -alkyl hoặc $NR^A R^B$;

trong số các hợp chất isoxazolin của các hợp chất piperazin có công thức III, ưu tiên được đưa ra các hợp chất piperazincó công thức III, trong đó

A là phenyl hoặc pyridyl trong đó R^a được gắn vào vị trí ortho vào điểm gắn của A vào nguyên tử cacbon;

R^a là CN, NO_2 , C_1 - C_4 -alkyl, C_1 - C_4 -haloalkyl, C_1 - C_4 -alkoxy, C_1 - C_4 -haloalkoxy hoặc $D-C(=O)-R^{a1}$;

R^y là C_1 - C_6 -alkyl, C_3 - C_4 -alkenyl, C_3 - C_4 -alkynyl, $NR^A R^B$ hoặc C_1 - C_4 -haloalkyl và q bằng 0, 1 hoặc 2;

R^A, R^B độc lập với nhau là hydro, C_1 - C_6 -alkyl, C_3 - C_6 -alkenyl và C_3 - C_6 -alkynyl; cùng với nguyên tử nitơ mà chúng gắn vào, R^A, R^B còn có thể tạo thành vòng no, chưa no một phần hoặc hoàn toàn, có năm hoặc 6 cạnh mà, ngoài các nguyên tử cacbon, có thể chứa 1, 2 hoặc 3 nguyên tử khác loại được chọn từ nhóm bao gồm O, N và S, vòng này có thể được thế bằng từ 1 đến 3 nhóm R^{aa} ;

D là liên kết cộng hóa trị hoặc C_1 - C_4 -alkylen;

R^{a1} là hydro, OH, C_1 - C_8 -Alkyl, C_1 - C_4 -haloalkyl, C_3 - C_6 -xycloalkyl;

R^{aa} là halogen, OH, CN, NO_2 , C_1 - C_4 -alkyl, C_1 - C_4 -haloalkyl, C_1 - C_4 -alkoxy, C_1 - C_4 -haloalkoxy, $S(O)_q R^y$, $D-C(=O)-R^{a1}$ và tri- C_1 - C_4 -alkylsilyl;

R^b độc lập với nhau là CN, NO₂, halogen, C₁-C₄-alkyl, C₁-C₄-haloalkyl, C₂-C₄-alkenyl, C₃-C₆-alkynyl, C₁-C₄-alkoxy, C₁-C₄-haloalkoxy, benzyl hoặc S(O)_qR^y,

R^b cùng với nhóm R^a hoặc R^b được gắn vào nguyên tử vòng liên kề còn có thể tạo thành vòng no hoặc chưa no một phần hoặc hoàn toàn có 5 hoặc 6 cạnh mà, ngoài các nguyên tử cacbon, có thể chứa 1, 2 hoặc 3 nguyên tử khác loại được chọn từ nhóm bao gồm O, N và S, vòng này có thể được thế một phần hoặc toàn bộ bằng R^{aa} ;

p là 0 hoặc 1;

R^{15} là hydro, C₁-C₁₂-alkyl, C₃-C₁₂-alkenyl, C₃-C₁₂-alkynyl, C₁-C₄-alkoxy hoặc C(=O)R²⁵, mà có thể được thế một phần hoặc hoàn toàn bằng nhóm R^{aa} ;

tốt hơn là là hydro, C₁-C₁₂-alkyl, C₃-C₁₂-alkenyl, C₃-C₁₂-alkynyl, C₁-C₄-alkoxy hoặc C(=O)R²⁵;

R^{25} là hydro, C₁-C₄-alkyl, C₁-C₄-haloalkyl, C₁-C₄-alkoxy hoặc C₁-C₄-haloalkoxy;

trong đó trong nhóm R^{15} , R^a và các phần tử thế phụ của chúng mạch cacbon và/hoặc nhóm vòng có thể mang 1, 2, 3 hoặc 4 phần tử thế R^{aa} và/hoặc R^{a1} ;

R^{16} là C₁-C₄-alkyl;

R^{17} là OH, NH₂, C₁-C₄-alkyl, C₃-C₆-xycloalkyl, C₁-C₄-haloalkyl hoặc C(=O)R²⁵;

R^{18} là hydro, hoặc R^{18} và R^{19} cùng nhau là liên kết cộng hóa trị;

R^{19} , R^{20} , R^{21} , R^{21} độc lập với nhau là hydro;

R^{23} , R^{24} độc lập với nhau là hydro, halogen hoặc OH;

b12) từ nhóm của các thuốc diệt cỏ khử liên hợp:

dinoseb, dinoterb và DNOC và muối của nó;

b13) từ nhóm của các thuốc diệt cỏ auxin:

2,4-D và muối và este của nó, 2,4-DB và muối và este của nó, aminopyralid và muối của nó như aminopyralid-tris(2-hydroxypropyl)amoni và este của nó, benazolin, benazolin-ethyl, chloramben và muối và este của nó, clomeprop, clopyralid và muối và este của nó, dicamba và muối và este của nó, dicloprop và muối và este của nó, dicloprop-P và muối và este của nó, fluroxypyr, fluroxypyr-butometyl, fluroxypyr-meptyl, MCPA và muối và este của nó, MCPA-thioethyl, MCPB và muối và este của nó, mecoprop và muối và este của nó, mecoprop-P và muối và este của nó, picloram và muối và este của nó, quinclorac, quinmerac, TBA (2,3,6) và muối và este của nó, triclopyr và muối và este của nó, và aminoxyclopyrachlor và muối và este của nó;

b14) từ nhóm của các chất ức chế vận chuyển auxin: diflufenzopyr, diflufenzopyr-natri, naptalam và naptalam-natri;

b15) từ nhóm của các thuốc diệt cỏ khác: brombutide, cloflurenol, cloflurenol-metyl, cinmetylin, cumyluron, dalapon, dazomet, difenzoquat, difenzoquat-metilsulfat, dimethipin, DSMA, dymron, endothal và muối của nó, etobenzanid, flamprop, flamprop-isopropyl, flamprop-metyl, flamprop-M-isopropyl, flamprop-M-metyl, flurenol, flurenol-butyl, flurprimidol, fosamin, fosamin-amoni, indanofan, indaziflam, maleic hydrazit, mefluidit, metam, metyl azit, metyl bromua, metyl-dymron, metyl iodua, MSMA, axit oleic, oxaziclomefon, axit pelargonic, pyributicarb, quinoclamín, triaziflam, tridiphan và 6-clo-3-(2-xyclopropyl-6-metylphenoxy)-4-pyridazinol (CAS 499223-49-3) và muối và este của nó.

Hơn nữa, có thể hữu ích để sử dụng benzoxazinon có công thức I kết hợp với các chất an toàn. Các chất an toàn là các hợp chất hóa học mà ngăn ngừa hoặc làm giảm sự hư hại đối với cây trồng hữu ích mà không có tác động lớn đến tác dụng diệt cỏ của benzoxazinon có công thức I đối với các cây trồng không mong muốn. Chúng có thể được áp dụng trước khi gieo (ví dụ đối với việc xử lý hạt giống, chồi cây hoặc cây giống con) hoặc áp dụng trước khi nảy mầm hoặc áp dụng sau khi nảy mầm của cây hữu ích.

Hơn nữa, các chất an toàn C. benzoxazinon I và/hoặc các thuốc diệt cỏ B có thể được sử dụng đồng thời hoặc liên tiếp.

Các chất an toàn thích hợp là ví dụ axit (quinolin-8-oxy)axetic, axit 1-phenyl-5-haloalkyl-1H-1,2,4-triazol-3-carboxylic, axit 1-phenyl-4,5-dihydro-5-alkyl-1H-

pyrazol-3,5-dicarboxylic, axit 4,5-dihydro-5,5-diaryl-3-isoxazol carboxylic, dicloaxetamit, alpha-oximinophenylaxetonitril, axetophenonoxim, 4,6-dihalo-2-phenylpyrimidin, N-[[4-(aminocarbonyl)phenyl]sulfonyl]-2-benzoic amit, 1,8-naphtalic anhydrit, axit 2-halo-4-(haloalkyl)-5-thiazol carboxylic, phosphorthiolat và N-alkyl-O-phenylcacbamat và các muối có thể chấp nhận trong nông nghiệp của chúng và các dẫn xuất có thể chấp nhận trong nông nghiệp của chúng như các amit, các este, và các thioeste, với điều kiện là chúng có nhóm axit.

Các ví dụ về chất an toàn C được ưu tiên là benoxacor, cloquintocet, cyometrinil, xyprosulfamit, diclormid, dixyclonon, dietholat, fenclorazol, fenclorim, flurazol, fluxofenim, furilazol, isoxadifen, mefenpyr, mephenat, naphtalic anhydrit, oxabetrinil, 4-(dicloaxetyl)-1-oxa-4-azaspiro[4,5]decan (MON4660, CAS 71526-07-3) và 2,2,5-trimetyl-3-(dicloaxetyl)-1,3-oxazolidin (R-29148, CAS 52836-31-4), và N-(2-Metoxybenzoyl)-4-[(metylaminocarbonyl)amino]benzensulfonamit (CAS 129531-12-0).

Các chất an toàn C được ưu tiên đặc biệt là benoxacor, cloquintocet, xyprosulfamit, diclormid, fenclorazol, fenclorim, flurazol, fluxofenim, furilazol, isoxadifen, mefenpyr, naphtalic anhydrit, oxabetrinil, 4-(dicloaxetyl)-1-oxa-4-azaspiro[4,5]decan (MON4660, CAS 71526-07-3) và 2,2,5-trimetyl-3-(dicloaxetyl)-1,3-oxazolidin (R-29148, CAS 52836-31-4), và N-(2-Metoxybenzoyl)-4-[(metylaminocarbonyl)amino]benzensulfonamit (CAS 129531-12-0).

□ ác chất an toàn C được ưu tiên đặc biệt là benoxacor, cloquintocet, xyprosulfamit, diclormid, fenclorazol, fenclorim, furilazol, isoxadifen, mefenpyr, 4-(dicloaxetyl)-1-oxa-4-azaspiro[4,5]decan (MON4660, CAS 71526-07-3) và 2,2,5-trimetyl-3-(dicloaxetyl)-1,3-oxazolidin (R-29148, CAS 52836-31-4), và N-(2-Metoxybenzoyl)-4-[(metylaminocarbonyl)amino]benzensulfonamit (CAS 129531-12-0).

Các chất an toàn C được ưu tiên đặc biệt, mà, làm thành phần C. là phần tử cấu thành của hợp phần theo sáng chế là các chất an toàn C như nêu trên; cụ thể là các chất an toàn C.1 - C.13 được liệt kê dưới đây trong bảng C:

Bảng C

	Chất an toàn C		
	C.1 benoxacor		
	C.2 cloquintocet		
	C.3 xyprosulfamid		
	C.4 diclormid		
	C.5 fenclorazol		
	C.6 fenclorim		
	C.7 furilazol		
	C.8 isoxadifen		
	C.9 mefenpyr		
	C.10 anhydrit axit naphthalic		
	C.11 4-(dicloaxetyl)-1-oxa-4-azaspiro[4,5]decan	(MON4660,	CAS
	71526-07-3)		
	C.12 2,2,5-trimetyl-3-(diclo-axetyl)-1,3-oxazolidin	(R-29148,	CAS
	52836-31-4)		
	C.13 N-(2-Metoxycarbonyl)-4- [(metylaminocarbonyl)amino]benzensulfonamid	(CAS 129531-12-0)	

Hoạt chất B thuộc các nhóm b1) đến b15) và hoạt chất C là thuốc diệt cỏ và chất an toàn đã biết, xem, ví dụ, Bảng trích yếu tên thông dụng của thuốc diệt loài gây hại (The Compendium of Pesticide Common Names) (<http://www.alanwood.net/pesticides/>); Farm Chemicals Handbook 2000 volume 86, Meister Publishing Company, 2000; B. Hock, C. Fedtke, R. R. Schmidt, Herbicide [Herbicides], Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1995; W. H. Ahrens, Herbicide Handbook, 7th edition, Weed Science Society of America, 1994; và K. K. Hatzios, Herbicide Handbook, Supplement for the 7th edition, Weed Science Society of America, 1998. 2,2,5-Trimetyl-3-(dicloaxetyl)-1,3-oxazolidin [CAS No. 52836-31-4] còn được gọi là R-29148. 4-(Dicloaxetyl)-1-oxa-4-azaspiro[4,5]decan [CAS No. 71526-07-3] còn được gọi là AD-67 và MON 4660. Các hợp chất có hoạt tính diệt cỏ khác là đã biết từ WO 96/26202, WO 97/41116, WO 97/41117, WO 97/41118 và WO 01/83459 và cả từ ấn phẩm W. Krämer et al. (ed.) "Modern Crop Protection Compounds", Vol. 1, Wiley VCH, 2007 và các tài liệu được trích dẫn trong đó.

Thông thường được ưu tiên là sử dụng các hợp chất theo sáng chế kết hợp với các thuốc diệt cỏ mà có tính chọn lọc cho cây trồng thời vụ đang được xử lý và mà bù cho một loạt cỏ dại được khống chế bởi các hợp chất này ở tỷ lệ áp dụng được sử

dụng. Thông thường được ưu tiên là sử dụng các hợp chất theo sáng chế và các thuốc diệt cỏ bổ sung khác đồng thời, hoặc là chế phẩm kết hợp hoặc là hỗn hợp trộn thùng.

Thuật ngữ “axit nucleic mut-PPO” chỉ axit nucleic PPO có trình tự được gây đột biến từ axit nucleic PPO kiểu dại mà mang lại sự dung chịu thuốc diệt cỏ chứa dẫn xuất benzoxazinon đối với cây trồng trong đó nó được biểu hiện. Hơn nữa, thuật ngữ “protoporphyrinogen oxidaza đã được gây đột biến (mut-PPO)” chỉ sự thay thế của axit amin của các trình tự ban đầu kiểu dại SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, hoặc 46, hoặc biến thể, dẫn xuất, đồng đẳng, ortholog, hoặc paralog của nó, với axit amin khác. Cụm từ "axit amin được gây đột biến" sẽ được sử dụng dưới đây chỉ axit amin mà được thay thế bằng axit amin khác, nhờ đó chỉ ra điểm đột biến trong trình tự protein ban đầu.

Theo phương án được ưu tiên, trình tự nucleotit PPO bao gồm trình tự của SEQ ID NO: 1, 25, 37 hoặc 39 hoặc biến thể hoặc dẫn xuất của chúng.

Hơn nữa, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng các trình tự nucleotit PPO bao gồm các homolog, paralog và ortholog của SEQ ID NO: 1, 25, 37 hoặc 39 như được xác định dưới đây

Thuật ngữ "biến thể" liên quan đến trình tự (ví dụ, polypeptit hoặc trình tự axit nucleic như – ví dụ – trình tự nucleotit điều biến sự phiên mã theo sáng chế) được dùng có nghĩa là các trình tự gần như là tương tự. Đối với các trình tự nucleotit chứa khung đọc mở, các biến thể bao gồm các trình tự biến thể mà, do sự thoái hóa của mã gen, mã hóa trình tự axit amin giống hệt của protein tự nhiên. Biến thể alen có trong tự nhiên như các biến thể này có thể được xác định với việc sử dụng các công nghệ sinh học phân tử đã được biết rõ, như, ví dụ, với phản ứng chuỗi polymeraza (PCR) và các kỹ thuật lai hóa. Các trình tự biến thể nucleotit còn bao gồm các trình tự nucleotit thu được bằng cách tổng hợp, như các trình tự nucleotit được tạo ra, ví dụ, bằng cách sử dụng phát sinh đột biến ở điểm trực tiếp và đối với các khung đọc mở, mã hóa protein tự nhiên, cũng như khung đọc mở mã hóa polypeptit có sự thay thế axit amin liên quan đến protein tự nhiên. Nói chung, các biến thể trình tự nucleotit theo sáng chế sẽ có ít nhất 30, 40, 50, 60, đến 70%, ví dụ, tốt hơn là 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, đến 79%, thông thường ít nhất là 80%, ví dụ, 81%-84%, ít nhất 85%, ví dụ, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, to 98% và 99% nucle-

otit “độ đồng nhất về trình tự” với trình tự nucleotit của SEQ ID NO: SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, hoặc 45. Thuật ngữ "biến thể" polypeptit được dùng để chỉ polypeptit thu được từ protein của SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, hoặc 46 bằng cách khuyết đoạn (còn được gọi là cắt cụt) hoặc bổ sung một hoặc nhiều axit amin vào đầu tận N và/hoặc đầu tận C của protein tự nhiên; khuyết đoạn hoặc bổ sung một hoặc nhiều axit amin ở một hoặc nhiều điểm trong protein tự nhiên; hoặc sự thay thế của một hoặc nhiều axit amin ở một hoặc nhiều điểm trong protein tự nhiên. Các biến thể này có thể tạo ra từ, ví dụ, hiện tượng đa hình di truyền hoặc từ thao tác ở người. Các phương pháp để thao tác này thông thường đã biết trong tình trạng kỹ thuật.

Đã nhận ra rằng các phân tử polynucleotit và các polypeptit theo sáng chế bao gồm các phân tử polynucleotit và polypeptit chứa nucleotit hoặc trình tự axit amin mà giống hệt thích hợp với các trình tự nucleotit được nêu trong SEQ ID No: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, hoặc 45, hoặc to trình tự axit amins được nêu trong SEQ ID No: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, hoặc 46. Thuật ngữ "giống hệt thích hợp" được sử dụng trong bản mô tả chỉ axit amin đầu tiên hoặc trình tự nucleotit mà chứa số đủ và tối thiểu gốc axit amin hoặc các nucleotit giống hệt hoặc tương đương (ví dụ, với mạch bên tương tự) với trình tự axit amin hoặc nucleotit thứ hai sao cho trình tự axit amin hoặc nucleotit thứ nhất và thứ hai có miền cấu trúc thông thường và/hoặc hoạt tính chức năng thông thường.

"Độ đồng nhất về trình tự" chỉ mức độ mà hai trình tự ADN hoặc trình tự axit amin được sắp thẳng hàng tối ưu là bất biến trong cửa sổ sắp thẳng hàng của các thành phần, ví dụ, các nucleotit hoặc các axit amin. "Tỷ lệ đồng nhất" đối với các đoạn được sắp thẳng hàng của trình tự thử nghiệm và trình tự tham chiếu là số thành phần giống nhau có ở cả hai trình tự được sắp thẳng hàng chia cho tổng số thành phần trong đoạn trình tự tham chiếu, tức là, toàn bộ trình tự tham chiếu hoặc phần được xác định nhỏ hơn của trình tự tham chiếu. "Tỷ lệ phần trăm đồng nhất" là tỷ lệ đồng nhất nhân với 100. Sự sắp thẳng hàng tối ưu của các trình tự để sắp thẳng hàng cửa sổ so sánh là đã biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này và có thể có thể được thực hiện bằng các công cụ như thuật toán sắp thẳng hàng tương đồng của Smith và

Waterman, thuật toán sắp thẳng hàng tương đồng của Needleman và Wunsch, nghiên cứu phương pháp tương tự của Pearson và Lipman, và tốt hơn là bằng cách thực hiện các thuật toán này bằng máy tính như GAP, BESTFIT, FASTA, và TFASTA có sẵn như là một phần của GCG. Wisconsin Package. (Accelrys Inc. Burlington, Mass.)

Các thuật ngữ "(các) polynucleotit", "(các) trình tự axit nucleic", "(các) trình tự nucleotit", "(các) axit nucleic", "phân tử axit nucleic" được sử dụng thay thế lẫn nhau trong bản mô tả này và chỉ các nucleotit, các ribonucleotit hoặc các deoxyribonucleotit hoặc sự kết hợp của cả hai yếu tố này, ở dạng polyme không phân nhánh có độ dài bất kỳ.

"Các dẫn xuất" của protein bao gồm các peptit, các oligopeptit, các polypeptit, các protein và các enzym có sự thay thế axit amin, khuyết đoạn và/hoặc đoạn ghép liên quan đến protein chưa được biến đổi đang nghiên cứu và có hoạt tính sinh học và chức năng tương tự như protein chưa được biến đổi mà chúng thu được từ protein đó.

"Các homolog" của protein bao gồm các peptit, các oligopeptit, các polypeptit, các protein và các enzym có sự thay thế axit amin, khuyết đoạn và/hoặc đoạn ghép liên quan đến protein chưa được biến đổi đang nghiên cứu và có hoạt tính sinh học và chức năng tương tự như protein chưa được biến đổi mà chúng thu được từ protein đó.

Khuyết đoạn chỉ việc loại bỏ một hoặc nhiều axit amin từ protein.

Đoạn ghép chỉ một hoặc nhiều gốc axit amin được đưa vào vị trí được xác định trước trong protein. Các đoạn ghép có thể bao gồm sự dung hợp đầu tận N và/hoặc đầu tận C cũng như các đoạn ghép nội-trình tự của đơn hoặc đa axit amin. Nói chung, các đoạn ghép trong trình tự axit amin sẽ là nhỏ hơn so với sự dung hợp đầu tận N hoặc C trong khoảng từ 1 đến 10 gốc. Các ví dụ về các protein dung hợp đầu tận N hoặc C hoặc các peptit bao gồm miền liên kết hoặc miền hoạt hóa của yếu tố hoạt hóa phiên mã như được sử dụng trong hệ nấm men hai lai (yeast two-hybrid system), các protein vỏ thể thực khuẩn, (histidin)-6-tag, glutathion S-transferaza-tag, protein A, protein liên kết maltoza, dihydrofolat reductaza, Tag•100 epitop, c-myc epitop, FLAG®-epitop, lacZ, CMP (peptit liên kết calmodulin), HA epitop, protein C epitop và VSV epitop.

Sự thay thế chỉ sự thay thế axit amin của protein bằng axit amin khác có các tính chất tương tự (như tính không ưa nước tương tự, tính ưa nước, tính kháng nguyên, xu hướng tạo thành hoặc phá vỡ các cấu trúc dạng xoắn α hoặc cấu trúc dạng tấm β). Sự

thay thế axit amin thông thường và các gốc đơn, nhưng có thể được hợp lại tùy thuộc vào các cấu trúc chức năng được đặt vào polypeptit và có thể nằm trong khoảng từ 1 đến 10 axit amin; các đoạn ghép thông thường sẽ nằm trong khoảng từ 1 đến 10 gốc axit amin. Sự thay thế axit amin tốt hơn là sự thay thế axit amin bảo toàn. Các bảng thay thế bảo toàn đã được biết rõ trong lĩnh vực (xem ví dụ Creighton (1984) *Proteins*. W.H. Freeman and Company (Eds).

Bảng 2: Các ví dụ về sự thay thế axit amin bảo toàn

Gốc	Sự thay thế bảo toàn	Gốc	Sự thay thế bảo toàn
Ala	Ser	Leu	Ile; Val
Arg	Lys	Lys	Arg; Gln
Asn	Gln; His	Met	Leu; Ile
Asp	Glu	Phe	Met; Leu; Tyr
Gln	Asn	Ser	Thr; Gly
Cys	Ser	Thr	Ser; Val
Glu	Asp	Trp	Tyr
Gly	Pro	Tyr	Trp; Phe
His	Asn; Gln	Val	Ile; Leu
Ile	Leu, Val		

Sự thay thế axit amin, khuyết đoạn và/hoặc đoạn ghép có thể được tạo ra một cách dễ dàng bằng cách sử dụng các kỹ thuật tổng hợp peptit đã biết rõ trong lĩnh vực, như tổng hợp peptit pha rắn và tương tự, hoặc bằng cách thao tác ADN tái tổ hợp. Phương pháp để theo tác các trình tự ADN để tạo ra sự thay thế, lồng vào hoặc khuyết đoạn các biến thể của protein là đã biết rõ trong lĩnh vực. Ví dụ, các kỹ thuật để tạo ra sự đột biến thay thế ở vị trí được xác định trước trong ADN là đã biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực và bao gồm sự phát sinh đột biến M13, sự phát sinh đột biến T7-Gen in vitro (USB, Cleveland, OH), sự phát sinh đột biến QuickChange Site Directed (Stratagene, San Diego, CA), sự phát sinh đột biến được gây ra bởi PCR ở điểm trực tiếp hoặc các phương pháp phát sinh đột biến khác ở điểm trực tiếp.

“Các dẫn xuất” còn bao gồm các peptit, các oligopeptit, các polypeptit mà có thể bao gồm các thay thế axit amin bằng gốc axit amin không có trong tự nhiên, hoặc bổ sung các gốc axit amin không có trong tự nhiên so với trình tự axit amin của dạng protein có trong tự nhiên, như protein cần quan tâm. “Các dẫn xuất” của protein còn

bao gồm các peptit, các oligopeptit, các polypeptit mà bao gồm gốc axit amin được biến đổi có trong tự nhiên (được glycosyl hóa, được axyl hóa, được prenyl hóa, được phosphoryl hóa, được myristoyl hóa, được sulphat hóa, v.v..) hoặc được biến đổi không tự nhiên so với trình tự axit amin của dạng polypeptit có trong tự nhiên. Dẫn xuất còn có thể bao gồm một hoặc nhiều phép thế hoặc bổ sung thành phần không phải axit amin so với trình tự axit amin mà từ đó thu được nó, ví dụ phân tử đưa tin hoặc phối tử khác, liên kết cộng hóa trị hoặc không cộng hóa trị với trình tự axit amin, như phân tử đưa tin mà được liên kết để tạo điều kiện thuận tiện cho sự phát hiện của nó, và gốc axit amin không có trong tự nhiên liên quan đến trình tự axit amin của protein có trong tự nhiên. Hơn nữa, “các dẫn xuất” còn bao gồm sự dung hợp của dạng protein có trong tự nhiên với các peptit được đánh dấu như FLAG, HIS6 hoặc thioredoxin (để xem xét các peptit đánh dấu, xem Terpe, Appl. Microbiol. Biotechnol. 60, 523-533, 2003).

“Ortholog” và “paralog” bao gồm các khái niệm tiến triển được sử dụng để mô tả mối quan hệ thể hệ con của các gen. Paralog là các gen trong cùng loài mà đã được bắt nguồn qua sự phiên bản của gen tổ tiên; ortholog là các gen từ các sinh vật khác nhau mà đã được bắt nguồn thông qua sự hình thành loài, và cũng thu được từ gen thể hệ con thông thường. Danh mục không giới hạn các ví dụ về ortholog này đã được thể hiện trong Bảng 1.

Đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này rằng paralog và ortholog có thể có chung các miền phân biệt neo các gốc axit amin thích hợp ở các vị trí nhất định, như túi liên kết đối với các cơ chất cụ thể hoặc motif liên kết để tương tác với các protein khác.

Thuật ngữ "miền" được dùng để chỉ tập hợp của các axit amin được bảo toàn tại các vị trí nhất định theo sự sắp hàng trình tự của protein có liên quan về mặt tiến hóa. Trong khi axit amin tại các vị trí khác có thể thay đổi giữa các thể tương đồng, thì axit amin được bảo toàn cao tại các vị trí nhất định được dùng để chỉ axit amin cần thiết trong cấu trúc, tính ổn định hoặc hoạt tính của protein. Được xác định thông qua mức bảo toàn cao của chúng ở trình tự sắp hàng của họ thể tương đồng protein, chúng có thể được dùng làm yếu tố nhận dạng để xác định xem liệu polypeptit đang nói đến có thuộc về họ polypeptit đã được xác định trước đó hay không.

Thuật ngữ “motif” hoặc “trình tự liên ứng” được dùng để chỉ vùng bảo toàn ngắn trong trình tự của protein có liên quan về mặt tiến hóa. Motif thường là các phần bảo toàn cao của các miền, nhưng cũng có thể chỉ gồm một phần của miền, hoặc được bố trí ở bên ngoài miền bảo toàn (nếu tất cả các axit amin của motif đều nằm ở bên ngoài miền xác định).

Cơ sở dữ liệu chuyên môn hiện có để nhận diện miền, ví dụ, SMART (Schultz et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 5857-5864; Letunic et al. (2002) Nucleic Acids Res 30, 242-244), InterPro (Mulder et al., (2003) Nucl. Acids. Res. 31, 315-318), Prosite (Bucher and Bairoch (1994), A generalized profile syntax for biomolecular sequences motifs and its function in automatic sequence interpretation. (In) ISMB-94; Proceedings 2nd International Conference on Intelligent System for Molecular Biology. Altman R., Brutlag D., Karp P., Lathrop R., Searls D., Eds., pp53-61, AAAI Press, Menlo Park; Hulo et al., Nucl. Acids. Res. 32:D134-D137, (2004)), hoặc Pfam (Bateman et al., Nucleic Acids Research 30(1): 276-280 (2002)). Bộ dụng cụ để phân tích *in silico* trình tự protein là có sẵn trên máy chủ ExPASy proteomics (của Swiss Institute of Bioinformatics (Gasteiger et al., ExPASy: proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis, Nucleic Acids Res. 31:3784-3788(2003)). Miền hoặc motif cũng có thể được xác định bằng cách sử dụng các kỹ thuật thông thường, như bằng cách sắp hàng trình tự chẳng hạn.

Phương pháp sắp hàng trình tự để so sánh là đã biết trong lĩnh vực, phương pháp này gồm GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA và TFASTA. GAP sử dụng thuật toán Needleman và Wunsch ((1970) J Mol Biol 48: 443-453) để phát hiện việc sắp hàng toàn thể (tức là trình tự mở rộng trọn vẹn) của hai trình tự mà tối đa hóa số lượng tương thích và giảm thiểu số lượng khe rãnh. Thuật toán BLAST (Altschul et al. (1990) J Mol Biol 215: 403-10) tính toán tỷ lệ phần trăm đồng nhất về trình tự và thực hiện phân tích thống kê mức tương tự giữa hai trình tự. Phần mềm để thực hiện phân tích BLAST là có sẵn công khai thông qua National Centre for Biotechnology Information (NCBI). Thệ tương đồng có thể được xác định một cách dễ dàng bằng cách sử dụng, ví dụ, thuật toán sắp hàng nhiều trình tự ClustalW (phiên bản 1,83), với các thông số sắp thẳng hàng theo cặp mặc định, và phương pháp tính điểm theo phần trăm. Tỷ lệ phần trăm tương tự và đồng nhất toàn thể cũng có thể được xác định bằng cách sử dụng một trong số các phương pháp có sẵn trong gói phần mềm MatGAT

(Campanella et al., BMC Bioinformatics. 2003 Jul 10;4:29. MatGAT: an application that generates similarity/identity matrices using protein or DNA sequences). Việc chuẩn bị thao tác bằng tay thứ yếu có thể được thực hiện để tối ưu hóa việc sắp hàng giữa các motif bảo toàn, như sẽ rõ ràng với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực. Ngoài ra, thay vì sử dụng các trình tự đầy đủ độ dài để nhận diện các thể tương đồng, cũng có thể sử dụng các miền cụ thể. Các giá trị mức đồng nhất về trình tự có thể được xác định trên toàn bộ trình tự axit nucleic hoặc trình tự axit amin, hoặc trên các miền chọn hoặc các motif bảo toàn, bằng cách sử dụng các chương trình nêu trên sử dụng các thông số mặc định. Để sắp thẳng hàng tại chỗ, thuật toán Smith-Waterman là đặc biệt hữu ích (Smith TF, Waterman MS (1981) J. Mol. Biol 147(1);195-7).

Các tác giả của sáng chế đã bất ngờ phát hiện ra rằng bằng cách thay thế một hoặc nhiều gốc axit amin chính tính dung chịu thuốc diệt cỏ hoặc tính kháng có thể được tăng lên một cách đáng kể so với hoạt tính của các enzym PPO kiểu đại với SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, hoặc 46. Các phần thể được ưu tiên của mut-PPO là các phần thể mà làm tăng tính dung chịu thuốc diệt cỏ của cây, như để hoạt tính sinh học của hoạt tính oxidaza về cơ bản là không bị ảnh hưởng.

Theo đó, mục đích khác của sáng chế là gốc axit amin chính của enzym PPO, biến thể, dẫn xuất, ortholog, paralog hoặc thể tương đồng của chúng, được thay thế bằng axit amin khác bất kỳ.

Theo phương án được ưu tiên, gốc axit amin chính của enzym PPO, biến thể, dẫn xuất, ortholog, paralog hoặc thể tương đồng của chúng, được thay thế bằng axit amin bảo toàn được mô tả trong Bảng 2.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng các axit amin nằm gần các vị trí axit amin nêu trên cũng có thể được thay thế. Do đó, theo phương án khác biến thể của SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, hoặc 46, biến thể, dẫn xuất, ortholog, paralog hoặc thể tương đồng của chúng bao gồm mut-PPO, trong đó axit amin ± 3 , ± 2 hoặc ± 1 vị trí axit amin từ axit amin chính được thay thế bằng axit amin khác bất kỳ.

Dựa vào các công nghệ đã được biết rõ trong giải pháp kỹ thuật, kiểu trình tự có đặc tính cao có thể được phát triển, bằng cách đó ngoài trong số các ứng viên mut-PPO

với hoạt tính mong muốn có thể được nghiên cứu.

Việc kiểm tra đối với các ứng viên mut-PPO khác bằng cách sử dụng kiểu trình tự thích hợp sẽ được bao gồm bởi sáng chế. Sẽ được hiểu bởi người đọc có trình độ rằng kiểu trình tự của sáng chế không bị giới hạn bởi các khoảng chính xác trong khoảng giữa hai gốc axit amin liền kề của kiểu đã nêu. Mỗi trong số các khoảng cách giữa hai gốc liền kề trong các kiểu trên có thể, ví dụ, thay đổi một cách độc lập với nhau cho đến ± 10 , ± 5 , ± 3 , ± 2 hoặc ± 1 vị trí axit amin mà hầu như không tác động đến hoạt tính mong muốn.

Theo phân tích về chức năng và không gian đã nêu ở trên của các gốc axit amin riêng dựa vào các số liệu tính thể học như thu được theo sáng chế, đặc tính trình tự axit amin một phần duy nhất của các ứng viên mut-PPO tiềm năng hữu ích theo sáng chế có thể được xác định.

Theo phương án được ưu tiên đặc biệt, biến thể hoặc dẫn xuất của mut-PPO của SEQ ID NO: 2 được chọn từ Bảng 3a sau và sự thay thế axit amin kết hợp của mut-PPO của SEQ ID NO: 2 được chọn từ Bảng 3b.

Bảng 3a: (SEQ ID No: 2, 26, 38, 40): Sự thay thế axit amin riêng lẻ

SEQ ID NO:	Axit amin chính	Sự thay thế được ưu tiên	Sự thay thế chung
2	Arg128	Leu, Ala, Val	Leu, Ala, Val, Ile, Phe, Trp, Asp, Asn
2	Gly175	khuyết đoạn, Ala, Val, Pro	khuyết đoạn, Ala, Val, Pro, Leu, Ile, Met, Ser, Thr
2	Gly209	khuyết đoạn, Ala, Val, Pro	khuyết đoạn, Ala, Val, Pro, Leu, Ile, Met, Ser, Thr
2	Gly210	khuyết đoạn, Ala, Val, Pro	khuyết đoạn, Ala, Val, Pro, Leu, Ile, Met, Ser, Thr
2	Leu295	Ser, Met, Ala	Ser, Met, Ala, Val, Asp, Asn Thr
2	Ser296	Leu, Met, Gly	Leu, Met, Gly, Val, Asp, Asn Thr
2	Leu334	Val, Ile, Phe	Val, Ile, Phe, Tyr, Asn, Asp, Thr
2	Phe353	Tyr, Leu	Tyr, Leu, Val, Ile, Asn
2	Gly382	Ala, Ser, Thr	Ala, Ser, Thr, Cys, Val, Asp
2	Leu384	Ala, Val, Ile	Ala, Val, Ile, Asn, Asp, Thr
2	Leu397	Ala, Val, Ile	Ala, Val, Ile, Asn, Asp, Thr
2	Gly398	Ala, Ser, Thr	Ala, Ser, Thr, Cys, Val, Asp
2	Thr399	Ser, Cys	Ser, Cys, Met, Ala, Asn
2	Leu400	Ala, Val, Ile, Phe	Ala, Val, Ile, Phe, Asn, Asp, Thr
2	Ser402	Gly, Ala, Cys	Gly, Ala, Cys, Asp, His
2	Ser403	Gly, Ala, Cys	Gly, Ala, Cys, Asp, His
2	Met404	Ser, Cys, Thr	Ser, Cys, Thr, Gly, Ala

2	Met405	Leu, Ala, Val	Leu, Ala, Val, Gly, Cys, Ser
2	Phe420	Met, Cys, Ile, Tyr, Trp	Met, Cys, Ile, Tyr, Trp, Leu, Thr
2	Phe439	Tyr, Trp	Tyr, Trp, Ala, Val, Ile
26	Val389	Met, Ala, Cys	Met, Ala, Cys, His
38	Ala220	khuyết đoạn, Val, Thr, Leu, Cys, Ile	khuyết đoạn, Val, Thr, Leu, Cys, Ile, Met
38	S305	Leu, Ala, Val	Leu, Ala, Val
38	Tyr426	Met, Cys, Ile,	Met, Cys, Ile, Leu, Thr
40	Gly178	khuyết đoạn, Ala, Val, Pro	khuyết đoạn, Ala, Val, Pro, Leu, Ile, Met, Ser, Thr
40	Gly179	khuyết đoạn, Ala, Val, Pro	khuyết đoạn, Ala, Val, Pro, Leu, Ile, Met, Ser, Thr
40	Phe372	Met, Cys, Ile, Tyr, Trp, Phe	Met, Cys, Ile, Tyr, Trp, Phe, Leu, Thr
40	Phe392	Met, Cys, Ile, Tyr, Trp	Met, Cys, Ile, Tyr, Trp, Leu Thr

Bảng 3b: SEQ ID NO: 2 (sự thay thế axit amin kết hợp)

Hỗn hợp số	Vị trí axit amin chính	Sự thay thế được ưu tiên	Sự thay thế chung
1	Gly209 hoặc Gly210	khuyết đoạn, Ala, Val, Pro	khuyết đoạn, Ala, Val, Pro, Leu, Ile, Met, Ser, Thr
	Arg128	Leu, Ala, Val	Leu, Ala, Val, Ile, Phe, Trp, Asp, Asn
2	Phe420	Met, Cys, Ile,	Met, Cys, Ile, Leu, Thr
	Leu295	Ser, Met, Ala	Ser, Met, Ala, Val, Asp, Asn Thr
3	Phe420	Met, Cys, Ile,	Met, Cys, Ile, Leu, Thr
	Ser296	Leu, Met, Gly	Leu, Met, Gly, Val, Asp, Asn Thr
4	Arg128	Leu, Ala, Val	Leu, Ala, Val, Ile, Phe, Trp, Asp, Asn
	Phe420	Met, Cys, Ile,	Met, Cys, Ile, Leu, Thr
5	Gly209 hoặc Gly210	khuyết đoạn, Ala, Val, Pro	khuyết đoạn, Ala, Val, Pro, Leu, Ile, Met, Ser, Thr
	Phe420	Met, Cys, Ile,	Met, Cys, Ile, Leu, Thr

Cần phải hiểu rằng axit amin bất kỳ bên cạnh axit amin được nêu trong các bảng 3 ở trên có thể được dùng làm phần tử thế. Các phân tích để thử nghiệm chức năng của các thể đột biến này có sẵn trong lĩnh vực, và một cách tương ứng, như được mô tả trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế.

Theo phương án được ưu tiên, trình tự axit amin khác với trình tự axit amin của PPO của SEQ ID NO: 2 tại một hoặc nhiều vị trí trong số các vị trí sau: 128, 175, 209, 210, 295, 296, 334, 353, 382, 384, 397, 398, 399, 400, 402, 403, 404, 405, 420, 439.

Các ví dụ về sự khác biệt ở các vị trí axit amin này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, một hoặc nhiều trong số axit amin sau: axit amin tại vị trí 128 không phải là Arginin; axit amin tại vị trí 175 không phải là Glyxin; axit amin tại vị trí 209 không phải là Glyxin; axit amin tại vị trí 210 không phải là Glyxin; axit amin tại vị trí 295 không phải là Leuxin; axit amin tại vị trí 296 không phải là Serin; axit amin tại vị trí 334 không phải là Leuxin; axit amin tại vị trí 353 không phải là Phenylalanin; axit amin tại vị trí 382 không phải là Glyxin; axit amin tại vị trí 384 không phải là Leuxin; axit amin tại vị trí 397 không phải là Leuxin, axit amin tại vị trí 398 không phải là Glyxin, axit amin tại vị trí 399 không phải là Threonin, axit amin tại vị trí 400 không phải là Leuxin, axit amin tại vị trí 402 không phải là Serin, axit amin tại vị trí 403 không phải là Serin, axit amin tại vị trí 404 không phải là Methionin, axit amin tại vị trí 405 không phải là Methionin, axit amin tại vị trí 420 không phải là Phenylalanin, axit amin tại vị trí 439 không phải là Phenylalanin.

Theo một số phương án, enzym PPO của SEQ ID NO: 2 chứa một hoặc nhiều trong số sau:

axit amin tại vị trí 128 là Leu, Ala, Val, Ile, Phe, Trp, Asp, hoặc Asn; axit amin tại vị trí 175 được làm khuyết, Ala, Val, Pro, Leu, Ile, Met, Ser, hoặc Thr; axit amin tại vị trí 209 được làm khuyết, Ala, Val, Pro, Leu, Ile, Met, Ser, hoặc Thr; axit amin tại vị trí 210 được làm khuyết, Ala, Val, Pro, Leu, Ile, Met, Ser, hoặc Thr; axit amin tại vị trí 295 là Ser, Met, Ala, Val, Asp, Asn hoặc Thr; axit amin tại vị trí 296 là Leu, Met, Gly, Val, Asp, Asn hoặc Thr; axit amin tại vị trí 334 là Val, Ile, Phe, Tyr, Asn, Asp, hoặc Thr; axit amin tại vị trí 353 là Tyr, Leu, Val, Ile, hoặc Asn; axit amin tại vị trí 382 là Ala, Ser, Thr, Cys, Val, hoặc Asp; axit amin tại vị trí 384 là Ala, Val, Ile, Asn, Asp, hoặc Thr; axit amin tại vị trí 397 là Ala, Val, Ile, Asn, Asp, hoặc Thr, axit amin tại vị trí 398 là Ala, Ser, Thr, Cys, Val, hoặc Asp, axit amin tại vị trí 399 là Ser, Cys, Met, Ala, hoặc Asn, axit amin tại vị trí 400 là Ala, Val, Ile, Phe, Asn, Asp, hoặc Thr, axit amin tại vị trí 402 là Gly, Ala, Cys, Asp, hoặc His, axit amin tại vị trí 403 là Gly, Ala, Cys, Asp, hoặc His, axit amin tại vị trí 404 là Ser, Cys, Thr, Gly, hoặc Ala, axit amin tại vị trí 405 là Leu, Ala, Val, Gly, Cys, hoặc Ser, axit amin tại vị trí 420 là Met, Cys,

Ile, Tyr, Trp, Leu, hoặc Thr, axit amin tại vị trí 439 là Tyr, Trp, Ala, Val, hoặc Ile.

Theo phương án được ưu tiên khác nữa, trình tự axit amin khác với trình tự axit amin của PPO của SEQ ID NO: 26 tại vị trí 389. Tốt hơn là, axit amin tại vị trí 389 là valin khác. Tốt hơn nữa là, axit amin tại vị trí 389 là Met, Ala, Cys, hoặc His.

Theo phương án được ưu tiên khác nữa, trình tự axit amin khác với trình tự axit amin của PPO của SEQ ID NO: 38 tại một hoặc nhiều vị trí trong số các vị trí sau: 220, 305, 426. Tốt hơn là, axit amin tại vị trí 220 không phải là alanin, axit amin tại vị trí 305 không phải là serin, axit amin tại vị trí 426 không phải là tyrosin.

Tốt hơn nữa là, axit amin tại vị trí 220 được làm khuyết, Val, Thr, Leu, Cys, Ile, hoặc Met; axit amin tại vị trí 305 là Leu, Ala, Val, axit amin tại vị trí 426 là Met, Cys, Ile, Leu, hoặc Thr.

Theo phương án được ưu tiên khác nữa, trình tự axit amin khác với trình tự axit amin của PPO của SEQ ID NO: 40 tại một hoặc nhiều vị trí trong số các vị trí sau: 178, 179, 372, 392. Tốt hơn là, axit amin tại vị trí 178 không phải là glyxin, axit amin tại vị trí 179 không phải là glyxin, axit amin tại vị trí 372 không phải là phenylalanin, axit amin tại vị trí 392 không phải là phenylalanin.

Tốt hơn nữa là, axit amin tại vị trí 178 được làm khuyết, Ala, Val, Pro, Leu, Ile, Met, Ser, hoặc Thr; axit amin tại vị trí 179 được làm khuyết, Ala, Val, Pro, Leu, Ile, Met, Ser, hoặc Thr; axit amin tại vị trí 372 là Met, Cys, Ile, Tyr, Trp, Phe, Leu, hoặc Thr; axit amin tại vị trí 392 là Met, Cys, Ile, Tyr, Trp, hoặc Leu.

Sẽ nằm trong sự hiểu biết của người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực để xác định các vùng được bảo toàn và các motif chung giữa các homolog, ortholog và paralog của SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, hoặc 45, như các trình tự được mô tả trong Bảng 1. Đã xác định được các vùng được bảo toàn mà có thể thể hiện các motif liên kết thích hợp, axit amin tương ứng với axit amin được liệt kê trong Bảng 3a và 3b, có thể được chọn được thể bằng axit amin khác bất kỳ, tốt hơn là bằng axit amin bảo toàn như được thể hiện trong bảng 2, và tốt hơn nữa là bằng axit amin của Bảng 3a và 3b.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất phương pháp nhận diện thuốc diệt cỏ chứa dẫn xuất benzoxazinon bằng cách sử dụng mut-PPO được mã hóa bởi axit nucleic mà chứa

trình tự nucleotit thuộc SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, hoặc 45, hoặc biến thể hoặc dẫn xuất của chúng.

Phương pháp này bao gồm các bước:

- a) tạo ra cây hoặc tế bào chuyển gen chứa axit nucleic mã hóa cho mut-PPO, trong đó mut-PPO được biểu hiện;
- b) cấp thuốc diệt cỏ chứa dẫn xuất benzoxazinon cho cây hoặc tế bào chuyển gen nêu trong a) và cho cây hoặc tế bào đối chứng thuộc cùng một giống;
- c) xác định sự sinh trưởng hoặc khả năng sống sót của cây hoặc tế bào chuyển gen và cây hoặc tế bào đối chứng sau khi cấp thuốc diệt cỏ chứa dẫn xuất benzoxazinon này, và
- d) chọn lọc “thuốc diệt cỏ chứa dẫn xuất benzoxazinon” mà mang lại sự sinh trưởng giảm cho cây hoặc tế bào đối chứng so với sự sinh trưởng của cây hoặc tế bào chuyển gen.

Thuật ngữ “tế bào đối chứng” hoặc “cùng loại, kiểu đại, cây, mô cây, tế bào cây hoặc tế bào chủ” được dùng để chỉ cây, mô cây, tế bào cây, hoặc tế bào chủ, một cách tương ứng, mà thiếu các đặc tính kháng thuốc diệt cỏ và/hoặc polynucleotit cụ thể theo sáng chế mà được bộc lộ trong bản mô tả. Việc sử dụng thuật ngữ “kiểu đại”, do đó, không dự định để ngụ ý rằng cây, mô cây, tế bào cây, hoặc tế bào chủ khác thiếu ADN tái tổ hợp trong hệ gen của nó, và/hoặc không có đặc tính kháng thuốc diệt cỏ mà khác với các đặc tính được bộc lộ trong bản mô tả.

Mục đích khác là đề xuất phương pháp nhận diện trình tự nucleotit mã hóa cho mut-PPO mà kháng hoặc dung chịu đối với thuốc diệt cỏ chứa dẫn xuất benzoxazinon, phương pháp này bao gồm các bước:

- a) tạo ra thư viện của các axit nucleic mã hóa cho mut-PPO,
- b) sàng lọc tập hợp các axit nucleic mã hóa cho mut-PPO tạo thành bằng cách biểu hiện mỗi trong số các axit nucleic này ở tế bào hoặc cây và xử lý tế bào hoặc cây này bằng thuốc diệt cỏ chứa dẫn xuất benzoxazinon,
- c) so sánh mức độ dung chịu thuốc diệt cỏ chứa dẫn xuất benzoxazinon được tạo ra bởi tập hợp các axit nucleic mã hóa cho PPO này với mức độ dung chịu thuốc diệt cỏ chứa dẫn xuất benzoxazinon được tạo ra bởi axit nucleic mã hóa cho PPO đối

chúng,

- d) chọn lọc ít nhất một axit nucleic mã hóa cho mut-PPO mà tạo ra mức độ dung chịu đối với thuốc diệt cỏ chứa dẫn xuất benzoxazinon tăng đáng kể so với mức độ chịu được tạo ra bởi axit nucleic mã hóa cho PPO đối chứng

Theo phương án được ưu tiên, axit nucleic mã hóa cho mut-PPO được chọn lọc trong bước d) tạo ra tính kháng nhiều hơn ít nhất 2 lần hoặc sự dung nạp của tế bào hoặc cây trồng với thuốc diệt cỏ chứa dẫn xuất benzoxazinon so với tính kháng được tạo ra bởi axit nucleic mã hóa cho PPO đối chứng

Theo phương án được ưu tiên khác nữa, axit nucleic mã hóa cho mut-PPO được chọn lọc trong bước d) tạo ra nhiều hơn ít nhất 2 lần, ít nhất 5-lần, ít nhất 10-lần, ít nhất 20-lần, ít nhất 50-lần, ít nhất 100-lần, ít nhất 500-lần, sự kháng hoặc sự dung chịu của tế bào hoặc cây trồng với thuốc diệt cỏ chứa dẫn xuất benzoxazinon so với sự kháng hoặc sự chịu được tạo ra bởi axit nucleic mã hóa cho PPO đối chứng

Tính kháng hoặc tính dung chịu có thể được xác định bằng cách tạo ra cây chuyển gen hoặc tế bào chủ, tốt hơn là tế bào cây, chứa trình tự axit nucleic thuộc thư viện trong bước a) và so sánh cây chuyển gen này với cây đối chứng hoặc tế bào chủ, tốt hơn là a tế bào cây.

Mục đích khác là đề xuất phương pháp nhận diện cây hoặc tảo chứa a axit nucleic chứa trình tự nucleotit mã hóa cho PPO kiểu đại hoặc mut-PPO mà kháng hoặc dung chịu đối với thuốc diệt cỏ chứa dẫn xuất benzoxazinon, phương pháp này bao gồm các bước:

- a) nhận diện lượng hữu hiệu của thuốc diệt cỏ chứa dẫn xuất benzoxazinon trong giống cây của tế bào cây hoặc tảo xanh mà làm chết các tế bào đã nêu.
- b) xử lý tế bào cây hoặc tảo xanh này bằng tác nhân gây đột biến,
- c) cho quần thể tế bào đã được gây đột biến tiếp xúc với lượng hữu hiệu của thuốc diệt cỏ chứa dẫn xuất benzoxazinon, được nhận diện trong a),
- d) chọn lọc ít nhất một tế bào sống sót trong các điều kiện thử nghiệm này,
- e) khuếch đại bằng PCR và xác định trình tự của các gen PPO từ các tế bào được chọn lọc trong d) và so sánh các trình tự này với các trình tự gen PPO

kiểu đại, một cách tương ứng.

Theo phương án được ưu tiên, tác nhân gây đột biến là etylmetansulfonat (EMS).

Nhiều phương pháp đã biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực là có sẵn để thu được axit nucleic ứng viên thích hợp để nhận diện trình tự nucleotit mã hóa cho mut-PPO từ giống của các sinh vật có nguồn tiềm năng khác nhau bao gồm các vi khuẩn, cây, nấm, tảo, môi trường nuôi cấy hỗn hợp v.v.. cũng như các nguồn môi trường của ADN như đất. Các phương pháp này không kể những cây khác bao gồm việc điều chế cADN hoặc thư viện ADN hệ gen, việc sử dụng các đoạn môi oligonucleotit thoái hóa thích hợp, sử dụng mẫu dò dựa trên các trình tự đã biết hoặc các thử nghiệm bổ sung (ví dụ, để phát triển dựa vào tyrosin) cũng như việc sử dụng sự phát sinh đột biến và sự bố trí lại để tạo ra các trình tự mã hóa mut-PPO tái tổ hợp hoặc sắp xếp lại.

Axit nucleic chứa ứng viên và các trình tự mã hóa PPO đối chứng có thể được biểu hiện trong men, trong chủng chủ vi khuẩn, trong alga hoặc trong cây cao hơn như cây thuốc lá hoặc *Arabidopsis* và mức dung chịu vốn có tương đối của các trình tự mã hóa PPO được xét nghiệm theo kiểu hình chỉ báo nhìn thấy được của chủng hoặc cây được biến nạp với sự có mặt của các nồng độ khác nhau của thuốc diệt cỏ chứa dẫn xuất benzoxazinon được chọn. Phản ứng liều lượng và sự dịch chuyển tương đối trong phản ứng liều lượng liên quan đến các kiểu hình chỉ báo này (hình thành màu nâu, ức chế sự phát triển, tác dụng diệt cỏ v.v.) được biểu hiện một cách thuận tiện, ví dụ, là các giá trị GR50 (nồng độ để giảm phát triển 50%) hoặc MIC (nồng độ ức chế tối thiểu) trong đó tăng giá trị tương ứng với tăng sự dung chịu vốn có của PPO được biểu hiện. Ví dụ, trong hệ thống thử nghiệm tương đối nhanh dựa trên sự biến nạp của vi khuẩn như *E. coli*, mỗi mut-PPO mã hóa cho trình tự có thể được biểu hiện, ví dụ, là trình tự ADN trong không chế biểu hiện của gen khởi đầu có thể không chế như gen khởi đầu lacZ và lấy báo cáo thích hợp, ví dụ bằng cách sử dụng ADN tổng hợp, của các vấn đề này là sử dụng codon để thu được khi so sánh mức độ biểu hiện khi có thể của các trình tự PPO khác nhau. Các axit nucleic biểu hiện chủng chứa các trình tự PPO ứng viên thay thế có thể dần mỏng ở các nồng độ khác nhau của thuốc diệt cỏ chứa dẫn xuất benzoxazinon được chọn trong, tùy ý, môi trường được bổ sung tyrosin và các mức dung chịu vốn có tương đối của các enzym PPO được biểu hiện tính trên cơ sở của mức độ và MIC để ức chế sự tạo thành của chất màu nâu, chất màu

ochronotic.

Theo phương án khác, axit nucleic ứng cử được biến nạp thành nguyên liệu cây để tạo ra cây chuyển gen, được tái tạo thành cây sinh sản bình thường về mặt hình thái học mà sau đó được xác định đối với sự dung chịu khác nhau đối với các thuốc diệt cỏ chứa dẫn xuất benzoxazinon được chọn. Nhiều phương pháp thích hợp để biến nạp sử dụng yếu tố đánh dấu chọn lọc thích hợp như kanamycin, vectơ nhĩ phân như từ *Agrobacterium* và sự tái sinh cây như, ví dụ, từ các đĩa lá cây thuốc lá đã biết rõ trong lĩnh vực. Tùy ý, quần thể không chế của cây cũng được biến nạp với axit nucleic biểu hiện PPO đối chứng. Theo cách khác, cây hai lá mầm chưa được biến nạp như *Arabidopsis* hoặc Cây thuốc lá có thể được sử dụng làm đối chứng vì cây này, trong trường hợp bất kỳ, biểu hiện PPO nội sinh của chính nó. Trung bình, và sự phân bố của mức dung chịu thuốc diệt cỏ là một loạt trường hợp biến nạp cây ban đầu hoặc thế hệ con của chúng đối với dẫn xuất benzoxazinon được mô tả ở trên được đánh giá theo cách thông thường dựa vào sự hư hại cây, các triệu chứng tẩy trắng mô phân sinh v.v.. ở khoảng các nồng độ khác nhau của thuốc diệt cỏ. Các số liệu này có thể được biểu hiện, ví dụ, xét về các giá trị GR50 thu được từ đường cong liều lượng/phản ứng có "liều lượng" được vẽ đồ thị trên trục x và "phần trăm tiêu diệt", "tác dụng diệt cỏ", "số cây xanh nảy mầm" v.v.. được vẽ trên trục y trong đó các giá trị GR50 tăng tương ứng với các mức tăng của sự dung chịu vốn có của PPO được biểu hiện. Các thuốc diệt cỏ có thể được áp dụng một cách thích hợp trước nhú mầm hoặc sau nhú mầm.

Mục đích khác là đề xuất axit nucleic đã được phân lập mã hóa cho mut-PPO, trong đó axit nucleic này là có thể nhận diện được bằng phương pháp nêu trên.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất tế bào cây được biến nạp bởi axit nucleic PPO kiểu dại hoặc mut-PPO hoặc tế bào cây được gây đột biến để thu nhận cây mà biểu hiện axit nucleic PPO kiểu dại hoặc mut-PPO, trong đó sự biểu hiện của axit nucleic này ở tế bào cây tạo ra tính kháng hoặc dung chịu tăng đối với thuốc diệt cỏ chứa dẫn xuất benzoxazinon so với giống kiểu dại của tế bào cây.

Thuật ngữ "biểu hiện/đang biểu hiện" hoặc "biểu hiện gen" có nghĩa là sự phiên mã của gen đặc hiệu hoặc các gen đặc hiệu hoặc cấu trúc gen đặc hiệu. Thuật ngữ "biểu hiện" hoặc "biểu hiện gen" cụ thể có nghĩa là sự phiên mã của gen hoặc các gen hoặc cấu trúc gen thành ARN cấu trúc (rARN, tARN) hoặc mARN có hoặc không có

sự dịch mã sau đó của ARN thành protein. Quy trình này bao gồm sự phiên mã của ADN và xử lý sản phẩm mARN tạo ra.

Để thu nhận tác dụng mong muốn, tức là các cây mà dung chịu hoặc có tính kháng đối với thuốc diệt cỏ chứa dẫn xuất benzoxazinon, dẫn xuất thuốc diệt cỏ theo sáng chế, sẽ được hiểu rằng ít nhất một axit nucleic là “được biểu hiện quá mức” bằng các phương pháp và các biện pháp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

Thuật ngữ “biểu hiện tăng” hoặc “biểu hiện quá mức” trong bản mô tả này có nghĩa là dạng bất kỳ của sự biểu hiện mà tức là bổ sung vào mức độ biểu hiện kiểu đại ban đầu. Các phương pháp để làm tăng sự biểu hiện của các gen hoặc các sản phẩm gen được dẫn chứng bằng tài liệu đã biết trong lĩnh vực và bao gồm, ví dụ, biểu hiện quá mức được gây ra bởi các gen khởi đầu, sử dụng gen tăng cường phiên mã hoặc gen tăng cường dịch mã. Axit nucleic đã được phân lập mà dùng làm gen khởi đầu hoặc các yếu tố gen tăng cường có thể được đưa vào vị trí thích hợp (thông thường luồng phía trên) của dạng không phải khác loại của polynucleotit sao cho để điều tiết tăng sự biểu hiện của axit nucleic mã hóa cho polypeptit đang quan tâm. Ví dụ, các gen khởi đầu nội sinh có thể được biến đổi in vivo bằng cách đột biến, khuyết đoạn, và/hoặc thay thế (xem, Kmiec, US 5,565,350; Zarling et al., WO9322443), hoặc các gen khởi đầu được phân lập có thể được đưa vào tế bào cây theo hướng thích hợp và khoảng cách từ gen theo sáng chế sao cho để khống chế sự biểu hiện của gen này.

Nếu sự biểu hiện polypeptit là mong muốn, nhìn chung mong muốn bao gồm vùng polyadenyl hóa ở đầu 3' của vùng mã hóa polynucleotit. Vùng polyadenyl hóa có thể thu được từ gen tự nhiên, từ giống của các gen cây khác, hoặc từ T-ADN. Trình tự đầu 3' được bổ sung có thể thu được từ, ví dụ, các gen nopalin syntaza hoặc octopin syntaza, hoặc theo cách khác từ gen cây khác nữa, hoặc ít tốt hơn là từ gen có nhân điển hình khác.

Trình tự intron còn có thể được bổ sung vào vùng chưa được dịch mã 5' (UTR) hoặc trình tự mã hóa của trình tự mã hóa một phần để làm tăng lượng mang tin trưởng thành mà tích tụ trong phân bào tan. Sự bao gồm của intron có thể tách trong bộ phiên mã trong các cấu trúc biểu hiện ở cả thực vật và động vật đã thể hiện làm tăng sự biểu hiện gen ở cả mARN và các mức protein lên đến 1000-lần (Buchman và Berg (1988)

Mol. Cell biol. 8: 4395-4405; Callis et al. (1987) Genes Dev 1:1183-1200). Sự tăng cường intron này của biểu hiện gen thông thường là lớn nhất khi được đặt gần đầu 5' của bộ phiên mã. Sử dụng các intron ở cây ngô Adh1-S intron 1, 2, và 6, Bronze-1 intron đã được biết đến trong tình trạng kỹ thuật này. Cho thông tin chung xem: The Maize Handbook, Chapter 116, Freeling and Walbot, Eds., Springer, N.Y. (1994)

Thuật ngữ “đưa vào” hoặc “biến nạp” như được nêu trong bản mô tả này bao gồm chuyển polynucleotit ngoại sinh vào tế bào chủ, bất kể phương pháp được sử dụng để chuyển. Mô thực vật có khả năng nhân giống vô tính tiếp theo, cho dù bằng cách hình thành cơ quan hay hình thành phôi, có thể được biến nạp với cấu trúc di truyền theo sáng chế và toàn bộ cây được tái tạo từ đó. Mô cụ thể được chọn sẽ thay đổi tùy thuộc vào hệ sinh sản vô tính sẵn có cho, và thích hợp nhất với, loài cụ thể cần được biến nạp. Đích mô được nêu làm ví dụ bao gồm các đĩa lá, phần hoa, phôi, các lá mầm, trụ dưới lá mầm, túi phôi, mô sẹo, mô phân sinh hiện có (ví dụ, mô phân sinh ngọn, chồi nách, và mô phân sinh rễ), và mô mô phân sinh kích ứng (ví dụ, mô phân sinh lá mầm và mô phân sinh trụ lá mầm). Polynucleotit có thể được đưa tạm thời hoặc ổn định vào tế bào chủ và có thể được duy trì không kết hợp, ví dụ, dưới dạng plasmid. Theo cách khác, nó có thể được kết hợp vào hệ gen của vật chủ. Sau đó, tế bào cây được biến nạp thu được có thể được sử dụng để tái tạo ra cây được biến nạp theo cách đã biết với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực.

Thuật ngữ “đưa vào” hoặc “biến nạp” như được nêu trong bản mô tả này bao gồm chuyển polynucleotit ngoại Việc chuyển gen ngoại lai vào hệ gen của cây được gọi là biến nạp. Biến nạp loài cây hiện nay là kỹ thuật khá thông thường. Thuận lợi là, có thể sử dụng phương pháp biến nạp bất kỳ để đưa gen được nói đến vào tế bào tổ tiên thích hợp. Phương pháp được mô tả để biến nạp và tái tạo cây trồng từ mô thực vật hoặc tế bào cây có thể được sử dụng để biến nạp tạm thời hoặc ổn định. Phương pháp biến nạp gồm sử dụng liposom, đục lỗ điện, hóa chất làm tăng dung nạp ADN tự do, truyền ADN trực tiếp vào cây trồng, oanh tạc bằng súng bắn hạt, biến nạp bằng cách sử dụng virus hoặc phấn hoa và vi truyền. Các phương pháp có thể được lựa chọn từ phương pháp canxi/polyetylen glycol cho các thể nguyên sinh (Krens, F.A. et al., (1982) Nature 296, 72-74; Negrutiu I et al. (1987) Plant Mol Biol 8: 363-373); đục lỗ điện các thể nguyên sinh (Shillito R.D. et al. (1985) Bio/Technol 3, 1099-1102); vi tiêm vào nguyên liệu cây trồng (Crossway A et al., (1986) Mol. Gen Genet 202: 179-

185); bắn hạt được phủ ADN hoặc ARN (Klein TM et al., (1987) Nature 327: 70) chuyển nhiễm bằng (không kết hợp) virus và các dạng tương tự. Cây chuyển gen, bao gồm cây trồng chuyển gen, tốt hơn nếu được tạo ra bằng cách biến nạp qua trung gian *Agrobacterium*. Phương pháp biến nạp thuận lợi là biến nạp trong mủm chân giả. Để nhằm mục đích này, có thể, ví dụ, cho phép *agrobacteria* tác động lên hạt giống cây hoặc gây nhiễm mô thực vật phân sinh với *agrobacteria*. Đã chứng tỏ rằng sẽ đặc biệt thích hợp theo sáng chế nếu cho phép huyền phù chứa *agrobacteria* đã được biến nạp tác động lên cây nguyên vẹn hoặc ít nhất lên mầm hoa. Sau đó, cây được phát triển đến khi thu được hạt giống của cây đã được xử lý (Clough and Bent, Plant J. (1998) 16, 735–743). Phương pháp biến nạp qua trung gian *Agrobacterium* ở cây lúa bao gồm các phương pháp đã biết để biến nạp ở cây lúa, như các phương pháp được nêu trong các tài liệu bất kỳ sau đây: Đơn xin cấp patent châu Âu số EP 1198985 A1, Aldemita and Hodges (Planta 199: 612-617, 1996); Chan et al. (Plant Mol Biol 22 (3): 491-506, 1993), Hiei et al. (Plant J 6 (2): 271-282, 1994). Đối với biến nạp ở cây ngô, phương pháp được ưu tiên là phương pháp được nêu trong Ishida et al. (Nat. Biotechnol 14(6): 745-50, 1996) hoặc Frame et al. (Plant Physiol 129(1): 13-22, 2002). Các phương pháp này được mô tả tiếp bằng cách nêu ví dụ trong B. Jenes et al., Techniques for Gene Transfer, trong: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, eds. S.D. Kung and R. Wu, Academic Press (1993) 128-143 và trong Potrykus Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991) 205-225). Tốt hơn nữa, các axit nucleic hoặc cấu trúc cần được biểu hiện được tách dòng vào vector, thích hợp để biến nạp *Agrobacterium tumefaciens*, ví dụ pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res. 12 (1984) 8711). Sau đó có thể sử dụng *Agrobacteria* được biến nạp bằng vector này theo cách đã biết để biến nạp cây trồng, như cây trồng được sử dụng làm mẫu, như *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana* nằm trong phạm vi của sáng chế nhưng không được coi là cây trồng), hoặc cây trồng như, bằng cách nêu ví dụ, cây thuốc lá, ví dụ bằng cách ngâm lá bị thương hoặc lá cắt nhỏ trong dung dịch chứa *agrobacteria* và sau đó nuôi cấy chúng trong môi trường thích hợp. Việc biến nạp cây trồng bằng *Agrobacterium tumefaciens* được nêu, ví dụ, trong Hofgen and Willmitzer in Nucl. Acid Res. (1988) 16, 9877 hoặc không kể những tài liệu khác, được biết từ F.F. White, Vector for Gene Transfer in Higher Plants; in Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, eds. S.D. Kung and R. Wu, Academic Press, 1993, pp. 15-38.

Ngoài biến nạp tế bào soma, mà sau đó có thể được tái tạo vào cây nguyên vẹn, cũng có thể biến nạp tế bào của mô thực vật phân sinh và đặc biệt là các tế bào mà phát triển thành các giao tử. Trong trường hợp này, các giao tử được biến nạp theo sau sự phát triển tự nhiên của, tạo thành cây chuyển gen. Như vậy, ví dụ, hạt giống của *Arabidopsis* được xử lý bằng *agrobacteria* và hạt giống thu được từ cây trồng phát triển mà tỷ lệ nhất định của chúng được biến nạp và nhờ vậy được chuyển gen [Feldman, KA and Marks MD (1987). *Mol Gen Genet* 208:274-289; Feldmann K (1992). In: C Koncz, N-H Chua and J Shell, eds, *Methods in Arabidopsis Research*. Word Scientific, Singapore, pp. 274-289]. Phương pháp thay thế dựa trên việc loại bỏ lặp lại cụm hoa và ủ vị trí cắt ở giữa của thể hoa thị với *agrobacteria* được biến nạp, nhờ đó hạt giống được biến nạp có thể tương tự thu được sau đó (Chang (1994). *Plant J.* 5: 551-558; Katavic (1994). *Mol Gen Genet*, 245: 363-370). Tuy nhiên, phương pháp đặc biệt hữu hiệu là phương pháp thẩm chân không với các cải biến của nó như phương pháp “nhúng hoa”. Đối với phương pháp thẩm chân không của *Arabidopsis*, cây nguyên vẹn dưới áp suất giảm được xử lý với huyền phù của *agrobacteria* [Bechthold, N (1993). *C R Acad Sci Paris Life Sci*, 316: 1194-1199], trong khi trong trường hợp phương pháp “nhúng hoa” mô hoa phát triển được ủ trong một thời gian ngắn với huyền phù *agrobacteria* đã được xử lý bằng chất hoạt động bề mặt [Clough, SJ und Bent, AF (1998). *Plant J.* 16, 735-743]. Tỷ lệ nhất định của hạt giống chuyển gen được thu hoạch trong cả hai trường hợp, và các hạt giống này có thể được phân biệt với hạt giống không chuyển gen bằng cách phát triển dưới các điều kiện chọn lọc đã được nêu ở trên. Ngoài ra, sự biến nạp ổn định của lặp thể là có lợi vì lặp thể được thừa hưởng từ mẹ là hầu hết các cây trồng làm giảm hoặc loại bỏ nguy cơ gen chuyển chảy qua phấn hoa. Biến nạp của hệ gen lục lạp thường thu được bằng quy trình được trình bày dưới dạng biểu đồ trong Klaus et al., 2004 [*Nature Biotechnology* 22 (2), 225-229]. Nói một cách ngắn gọn, trình tự cần được biến nạp được tách dòng cùng với gen đánh dấu chọn lọc giữa trình tự mép sườn tương đồng với hệ gen lục lạp. Các trình tự mép sườn tương đồng này hướng vị trí đặc hiệu đính gắn vào plastome. Sự biến nạp thuộc lặp thể đã được mô tả đối với nhiều loài cây khác nhau và sự miêu tả chung được nêu trong Bock (2001) *Transgenic plastids in basic research and plant biotechnology*. *J Mol Biol.* 2001 Sep 21; 312 (3):425-38 hoặc Maliga, P (2003) *Progress towards commercialization of plastid transformation technology*. *Trends*

Biotechnol. 21, 20-28. Các thành tựu công nghệ sinh học khác gần đây đã được nêu dưới dạng các thể biến nạp lập thể không có gen đánh dấu, các thể biến nạp này có thể được tạo ra bằng gen đánh dấu đồng kết hợp tạm thời (Klaus et al., 2004, Nature Biotechnology 22(2), 225-229). Tế bào cây đã biến đổi di truyền có thể được tái tạo bằng tất cả các phương pháp mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực đã quen thuộc. Phương pháp thích hợp có thể tìm thấy trong các tài liệu trên đây của S.D. Kung và R. Wu, Potrykus hoặc Hofgen và Willmitzer.

Thường thì, sau khi biến nạp, tế bào cây hoặc nhóm tế bào được chọn để trình diện một hoặc nhiều gen đánh dấu mà được mã hóa bằng các gen có thể biểu hiện ở cây được đồng chuyển nhiễm với gen được nói đến, mà sau đó nguyên liệu đã được biến nạp này được tái tạo vào toàn bộ cây. Để chọn lọc cây đã được biến nạp, nguyên liệu thực vật thu được trong quá trình biến nạp, về nguyên tắc, được đưa vào điều kiện chọn lọc sao cho cây đã được biến nạp có thể được phân biệt với cây trồng chưa được biến nạp. Ví dụ, hạt giống thu được theo cách nêu trên có thể được trồng và, sau thời gian phát triển ban đầu, được chọn lọc thích hợp bằng cách phun. Khả năng khác bao gồm cho phát triển hạt giống, nếu cần sau khi làm tiệt trùng, trên các đĩa thạch bằng cách sử dụng chất chọn lọc thích hợp sao cho chỉ có hạt giống đã được biến nạp mới có thể phát triển thành cây trồng. Theo cách khác, cây đã được biến nạp được sàng lọc đối với sự có mặt của gen đánh dấu chọn lọc như các gen đánh dấu được nêu trên đây.

Sau khi chuyển và tái tạo ADN, cây được biến nạp giả định cũng có thể được đánh giá, ví dụ bằng cách sử dụng phân tích Southern, để trình diện gen được nói đến, số bản sao và/hoặc tổ chức hệ gen. Theo cách khác hoặc ngoài ra, mức biểu hiện của ADN mới được đưa vào có thể được kiểm tra bằng cách sử dụng phép phân tích Northern và/hoặc Western, cả hai phương pháp này đều đã biết với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực.

Cây đã được biến nạp tạo ra có thể được nhân giống bằng nhiều phương pháp khác nhau, như bằng sinh sản vô tính hoặc các phương pháp nhân giống truyền thống. Ví dụ, cây được biến nạp thể hệ thứ nhất (hoặc T1) có thể cùng một loại và các thể biến nạp thể hệ thứ hai (hoặc T2) đồng hợp tử được chọn lọc, và sau đó cây trồng T2 có thể được nhân giống tiếp thông qua các phương pháp nhân giống truyền thống. Sinh vật được biến nạp tạo ra có thể có nhiều dạng. Ví dụ, chúng có thể là các dạng khảm của tế bào được biến nạp và tế bào chưa được biến nạp; các thể biến nạp tách dòng vô

tính (ví dụ, tất cả các tế bào được biến nạp chứa catxet biểu hiện); các đoạn ghép của các mô được biến nạp và các mô chưa được biến nạp (ví dụ, ở cây trồng, thân rễ đã được biến nạp được ghép vào chồi giống chưa được biến nạp).

Tốt hơn là, axit nucleic kiểu đại hoặc mut-PPO chứa trình tự polynucleotit được chọn từ nhóm bao gồm : a) polynucleotit như được thể hiện trong SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, hoặc 45, hoặc biến thể hoặc dẫn xuất của chúng; b) polynucleotit mã hóa cho polypeptit như được thể hiện trong SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, hoặc 46, hoặc biến thể hoặc dẫn xuất của chúng; c) polynucleotit chứa ít nhất 60 nucleotit liên tiếp theo bất kỳ trong số) hoặc b); và d) polynucleotit bổ sung với polynucleotit theo bất kỳ trong số từ a) đến c).

Tốt hơn là, sự biểu hiện của axit nucleic này ở cây tạo ra tính kháng tăng của cây đối với thuốc diệt cỏ chứa dẫn xuất benzoxazinon so với giống kiểu đại của cây.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất cây, tốt hơn là cây chuyển gen, chứa tế bào cây theo sáng chế, trong đó sự biểu hiện của axit nucleic này ở cây tạo ra tính kháng tăng của cây đối với thuốc diệt cỏ chứa dẫn xuất benzoxazinon so với giống kiểu đại của cây.

Cây trồng được mô tả trong bản mô tả có thể là cây thời vụ chuyển gen hoặc cây không chuyển gen.

Đối với các mục đích của sáng chế, "chuyển gen", "gen chuyển" hoặc "tái tổ hợp" có nghĩa là liên quan đến, ví dụ, trình tự axit nucleic, kết cấu biểu hiện, cấu trúc gen hoặc vector chứa trình tự axit nucleic hoặc sinh vật được biến nạp với trình tự axit nucleic, kết cấu biểu hiện hoặc vector theo sáng chế, tất cả các cấu trúc này được tạo ra bằng phương pháp tái tổ hợp trong đó

(a) trình tự axit nucleic mã hóa cho protein hữu ích trong phương pháp theo sáng chế, hoặc

(b) (các) trình tự điều khiển di truyền được liên kết có điều khiển với trình tự axit nucleic theo sáng chế, ví dụ gen khởi đầu, hoặc

(c) a) và b)

không nằm trong môi trường di truyền của chúng hoặc đã được biến đổi bằng phương pháp tái tổ hợp, có thể biến đổi để tạo ra, ví dụ, dạng thể, thêm vào, làm khuyết, đảo hoặc cài xen một hoặc nhiều gốc nucleotit. Môi trường di truyền tự nhiên được hiểu là locut hệ gen tự nhiên hoặc nhiễm sắc thể ở cây nguyên gốc hoặc có mặt trong thư viện gen. Đối với thư viện gen, môi trường di truyền tự nhiên của trình tự axit nucleic tốt hơn nếu được giữ lại, ít nhất là một phần. Môi trường này cặp bên trình tự axit nucleic ít nhất ở một mặt và có chiều dài trình tự ít nhất là 50 bp, tốt hơn nếu ít nhất là 500 bp, đặc biệt tốt nếu ít nhất là 1000 bp, tốt nhất nếu ít nhất là 5000 bp. Catxet biểu hiện có trong tự nhiên – ví dụ hỗn hợp có trong tự nhiên của gen khởi đầu tự nhiên của trình tự các axit nucleic với trình tự axit nucleic tương ứng mã hóa cho polypeptit có thể sử dụng được trong phương pháp theo sáng chế, như được xác định ở trên – trở thành catxet biểu hiện chuyển gen khi catxet biểu hiện này được biến đổi bằng phương pháp tổng hợp không có trong tự nhiên (“nhân tạo”) như, ví dụ, xử lý gây đột biến chẳng hạn. Phương pháp thích hợp được nêu, ví dụ, trong US 5,565,350 hoặc WO 00/15815.

Như vậy, cây chuyển gen theo sáng chế được hiểu theo nghĩa, như nêu trên, rằng các axit nucleic được sử dụng trong phương pháp theo sáng chế không nằm ở locut tự nhiên của chúng trong hệ gen của cây, các axit nucleic này có thể được biểu hiện theo cách cùng loại hoặc theo cách khác loại. Tuy nhiên, như đã nêu ở trên, chuyển gen còn có nghĩa là, trong khi các axit nucleic theo sáng chế hoặc được sử dụng trong phương pháp theo sáng chế nằm ở vị trí tự nhiên của chúng trong hệ gen của cây, trình tự này đã được biến đổi so với trình tự tự nhiên, và/hoặc là trình tự điều tiết của trình tự tự nhiên đã được biến đổi. Tốt hơn nếu, chuyển gen được hiểu là việc biểu hiện các axit nucleic theo sáng chế tại locut không tự nhiên trong hệ gen, tức là việc biểu hiện cùng loại, hoặc tốt hơn nếu xảy ra sự biểu hiện khác loại của các axit nucleic. Cây chuyển gen được ưu tiên được nêu trong bản mô tả này. Hơn nữa, thuật ngữ “chuyển gen” chỉ cây bất kỳ, tế bào cây, thể chai, mô cây, hoặc phần cây, mà chứa tất cả hoặc một phần của ít nhất một polynucleotit tái tổ hợp. Trong nhiều trường hợp, tất cả hoặc một phần của polynucleotit tái tổ hợp được hợp nhất một cách ổn định vào nhiễm sắc thể hoặc thành phần ngoài nhiễm sắc thể thích hợp, sao cho nó được cho qua sự phát sinh liên tiếp. Đối với các mục đích của sáng chế, thuật ngữ “polynucleotit tái tổ hợp” chỉ polynucleotit mà đã được thay thế, sắp xếp lại, hoặc được biến đổi bằng

kỹ thuật di truyền. Các ví dụ bao gồm polynucleotit được tách dòng bất kỳ, hoặc các polynucleotit, mà được liên kết hoặc được kết hợp với trình tự khác loại. Thuật ngữ “tái tổ hợp” không chỉ sự thay thế của các polynucleotit mà tạo ra từ các trường hợp có trong tự nhiên, như sự đột biến đồng thời, hoặc từ sự phát sinh đột biến không đồng thời bằng cách nhân giống chọn lọc.

Cây trồng chứa đột biến do sự phát sinh đột biến không đồng thời và nhân giống chọn lọc được đề cập đến trong bản mô tả là cây không chuyển gen và được bao gồm trong sáng chế. Theo các phương án, trong đó cây là chuyển gen và bao gồm nhiều axit nucleic mut-PPO, axit nucleic có thể thu được từ các hệ gen khác nhau hoặc từ hệ gen giống nhau. Theo cách khác, theo các phương án, trong đó cây là không chuyển gen và bao gồm các axit nucleic mut-PPO, axit nucleic được bố trí trên các hệ gen khác nhau hoặc trên hệ gen giống nhau.

Theo một số phương án nhất định, sáng chế đề xuất cây kháng thuốc diệt cỏ mà được tạo ra bằng cách nhân giống đột biến. Cây này chứa polynucleotit mã hóa cho mut-PPO và có tính dung chịu đối với một hoặc nhiều “thuốc diệt cỏ chứa dẫn xuất benzoxazinon”. Các phương pháp như vậy có thể liên quan, ví dụ, đến việc cho cây trồng hoặc hạt giống tiếp xúc với chất gây đột biến, cụ thể chất gây đột biến hóa học như, ví dụ, etyl metansulfonat (EMS) và chọn lọc cho các cây trồng mà làm tăng cường tính dung chịu với ít nhất một hoặc nhiều thuốc diệt cỏ chứa dẫn xuất benzoxazinon.

Tuy nhiên, sáng chế không chỉ giới hạn ở cây trồng dung chịu thuốc diệt cỏ mà được tạo ra bằng phương pháp gây đột biến liên quan đến chất gây đột biến hóa học EMS. Phương pháp gây đột biến bất kỳ đã biết trong tình trạng kỹ thuật có thể được sử dụng để tạo ra cây kháng thuốc diệt cỏ theo sáng chế. Các phương pháp gây đột biến này có thể liên quan đến, ví dụ, việc sử dụng bất kỳ một hoặc nhiều trong số các chất gây đột biến sau: bức xạ, như tia X, tia gama (ví dụ, coban 60 hoặc xesi 137), neutron, (ví dụ, sản phẩm của sự phân cắt nhân của urani 235 trong bình phản ứng nguyên tử), bức xạ Beta (ví dụ, được phát xạ từ các chất đồng vị phóng xạ như phospho 32 hoặc carbon 14), và bức xạ cực tím (tốt hơn là từ 2500 đến 2900 nm), và các chất gây đột biến hóa học như các chất tương tự bazơ (ví dụ, 5-brom-uraxil), các hợp chất liên quan (ví dụ, 8-etoxy cafein), các chất kháng sinh (ví dụ, streptonigrin), các tác nhân alkyl hóa (ví dụ, hơi cay lưu huỳnh, hơi cay nitơ, epoxit, etylenamin, sulfat, sulfonat, sulfon,

lacton), azit, hydroxylamin, axit nitơ, hoặc các acridin. Cây kháng thuốc diệt cỏ còn có thể được tạo ra bằng cách sử dụng phương pháp nuôi cấy mô để chọn các tế bào cây bao gồm đột biến kháng thuốc diệt cỏ và sau đó tái lại cây kháng thuốc diệt cỏ từ đó. Xem, ví dụ, các Patent Mỹ số 5,773,702 và 5,859,348, các patent này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Để mô tả chi tiết hơn về nhân giống đột biến có thể được tìm thấy trong "Principals of Cây trồng Development" Fehr, 1993 Macmillan Publishing Company, việc bộc lộ của nó được đưa vào đây bằng cách viện dẫn ngoài định nghĩa nêu trên, thuật ngữ "cây" được dự định bao gồm cây thời vụ ở giai đoạn trưởng thành và phát triển bất kỳ, cũng như các mô hoặc các cơ quan bất kỳ (các phần cây) được lấy hoặc thu được từ cây trồng này trừ khi có quy định khác. Các phần cây bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, gốc, rễ, hoa, nõn, nhị hoa, lá, phôi, vùng mô phân sinh, mô thể chai, bao phấn, thể giao tử, thể bào tử, phấn hoa, tiểu bào tử, tế bào nguyên sinh, và dạng tương tự.

Cây theo sáng chế chứa ít nhất một axit nucleic mut-PPO hoặc axit nucleic PPO kiểu dại được biểu hiện quá mức, và có tính dung chịu tăng đối với thuốc diệt cỏ chứa dẫn xuất benzoxazinon so với giống kiểu dại của cây. Cây theo sáng chế có thể có nhiều axit nucleic kiểu dại hoặc mut-PPO từ các hệ gen khác nhau vì cây này có thể chứa nhiều hơn một hệ gen. Ví dụ, cây chứa hai hệ gen, thường được gọi là các hệ gen A và B. Vì PPO là một enzym chuyển hóa cần thiết, có thể giả sử rằng mỗi hệ gen có ít nhất một gen mã hóa cho enzym PPO (tức là ít nhất một gen PPO). Trong bản mô tả này, thuật ngữ "locus gen PPO" chỉ vị trí của gen PPO trên hệ gen, và các thuật ngữ "gen PPO" và "axit nucleic PPO" chỉ axit nucleic mã hóa cho enzym PPO. Axit nucleic PPO trên mỗi hệ gen khác về trình tự nucleotit của nó từ axit nucleic PPO trên hệ gen khác. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể xác định hệ gen có nguồn gốc của mỗi axit nucleic PPO đến lai di truyền và/hoặc phương pháp tạo trình tự hoặc phương pháp tiêu hóa exonucleaza đã biết đối với đã được các người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực biết.

Sáng chế bao gồm cây chứa một, hai, ba, hoặc nhiều alen mut-PPO, trong đó cây trồng này có tính dung chịu tăng đối với thuốc diệt cỏ chứa dẫn xuất benzoxazinon so với giống kiểu dại của cây. Alen mut-PPO có thể chứa trình tự nucleotit được chọn từ nhóm bao gồm polynucleotit như được xác định trong SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, hoặc 45, hoặc biến thể

hoặc dẫn xuất của chúng, polynucleotit mã hóa cho polypeptit như được xác định trong SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, hoặc 46, hoặc biến thể hoặc dẫn xuất, các thể tương đồng, ortholog, paralog của nó, polynucleotit chứa ít nhất 60 nucleotit liên tiếp của bất kỳ trong số các polynucleotit nêu trên; và polynucleotit bổ sung với bất kỳ trong số các polynucleotit nêu trên.

“Alen” hoặc “biến thể alen” là dạng thay thế của gen nào đó, được bố trí ở cùng vị trí nhiễm sắc thể. Các biến thể alen gồm Đa hình nucleotit đơn (Single Nucleotide Polymorphisms -các SNP), cũng như Đa hình cài xen/làm khuyết nhỏ (Small Insertion/Deletion Polymorphisms -INDEL). Kích thước của INDEL thường nhỏ hơn 100 bp. SNP và INDEL tạo thành tập hợp lớn nhất của các biến thể trình tự trong các chủng đa hình có trong tự nhiên của hầu hết các sinh vật.

Thuật ngữ “giống” chỉ nhóm cây trồng thuộc các loài được xác định bằng chung bộ tính chất thông thường hoặc các tính trạng được chấp nhận bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực là đủ để phân biệt một cây trồng hoặc giống với cây trồng hoặc giống khác. Không có ngụ ý ở thuật ngữ khác là tất cả các cây của cây trồng hoặc giống bất kỳ đã nêu sẽ giống hệt về gen ở toàn bộ gen hoặc mức độ phân tử hoặc là cây trồng đã nêu bất kỳ sẽ có gen xác định tính trạng ở tất cả các vị trí. Cây trồng hoặc giống được xem là “nhân giống thuần” đối với tính trạng cụ thể nếu, khi cây trồng nhân giống thuần hoặc giống được tự thụ phấn, tất cả thế hệ con có tính trạng này. Các thuật ngữ “dòng sinh sản” hoặc “dòng” chỉ nhóm các cây trong cây trồng được xác định bằng cách chung bộ các đặc tính hoặc tính trạng thông thường được chấp nhận bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực là đủ để phân biệt dòng sinh sản hoặc dòng với dòng sinh sản hoặc dòng khác. Không có ngụ ý ở thuật ngữ khác là tất cả các cây của dòng sinh sản hoặc dòng bất kỳ đã nêu sẽ giống hệt về gen ở toàn bộ gen hoặc mức phân tử hoặc ở cây trồng đã nêu bất kỳ sẽ có gen xác định tính trạng ở tất cả các vị trí. Dòng sinh sản hoặc dòng được xem là “nhân giống thuần” đối với tính trạng cụ thể nếu, khi dòng sinh sản thuần hoặc dòng sinh sản được tự thụ phấn, tất cả thế hệ con chứa tính trạng này. Theo sáng chế, tính trạng này sinh từ sự đột biến trong gen PPO của cây hoặc hạt giống.

Cây kháng thuốc diệt cỏ theo sáng chế mà bao gồm các polynucleotit mã hóa cho polypeptit mut-PPO cũng sử dụng trong các phương pháp làm tăng cường tính kháng

thuốc diệt cỏ của cây thông qua việc nhân giống cây thông liên quan đến sự sinh sản hữu tính. Các phương pháp này bao gồm sự lai cây đầu tiên mà là cây kháng thuốc diệt cỏ theo sáng chế với cây thứ hai mà có thể hoặc không thể kháng với cùng thuốc diệt cỏ hoặc các thuốc diệt cỏ là cây đầu tiên hoặc có thể kháng với thuốc diệt cỏ khác hoặc các thuốc diệt cỏ so với cây đầu tiên. Cây thứ hai có thể là cây bất kỳ mà có khả năng tạo ra cây thế hệ con có thể phát triển được (tức là, hạt giống) khi được bắt chéo với cây thứ nhất. Thông thường, nhưng không cần thiết, cây thứ nhất và thứ hai là các loài giống nhau. Các phương pháp này tùy ý có thể liên quan đến việc chọn lọc đối với các cây trồng thế hệ con mà bao gồm các polypeptit mut-PPO của cây trồng điều tiên và các đặc tính kháng thuốc diệt cỏ của cây thứ hai. Các cây thế hệ con được tạo ra bởi phương pháp này theo sáng chế có tính kháng tăng đối với thuốc diệt cỏ khi được so với cây thứ nhất hoặc thứ hai hoặc cả hai. Khi cây thứ nhất hoặc thứ hai có tính kháng đối với các thuốc diệt cỏ khác nhau, các cây thế hệ con sẽ có đặc tính dung chịu thuốc diệt cỏ kết hợp của các cây thứ nhất và thứ hai. Phương pháp theo sáng chế còn có thể liên quan đến một hoặc nhiều thế hệ của các cây thế hệ con lai ngược của giống lai đầu với cây của cùng dòng hoặc kiểu gen là cây thứ nhất hoặc thứ. Theo cách khác, thế hệ con của giống lai đầu hoặc giống lai bất kỳ sau đó có thể được lai với cây thứ ba tức là thuộc dòng khác nhau hoặc kiểu gen so với cây thứ nhất hoặc thứ hai. Sáng chế còn đề xuất cây, cơ quan cây, mô cây, tế bào cây, hạt giống, và tế bào chủ không phải là người mà được biến nạp với ít nhất một phân tử polynucleotit, kết cấu biểu hiện, hoặc vector biến nạp theo sáng chế. Cây, cơ quan cây, mô cây, tế bào cây, hạt giống, và tế bào chủ không phải là người được biến nạp này tăng cường tính dung chịu hoặc tính kháng đối với ít nhất một thuốc diệt cỏ, ở mức độ của thuốc diệt cỏ mà tiêu diệt hoặc ức chế sự sinh trưởng của cây, mô cây, tế bào cây, hoặc tế bào chủ không phải là người không được biến nạp, một cách tương ứng. Tốt hơn là, cây, mô cây, tế bào cây, và hạt giống được biến nạp theo sáng chế là *Arabidopsis thaliana* và cây thời vụ.

Cần phải hiểu rằng cây theo sáng chế có thể chứa axit nucleic PPO kiểu đại ngoài axit nucleic mut-PPO. Được dự tính rằng dòng dung chịu thuốc diệt cỏ chứa dẫn xuất benzoxazinon có thể chứa sự đột biến chỉ duy nhất của các PPO isoenzym. Do đó, sáng chế bao gồm cây trồng chứa một hoặc nhiều axit nucleic mut-PPO ngoài một hoặc nhiều axit nucleic PPO kiểu đại.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất hạt giống được tạo ra bởi cây chuyển gen

chứa tế bào cây theo sáng chế, trong đó hạt giống này là thuần chủng về tính kháng tăng đối với thuốc diệt cỏ chứa dẫn xuất benzoxazinon so với giống kiểu đại của hạt giống.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra tế bào cây chuyển gen với tính kháng tăng đối với thuốc diệt cỏ chứa dẫn xuất benzoxazinon so với giống kiểu đại của tế bào cây bao gồm bước biến nạp tế bào cây với kết cấu biểu hiện chứa axit nucleic mut-PPO.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra cây chuyển gen bao gồm các bước, (a) biến nạp tế bào cây với kết cấu biểu hiện chứa axit nucleic mut-PPO, và (b) tạo ra cây với tính kháng tăng đối với thuốc diệt cỏ chứa dẫn xuất benzoxazinon từ tế bào cây này.

Do vậy, axit nucleic mut-PPO theo sáng chế được tạo ra trong kết cấu biểu hiện để biểu hiện trong cây trồng đang quan tâm. Cấu trúc này sẽ bao gồm trình tự điều tiết được liên kết có điều khiển với trình tự axit nucleic mut-PPO theo sáng chế. Thuật ngữ "thành phần điều tiết" trong bản mô tả này chỉ polynucleotit mà có thể điều tiết sự phiên mã của polynucleotit được liên kết có điều khiển. Nó bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, gen khởi đầu, gen tăng cường, các intron, các 5' UTR, và các 3' UTR. Cụm từ "được liên kết có điều khiển" được dùng để chỉ liên kết chức năng giữa gen khởi đầu và trình tự thứ hai, trong đó trình tự gen khởi đầu bắt đầu và tạo ra sự phiên mã của trình tự ADN tương ứng với trình tự thứ hai. Nói chung, được liên kết có điều khiển có nghĩa là trình tự axit nucleic được liên kết là gần và, khi cần để nối hai vùng mã hóa protein, liền kề và trong khung đọc giống nhau. Cấu trúc có thể còn chứa ít nhất một gen khác được đồng biến nạp vào sinh vật. Theo cách khác, (các) gen khác có thể được tạo ra trên các kết cấu biểu hiện.

Kết cấu biểu hiện này được tạo ra với các vị trí giới hạn để lồng vào trình tự axit nucleic mut-PPO là dưới sự điều tiết phiên mã của các vùng điều tiết. Kết cấu biểu hiện có thể còn chứa yếu tố đánh dấu có thể chọn lọc các gen.

Kết cấu biểu hiện sẽ bao gồm hướng 5'-3' của sự phiên mã, vùng bắt đầu phiên mã và dịch mã (tức là, gen khởi đầu), trình tự axit nucleic mut-PPO theo sáng chế, và vùng kết thúc phiên mã và dịch mã (tức là, vùng kết thúc) có chức năng trong cây trồng. Gen khởi đầu có thể là trình tự tự nhiên hoặc tương tự, hoặc lạ hoặc khác loài,

đối với vật chủ cây trồng và/hoặc với trình tự axit nucleic mut-PPO theo sáng chế. Ngoài ra, gen khởi đầu có thể là trình tự tự nhiên hoặc theo cách khác trình tự tổng hợp. Trong đó gen khởi đầu là "lạ" hoặc "khác loại" đối với vật chủ cây trồng, được dự định là gen khởi đầu không được tìm thấy trong cây trồng tự nhiên mà gen khởi đầu được đưa vào đó. Trong đó gen khởi đầu là "lạ" hoặc "khác loại" với trình tự axit nucleic mut-PPO theo sáng chế, được dự định là gen khởi đầu không phải là gen khởi đầu tự nhiên hoặc có trong tự nhiên đối với trình tự axit nucleic mut-PPO được liên kết có điều khiển theo sáng chế. Trong bản mô tả này, gen thể khảm bao gồm trình tự mã hóa được liên kết có điều khiển với vùng bắt đầu phiên mã mà là khác loại với trình tự mã hóa.

Trong khi có thể có lợi là biểu hiện axit nucleic mut-PPO theo sáng chế có sử dụng các gen khởi đầu khác loại, các trình tự gen khởi đầu tự nhiên có thể được sử dụng. Các cấu trúc này sẽ thay đổi mức biểu hiện của protein mut-PPO trong cây trồng hoặc tế bào cây. Như vậy, kiểu hình của cây hoặc tế bào cây được biến đổi.

Vùng kết thúc có thể là tự nhiên với vùng bắt đầu phiên mã, có thể là tự nhiên với trình tự mut-PPO được liên kết có điều khiển đang quan tâm, có thể là tự nhiên với vật chủ cây trồng, hoặc có thể thu được từ nguồn khác (tức là, lạ hoặc khác loại với gen khởi đầu, trình tự axit nucleic mut-PPO đang quan tâm, vật chủ cây trồng, hoặc sự kết hợp bất kỳ của chúng). Các vùng kết thúc thuận tiện có sẵn từ Ti-plasmit của *A. tumefaciens*, như các vùng kết thúc octopin syntaza và nopaline syntaza. Xem thêm Guerineau et al. (1991) *Mol. Gen. Genet.* 262: 141-144; Proudfoot (1991) *Cell* 64:671-674; Sanfacon et al. (1991) *Genes Dev.* 5: 141-149; Mogen et al. (1990) *Plant Cell* 2: 1261-1272; Munroe et al. (1990) *Gene* 91: 151-158; Ballas et al. (1989) *Nucleic Acids Res.* 17:7891-7903; và Joshi et al. (1987) *Nucleic Acid Res.* 15:9627-9639. Khi thích hợp, (các) gen có thể được làm tối ưu để biểu hiện tăng trong cây trồng được biến đổi. Tức là, các gen có thể được tổng hợp có sử dụng các codon được ưu tiên ở cây trồng cho sự biểu hiện tăng. Xem, ví dụ, Campbell and Gowri (1990) *Plant Physiol.* 92: 1-11 để thảo luận đối với việc sử dụng codon được ưu tiên ở vật chủ. Các phương pháp là có sẵn trong lĩnh vực đối với các gen được ưu tiên ở cây trồng. Xem, ví dụ, các bằng Mỹ số 5,380,831, và 5,436,391, và Murray et al. (1989) *Nucleic Acids Res.* 17:477-498, trong bản mô tả này được vào đây bằng cách viện dẫn.

Sự biến đổi trình tự khác đã biết đối để làm tăng cường sự biểu hiện gen trong

vật chủ tế bào. Những biến đổi này bao gồm sự loại bỏ các trình tự mã hóa cho các tín hiệu polyadenyl hóa giả, các tín hiệu ở điểm ghép exon-intron, các đoạn lặp giống như transposon, và các trình tự được khác biệt rõ như vậy mà có thể là có hại đối với sự biểu hiện gen. Hàm lượng G-C của trình tự có thể được điều chỉnh đến các mức trung bình đối với vật chủ tế bào đã nêu, như được tính bằng cách việ dẫn đến các gen đã biết được biểu hiện trong tế bào chủ. Khi có thể, trình tự này được biến đổi để tránh việc các cấu trúc mARN phụ hình cặp tóc được dự đoán. Các trình tự nucleotit để làm tăng cường biểu hiện gen còn có thể được sử dụng trong vector biểu hiện ở cây trồng. Các vector này bao gồm các intron của *Adhl* ở cây ngô, gen intron1 (Callis et al. *Genes and Development* 1: 1183-1200, 1987), và các trình tự dẫn, (trình tự W-) từ virus Tobacco Mosaic (TMV), Maize Chlorotic Mottle Virus và Alfalfa Mosaic Virus (Gallie et al. *Axit nucleic Res.* 15:8693-8711, 1987 và Skuzeski et al. *Plant Mol. Biol.* 15:65-79, 1990). Intron thứ nhất từ vị trí shrunken-1 của cây ngô, đã thể hiện làm tăng sự biểu hiện của các gen trong cấu trúc gen thể khảm. Bằng Mỹ số 5,424,412 và 5,593,874 mô tả việc sử dụng các intron cụ thể trong các cấu trúc biểu hiện gen, và Gallie et al. (*Plant Physiol.* 106:929-939, 1994) cũng đã thể hiện rằng các intron là hữu ích để điều tiết sự biểu hiện gen trên cơ sở mô đặc hiệu. Để làm tăng thêm hoặc để làm tối ưu sự biểu hiện gen mut-PPO, vector biểu hiện trên cây trồng theo sáng chế còn có thể chứa trình tự ADN chứa các miền gắn thể gốc (các MAR). Các tế bào cây được biến nạp với hệ thống biểu hiện được biến đổi này, thì, có thể thể hiện sự biểu hiện quá mức hoặc sự biểu hiện chủ yếu của trình tự nucleotit theo sáng chế.

Các kết cấu biểu hiện có thể còn chứa các trình tự dẫn 5' trong cấu trúc kết cấu biểu hiện. Các trình tự dẫn có thể hoạt động để làm tăng cường sự dịch mã. Các gen dẫn dịch mã đã được biết đến trong tình trạng kỹ thuật này và bao gồm: chất dẫn picornavirus, ví dụ, chất dẫn EMCV (vùng không mã hóa Encephalomyocarditis 5') (Elroy-Stein et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:6126-6130); chất dẫn potyvirus, ví dụ, chất dẫn TEV (Tobacco Etch Virus) (Gallie et al. (1995) *Gene* 165(2):233-238), chất dẫn MDMV (Maize Dwarf Mosaic Virus) (*Virology* 154:9-20), và protein liên kết chuỗi nặng immunoglobulin ở người (BiP) (Macejak et al. (1991) *Nature* 353:90-94); chất dẫn không được dịch mã từ protein mARN phủ của virus alfalfa mosaic (AMV RNA 4) (Jobling et al. (1987) *Nature* 325:622-625); chất dẫn virus mosaic ở cây thuốc lá (TMV) (Gallie et al. (1989) trong *Molecular Biology of RNA*,

ed. Cech (Liss, New York), pp. 237-256); và chất dẫn virus clotic mottle ở cây ngô (MCMV) (Lommel et al. (1991) *Virology* 81:382-385). Xem thêm, Della-Cioppa et al. (1987) *Plant Physiol.* 84:965-968. Các phương pháp đã biết để làm tăng cường sự dịch mã cũng có thể được sử dụng, ví dụ, các intron, và tương tự.

Trong việc tạo ra catxet biểu hiện, các đoạn ADN khác nhau có thể được điều khiển, sao cho để tạo ra các trình tự ADN theo hướng thích hợp và, khi cần, trong khung đọc thích hợp. Đối với cần đề này, các đoạn thích ứng hoặc các đoạn liên kết có thể được sử dụng để kết hợp các đoạn ADN hoặc các thao tác khác có thể có liên quan để cung cấp các vị trí giới hạn thuận tiện, loại bỏ ADN dư, loại bỏ vị trí giới hạn, hoặc tương tự. Cho mục đích này, sự phát sinh đột biến in vitro, sửa đoạn môi, giới hạn, ủ, thay thế lại, ví dụ, sự chuyển tiếp và dị hoá, có thể có liên quan.

Nhiều gen khởi đầu có thể được sử dụng trong việc thực hành sáng chế. Các gen khởi đầu này có thể được chọn lọc dựa vào kết mong muốn. Axit nucleic có thể được kết hợp với các gen khởi đầu cấu thành, mô được ưu tiên, hoặc các gen khởi đầu khác đối với sự biểu hiện ở cây trồng. Các gen khởi đầu cấu thành này bao gồm, ví dụ, gen khởi đầu lõi của gen khởi đầu Rsyn7 và gen khởi đầu cấu thành khác được bộc lộ trong WO 99/43838 và patent Mỹ số 6,072,050; gen khởi đầu core CaMV 35S (Odell et al. (1985) *Nature* 313:810-812); rice actin (McElroy et al. (1990) *Plant Cell* 2: 163-171); ubiquitin (Christensen et al. (1989) *Plant Mol. Biol.* 12:619-632 và Christensen et al. (1992) *Plant Mol. Biol.* 18:675-689); pEMU (Last et al. (1991) *Theor. Appl. Genet.* 81:581- 588); MAS (Velten et al. (1984) *EMBO J.* 3:2723-2730); gen khởi đầu ALS (patent Mỹ số 5,659,026), và gen tương tự. Gen khởi đầu cấu thành khác bao gồm, ví dụ, các patent Mỹ số 5,608,149; 5,608,144; 5,604,121; 5,569,597; 5,466,785; 5,399,680; 5,268,463; 5,608,142; và 6,177,611.

Các gen khởi đầu ưu tiên ở mô có thể được sử dụng cho đích biểu hiện mut-PPO được tăng cường trong mô cây cụ thể. Các gen khởi đầu ưu tiên mô bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các gen khởi đầu ưu tiên lá, các gen khởi đầu ưu tiên rễ, các gen khởi đầu ưu tiên hạt, và gen khởi đầu ưu tiên thân. Các gen khởi đầu ưu tiên mô bao gồm Yamamoto et al. (1997) *Plant J.* 12(2):255-265; Kawamata et al. (1997) *Plant Cell Physiol.* 38(7):792-803; Hansen et al. (1997) *Mol. Gen. Genet.* 254(3):337-343; Russell et al. (1997) *Transgenic Res.* 6(2): 157-168; Rinehart et al. (1996) *Plant Physiol.* 112(3): 1331-1341; Van Camp et al. (1996) *Plant Physiol.* 112(2):525-535; Canevascini et al.

(1996) *Plant Physiol.* 112(2):513-524; Yamamoto et al. (1994) *Plant Cell Physiol.* 35(5):773-778; Lam (1994) *Results Probl. Cell Differ.* 20: 181- 196; Orozco et al. (1993) *Plant Mol Biol.* 23(6): 1129-1138; Matsuoka et al. (1993) *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 90(20):9586-9590; và Guevara-Garcia et al. (1993) *Plant J.* 4(3):495-505. Các gen khởi đầu có thể được biến đổi, nếu cần, để biểu hiện yếu. Theo một phương án, các axit nucleic đang quan tâm được tạo đích cho lục lạp để biểu hiện. Theo phương pháp này, trong đó axit nucleic đang quan tâm không được lồng một cách trực tiếp vào lục lạp, kết cấu biểu hiện sẽ còn chứa trình tự đích lục lạp chứa trình tự nucleotit mà mã hóa peptit lục lạp transit để hướng sản phẩm gen đang quan tâm đến các lục lạp. Các peptit chuyển đã được biết đến trong tình trạng kỹ thuật này. Liên quan đến các trình tự đích lục lạp, "được liên kết có điều khiển" có nghĩa là trình tự axit nucleic mã hóa cho peptit chuyển (tức là, trình tự đích lục lạp) được liên kết với axit nucleic mut-PPO theo sáng chế sao cho hai trình tự là liền kề và trong cùng khung đọc. Xem, ví dụ, Von Heijne et al. (1991) *Plant Mol Biol. Rep.* 9: 104-126; Clark et al. (1989) *J. Biol. Chem.* 264:17544-17550; Della-Cioppa et al. (1987) *Plant Physiol.* 84:965-968; Romer et al. (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 196:1414-1421; và Shah et al. (1986) *Science* 233:478-481. Trong khi các protein mut-PPO theo sáng chế bao gồm peptit chuyển lục lạp tự nhiên, peptit chuyển lục lạp bất kỳ đã biết trong tình trạng kỹ thuật có thể được dung hợp với trình tự axit amin của protein mut-PPO chín theo sáng chế bằng cách liên kết có điều khiển trình tự đích lục lạp với đầu 5' của trình tự nucleotit mã hóa cho protein mut-PPO chín theo sáng chế. Các trình tự đích lục lạp đã được biết đến trong tình trạng kỹ thuật này và bao gồm cấu trúc siêu phân tử nhỏ lục lạp của ribuloza-1,5-bisphosphat carboxylaza (Rubisco) (de Castro Silva Filho et al. (1996) *Plant Mol Biol.* 30:769-780; Schnell et al. (1991) *J. Biol. Chem.* 266(5):3335-3342); 5 -(enolpyruvyl)shikimat-3-phosphat syntaza (EPSPS) (Archer et al. (1990) *J. Bioenerg. Biomemb.* 22(6):789-810); tryptophan syntaza (Zhao et al. (1995) *J. Biol. Chem.* 270(11):6081-6087); plastocyanin (Lawrence et al. (1997) *J. Biol. Chem.* 272(33):20357-20363); chorismat syntaza (Schmidt et al. (1993) *J. Biol. Chem.* 268(36):27447-27457); và protein liên kết chất diệp lục a/b thu ánh sáng (LHBP) (Lamppa et al. (1988) *J. Biol. Chem.* 263: 14996-14999). Xem thêm Von Heijne et al. (1991) *Plant Mol Biol. Rep.* 9: 104- 126; Clark et al. (1989) *J. Biol. Chem.* 264:17544-17550; Della-Cioppa et al. (1987) *Plant Physiol.* 84:965-968; Ro-

mer et al. (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 196: 1414-1421; và Shah et al. (1986) *Science* 233:478-481.

Phương pháp để biến nạp các lục lạp đã được biết đến trong tình trạng kỹ thuật này. Xem, ví dụ, Svab et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:8526-8530; Svab and Maliga (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:913-917; Svab and Maliga (1993) *EMBO J.* 12:601-606. Phương pháp này dựa vào việc phân phối hạt bằng súng của ADN chứa yếu tố đánh dấu có thể chọn lọc và tạo đích ADN đến hệ gen thể hạt thông qua sự tái tổ hợp tương đồng. Ngoài ra, sự biến nạp thể hạt có thể được thực hiện bằng cách truyền sự hoạt hóa gen chuyển sinh ra thể hạt cảm bằng sự biểu hiện *ura* mô của polymeraza ARN mã hóa nhân và hướng đến thể hạt. Hệ thống như vậy đã được báo trong McBride et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:7301-7305. Axit nucleic đang quan tâm được tạo đích đến lục lạp có thể được làm tối ưu hóa đối với sự biểu hiện trong lục lạp để giải thích về sự khác nhau về việc sử dụng codon giữa nhân cây và vi cơ quan này. Theo cách này, axit nucleic đang quan tâm có thể được tổng hợp sử dụng codon *ura* lục lạp. Xem, ví dụ, patent Mỹ số 5,380,831, trong bản mô tả này được vào đây bằng cách viện dẫn.

Theo phương án được ưu tiên, axit nucleic mut-PPO chứa trình tự polynucleotit được chọn từ nhóm bao gồm: a) polynucleotit như được thể hiện trong SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, hoặc 45, hoặc biến thể hoặc dẫn xuất của chúng; b) polynucleotit mã hóa cho polypeptit như được thể hiện trong SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, hoặc 46, hoặc biến thể hoặc dẫn xuất của chúng; c) polynucleotit chứa ít nhất 60 nucleotit liên tiếp theo bất kỳ trong số) hoặc c); và d) polynucleotit bổ sung với polynucleotit theo bất kỳ trong số a) đến c).

Tốt hơn là, kết cấu biểu hiện còn chứa thêm vùng điều tiết sự khởi động phiên mã và vùng điều tiết sự khởi động dịch mã mà có chức năng ở cây.

Mặc dù các polynucleotit theo sáng chế có thể sử dụng làm gen đánh dấu chọn lọc được đối với sự biến nạp cây, các kết cấu biểu hiện theo sáng chế có thể bao gồm gen đánh dấu chọn lọc được khác nữa để chọn lọc các gen đã được biến nạp. Gen đánh dấu chọn lọc, bao gồm các gen theo sáng chế, được sử dụng để chọn lọc các gen đã được biến nạp hoặc các mô. Gen đánh dấu bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các

gen mã hóa cho kháng chất kháng sinh, như các gen mã hóa cho neomycin phosphotransferaza II (NEO) và hygromycin phosphotransferaza (HPT), cũng như các gen mang lại tính kháng đối với hợp chất diệt cỏ, như glufosinat amoni, bromoxynil, các imidazolinon, và 2,4-diclophenoxyaxetat (2,4-D). Thông thường, xem, Yarranton (1992) *Curr. Opin. Biotech.* 3 :506-511; Christophers on et al (1992) *Proc. Natl. Acad. ScL USA* 89:6314-6318; Yao et al. (1992) *Cell* 71:63-72; Reznikoff (1992) *MoI Microbiol* 6:2419-2422; Barkley et al (1980) in *The Operon*, pp. 177-220; Hu et al (1987) *Cell* 48:555-566; Brown et al (1987) *Cell* 49:603-612; Figge et al (1988) *Cell* 52:713-722; Deuschle et al (1989) *Proc. Natl Acad. AcL USA* 86:5400-5404; Fuerst et al (1989) *Proc. Natl Acad. ScL USA* 86:2549-2553; Deuschle et al (1990) *Science* 248:480-483; Gossen (1993) Ph.D. Thesis, University of Heidelberg; Reines et al (1993) *Proc. Natl Acad. ScL USA* 90: 1917-1921; Labow et al (1990) *MoI Cell Biol* 10:3343-3356; Zambretti et al (1992) *Proc. Natl Acad. ScL USA* 89:3952-3956; Bairn et al (1991) *Proc. Natl Acad. ScL USA* 88:5072-5076; Wyborski et al (1991) *Nucleic Acids Res.* 19:4647-4653; Hillenand-Wissman (1989) *Topics MoI Struc. Biol* 10: 143-162; Degenkolb et al (1991) *Antimicrob. Agents Chemother.* 35: 1591-1595; Kleinschmidt et al (1988) *Biochemistry* 27: 1094-1104; Bonin (1993) Ph.D. Thesis, University of Heidelberg; Gossen et al (1992) *Proc. Natl Acad. ScL USA* 89:5547- 5551; Oliva et al (1992) *Antimicrob. Agents Chemother.* 36:913-919; Hlavka et al (1985) *Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. 78 (Springer-Verlag, Berlin); Gill et al (1988) *Nature* 334:721-724. Những bậc lộ như vậy trong bản mô tả này được vào đây bằng cách viện dẫn. Danh mục trên của gen đánh dấu chọn lọc được không có nghĩa là làm hạn chế. Gen đánh dấu có thể chọn lọc bất kỳ có thể được sử dụng trong sáng chế.

Sáng chế còn đề xuất vectơ biểu hiện tái tổ hợp được phân tách abo gồm kết cấu biểu hiện chứa axit nucleic mut-PPO như được mô tả ở trên, trong đó sự biểu hiện của vectơ trong tế bào chủ làm tăng tính dung chịu đối với thuốc diệt cỏ chứa dẫn xuất benzoxazinon so với giống kiểu đại của tế bào chủ. Trong bản mô tả này, thuật ngữ “vectơ” chỉ phân tử axit nucleic có khả năng vận chuyển axit nucleic khác mà nó được liên kết vào đó. Một loại vectơ là “plasmit,” mà chỉ ADN vòng dài kép xoắn mà đoạn ADN bổ sung vào đó có thể được nối. Loại vectơ khác là vectơ virus, trong đó các đoạn ADN bổ sung có thể được nối vào hệ gen virus. Các vectơ nhất định có khả năng phiên bản tự chủ trong tế bào chủ mà chúng được đưa vào đó (ví dụ, vectơ virus có

nguyên gốc vi khuẩn của vector phiên bản và vector episom ở động vật có vú). Vector khác (ví dụ, vector không phải epison ở động vật có vú) được hòa nhập vào hệ gen của tế bào chủ khi đưa vào tế bào chủ, và nhờ đó được phiên bản cùng với hệ gen chủ. Hơn nữa, vector nhất định có khả năng hướng sự biểu hiện của các gen mà chúng được liên kết có điều khiển vào đó. Vector này được đề cập đến trong bản mô tả là “vector biểu hiện.” Thông thường, vector biểu hiện là có ích trong các kỹ thuật ADN tái tổ hợp thường ở dạng các plasmid. Trong bản mô tả sáng chế, “plasmid” và “vector” có thể được sử dụng lẫn nhau là plasmid là dạng được sử dụng thông dụng nhất của vector. Tuy nhiên, sáng chế được dự định bao gồm các dạng khác của vector biểu hiện, như vector virus (ví dụ, retrovirus tái phiên bản, các adenovirus, và các virus liên quan đến adeno), mà có chức năng tương đương.

Vector biểu hiện tái tổ hợp theo sáng chế bao gồm axit nucleic theo sáng chế ở dạng thích hợp để biểu hiện axit nucleic trong tế bào chủ, có nghĩa là vector biểu hiện tái tổ hợp bao gồm một hoặc nhiều trình tự điều hòa, được chọn trên cơ sở của các tế bào chủ được sử dụng để biểu hiện, mà được liên kết có điều khiển với trình tự axit nucleic được biểu hiện. Trình tự điều tiết bao gồm các trình tự mà hướng sự biểu hiện liên tiếp của trình tự nucleotit trong nhiều loại tế bào chủ và trình tự là hướng sự biểu hiện của trình tự nucleotit chỉ trong một số tế bào chủ hoặc trong một số điều kiện. Sẽ được đánh giá bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực rằng kiểu vector biểu hiện có thể phụ thuộc vào các yếu tố như sự lựa chọn của tế bào chủ được biến nạp, mức biểu hiện polypeptit mong muốn, v.v.. Vector biểu hiện theo sáng chế có thể được đưa vào các tế bào chủ bằng cách đó tạo ra các polypeptit hoặc các peptit, bao gồm các polypeptit hoặc các peptit dung hợp, được mã hóa bởi axit nucleic được nêu trong bản mô tả này (ví dụ, polypeptit mut-PPO, các polypeptit dung hợp, v.v..).

Theo phương án được ưu tiên của sáng chế, polypeptit mut-PPO được biểu hiện trong các cây và các tế bào cây như các tế bào cây đơn bào (như tảo) (See Falciatore et al., 1999, *Marine Biotechnology* 1(3):239-251 và các tài liệu tham chiếu trong đó) và các tế bào cây từ cây cao hơn (ví dụ, các cây có hạt, như cây thời vụ). polynucleotit mut-PPO có thể “được đưa vào” trong tế bào cây bằng cách kỳ phương pháp nào, bao gồm sự chuyển nhiễm, sự biến nạp hoặc sự tải nạp, đục lỗ điện, bắn hạt, nhiễm khuẩn nông nghiệp, listic sinh học, và dạng tương tự.

Các phương pháp thích hợp để biến nạp hoặc chuyển nhiễm các tế bào chủ bao

gồm các tế bào cây có thể được tìm thấy trong Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) và các tài liệu thư viện khác như Methods in Molecular Biology, 1995, Vol. 44, Agrobacterium protocols, ed: Gartland and Davey, Humana Press, Totowa, New Jersey. Vì sự dung chịu tăng đối với thuốc diệt cỏ chứa dẫn xuất benzoxazinon là tính trạng chung được hy vọng là được di truyền vào giống rộng của các cây như cây ngô, cây lúa mỳ, cây lúa mạch đen, yến mạch, tiểu hắc mạch, cây lúa, cây lúa mạch, cây đậu tương, đậu tương, cây bông, cải hạt dầu và cải canola, manihot, hồ tiêu, cây hướng dương và cúc vạn thọ, cây học cà như cây khoai tây, cây thuốc lá, cây cà tím, và cây cà chua, loài Vicia, đậu Hà Lan, cỏ linh lăng, cây bụi rậm (cà phê, ca cao, chè), loài Salix, cây gỗ (cọ dầu, dừa), thảm cỏ lâu năm, và cây làm thức ăn gia súc, các cây thời vụ này là các cây đích cũng được ưu tiên cho kỹ thuật di truyền như là một phương án khác của sáng chế. Theo phương án được ưu tiên, cây là cây thời vụ. Cây làm thức ăn gia súc bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, Wheatgrass, Canarygrass, Bromegrass, Wildrye Grass, Bluegrass, Orchardgrass, Alfalfa, Salfoin, Birdsfoot Trefoil, Alsike Clover, Red Clover, và Sweet Clover.

Theo một phương án của sáng chế, sự chuyển nhiễm của polynucleotit mut-PPO vào cây đạt được bằng cách chuyển gen được tạo ra bởi *Agrobacterium*. Một phương pháp sự biến nạp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực là nhúng thực vật có hoa vào dung dịch *Agrobacteria*, trong đó *Agrobacteria* chứa axit nucleic mut-PPO, sau đó lai giống các giao tử được biến nạp. Sự biến nạp cây được tạo ra bởi *Agrobacterium* có thể được thực hiện bằng cách sử dụng ví dụ GV3101(pMP90) (Koncz and Schell, 1986, Mol. Gen. Genet. 204:383-396) hoặc LBA4404 (Clontech) chủng *Agrobacterium tumefaciens*. Sự biến nạp có thể được thực hiện bằng kỹ thuật biến nạp và tái sinh tiêu chuẩn (Deblaere et al., 1994, Nucl. Acids. Res. 13:4777-4788; Gelvin, Stanton B. và Schilperoort, Robert A, Plant Molecular Biology Manual, 2nd Ed. - Dordrecht : Kluwer Academic Publ., 1995. - in Sect., Ringbuc Zentrale Signatur: BT11-P ISBN 0-7923-2731-4; Glick, Bernard R. và Thompson, John E., Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, Boca Raton : CRC Press, 1993 360 S., ISBN 0-8493-5164-2). Ví dụ, cải hạt dầu có thể được biến nạp thông qua lá mầm hoặc trụ dưới lá mầm sự biến nạp (Moloney et al., 1989, Plant Cell Report 8:238-242; De

Block et al., 1989, Plant Physiol. 91:694-701). Sử dụng chất kháng sinh cho *Agrobacterium* và lựa chọn cây phụ thuộc vào vector nhị nguyên và chủng *Agrobacterium* được dùng để biến nạp. Sự lựa chọn cải hạt đầu thường được thực hiện bằng cách sử dụng kanamycin là gen đánh dấu cây thích hợp. Chuyển gen do *Agrobacterium* tạo ra để cây lanh có thể được thực hiện bằng cách sử dụng, ví dụ, kỹ thuật được mô tả bởi Mlynarova et al., 1994, Plant Cell Report 13:282-285. Ngoài ra, sự biến nạp của cây đậu tương có thể được thực hiện bằng cách sử dụng ví dụ kỹ thuật như được mô tả trong patent châu Âu số 0424 047, patent Mỹ số 5,322,783, patent châu Âu số 0397 687, patent Mỹ số 5,376,543, hoặc patent Mỹ số 5,169,770. Sự biến nạp của cây ngô có thể đạt được bằng cách bắn hạt, sự hấp thụ ADN qua trung gian polyetylen glycol, hoặc thông qua kỹ thuật sợi silic cacbua. Xem, ví dụ, Freeling and Walbot "The maize handbook" Springer Verlag: New York (1993) ISBN 3-540-97826-7). Ví dụ cụ thể về sự biến nạp cây ngô được tìm thấy trong patent Mỹ số 5,990,387, và ví dụ cụ thể về sự biến nạp cây lúa mì có thể được tìm thấy trong đơn PCT số WO 93/07256.

Theo sáng chế, polynucleotit mut-PPO được đưa vào có thể được duy trì trong tế bào cây ổn định nếu nó được đưa vào replicon tự miễn không nhiễm sắc thể hoặc được hợp chất vào nhiễm sắc thể cây. Theo cách khác, polynucleotit mut-PPO được đưa vào có thể có mặt trên vector không phiên mã ngoài nhiễm sắc thể và được biểu hiện chuyển tiếp hoặc hoạt tính chuyển tiếp. Theo một phương án, vi sinh vật tái tổ hợp tương đồng có thể được tạo ra trong đó polynucleotit mut-PPO được hợp nhất vào nhiễm sắc thể, vector được chuẩn bị mà có chứa ít nhất một phần của gen PPO mà sự khuyết đoạn, bổ sung, hoặc thay thế đã được đưa vào gen đó để cách thay thế bằng cách đó, ví dụ, phá vỡ chức năng, gen PPO nội sinh và tạo ra gen mut-PPO. Để tạo ra sự đột biến điểm thông qua sự tái tổ hợp tương đồng, lai ADN-ARN có thể được sử dụng trong kỹ thuật đã biết là gắn kết khảm chimeraplasty (Cole-Strauss et al., 1999, Nucleic Acids Research 27(5):1323-1330 và Kmiec, 1999, Gene therapy American Scientist 87(3):240-247). Quy trình tái tổ hợp tương đồng khác trong các loài *Triticum* cũng đã được biết rõ trong lĩnh vực và được dự định để sử dụng trong bản mô tả.

Trong vector tái tổ hợp tương đồng, gen mut-PPO có thể được kẹp bên ở đầu 5' và 3' của nó bằng phân tử axit nucleic bổ sung của gen PPO cho phép tái tổ hợp tương đồng xuất hiện giữa gen mut-PPO ngoại sinh được mang bởi vector và gen PPO nội sinh, trong vi sinh vật hoặc cây. Phân tử axit nucleic PPO kẹp bên khác có độ dài đủ

để tái tổ hợp tương đồng thành công với gen nội sinh. Thông thường, vài trăm cặp bazơ cho đến các kilobazơ của ADN kẹp bên (cả hai ở các đầu 5' và 3') được bao gồm trong vector (xem ví dụ, Thomas, K. R., và Capecchi, M. R., 1987, Cell 51:503 để mô tả sự tái tổ hợp tương đồng vector hoặc Strepp et al., 1998, PNAS, 95(8):4368-4373 đối với sự tái tổ hợp dựa vào cADN trong *Physcomitrella patens*). Tuy nhiên, vì gen mut-PPO thông thường khác với gen PPO ở vài axit amin, trình tự kẹp bên không phải lúc nào cũng cần. Sự tái tổ hợp tương đồng vector được đưa vào vi sinh vật hoặc tế bào cây (ví dụ, thông qua ADN được tạo ra bởi polyetylen glycol), và các tế bào trong đó gen mut-PPO được đưa vào được tái tổ hợp đồng nhất với gen PPO nội sinh được chọn lọc bằng các kỹ thuật đã biết trong tình trạng kỹ thuật.

Theo phương án khác, các vi sinh vật tái tổ hợp có thể được tạo ra mà chứa các hệ được chọn cho phép biểu hiện điều tiết của gen đã đưa vào. Ví dụ, việc bao gồm gen mut-PPO trên vector đặt nó trong trong việc kiểm soát lac operon cho phép biểu hiện gen mut-PPO chỉ trong sự có mặt của IPTG. Hệ điều tiết này đã biết rõ trong lĩnh vực.

Khía cạnh khác của sáng chế liên quan đến các tế bào chủ vector biểu hiện tái tổ hợp theo sáng chế đã được đưa vào nó. Các thuật ngữ “tế bào chủ” và “tế bào chủ tái tổ hợp” được sử dụng thay thế lẫn nhau trong bản mô tả này. Cần phải hiểu rằng các thuật ngữ này không chỉ mà chúng còn áp dụng cho thể hệ con hoặc thể hệ con tiềm tàng của tế bào này. Bởi vì một số biến thể có thể xuất hiện trong các thể hệ nối tiếp do sự đột biến hoặc ảnh hưởng môi trường, thể hệ con này thực tế, có thể không giống hệt với tế bào cha mẹ, nhưng cần được bao gồm trong phạm vi của thuật ngữ như được sử dụng trong bản mô tả này. Tế bào chủ có thể là tế bào không nhân hoặc có nhân chuẩn bất kỳ. Ví dụ, polynucleotit mut-PPO có thể được biểu hiện trong các tế bào vi khuẩn như *C. glutamicum*, tế bào côn trùng, tế bào nấm, hoặc tế bào động vật có vú (như tế bào trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO) hoặc các tế bào COS), tảo, lông mao, các tế bào cây, nấm hoặc các vi sinh vật khác như *C. glutamicum*. Các tế bào chủ thích hợp là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật.

Tế bào chủ theo sáng chế, như tế bào chủ không nhân hoặc có nhân điển hình trong môi trường nuôi cấy, có thể được sử dụng để tạo ra (tức là, biểu hiện) polynucleotit mut-PPO. Theo đó, sáng chế còn đề xuất phương pháp tạo ra polypeptit mut-PPO bằng cách sử dụng tế bào chủ theo sáng chế. Theo một phương án, phương pháp này

bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ theo sáng chế (mà vector biểu hiện tái tổ hợp mã hóa cho polypeptit mut-PPO đã được đưa vào tế bào chủ này, hoặc gen mã hóa cho PPO kiểu dại hoặc polypeptit mut-PPO đã được đưa vào trong hệ gen của tế bào chủ này) trong môi trường thích hợp cho đến khi polypeptit mut-PPO được tạo ra. Theo phương án khác, phương pháp này còn bao gồm thêm bước phân lập polypeptit mut-PPO ra khỏi môi trường hoặc tế bào chủ. Khía cạnh khác của sáng chế liên quan đến các polypeptit mut-PPO được phân lập, và các phần có hoạt tính sinh học của nó. Polypeptit “được phân lập” hoặc “được tinh chế” hoặc phần hoạt tính sinh học của nó là không có một số nguyên liệu tế bào khi được tạo ra bằng các kỹ thuật ADN tái tổ hợp, hoặc các tiền chất hóa học hoặc các hóa chất khác khi được tổng hợp hóa học. Cụm từ “hầu như không có nguyên liệu tế bào” bao gồm các chế phẩm của polypeptit mut-PPO trong đó polypeptit được tách ra từ một số thành phần tế bào của các tế bào trong đó nó được tạo ra tự nhiên hoặc tái tổ hợp. Theo một phương án, cụm từ “hầu như không có nguyên liệu tế bào” bao gồm các chế phẩm của polypeptit mut-PPO có ít hơn khoảng 30% (theo khối lượng khô) của nguyên liệu không phải mut-PPO (còn được biết đến trong bản mô tả là “nhiễm bản polypeptit”), tốt hơn nữa là ít hơn khoảng 20% nguyên liệu không phải mut-PPO, tốt hơn nữa là ít hơn khoảng 10% nguyên liệu không phải mut-PPO, và tốt nhất là ít hơn khoảng 5% nguyên liệu không phải mut-PPO.

Khi polypeptit mut-PPO, hoặc phần có hoạt tính sinh học của nó, được tạo ra bằng cách tái tổ hợp, cũng được ưu tiên là hầu như không có môi trường nuôi cấy, tức là, môi trường nuôi cấy thể hiện ít hơn khoảng 20%, tốt hơn nữa là ít hơn khoảng 10%, và tốt nhất là ít hơn khoảng 5% thể tích của chế phẩm polypeptit. Cụm từ “hầu như không có các tiền chất hóa học hoặc các hóa chất khác” bao gồm các chế phẩm của polypeptit mut-PPO trong đó polypeptit được tách ra từ các tiền chất hóa học hoặc các hóa chất khác mà liên đến việc tổng hợp polypeptit. Theo một phương án, cụm từ “hầu như không có các tiền chất hóa học hoặc các hóa chất khác” bao gồm các chế phẩm của polypeptit mut-PPO có ít hơn khoảng 30% (theo khối lượng khô) của các tiền chất hóa học hoặc các hóa chất không phải mut-PPO, tốt hơn nữa là ít hơn khoảng 20% tiền chất hóa học hoặc các hóa chất không phải mut-PPO, tốt hơn nữa là ít hơn khoảng 10% các tiền chất hóa học hoặc các hóa chất không phải mut-PPO, và tốt nhất là ít hơn khoảng 5% các tiền chất hóa học hoặc các hóa chất không phải mut-PPO. Theo các phương án được ưu tiên, các polypeptit được phân lập, hoặc các phần có hoạt tính sinh

học của nó, thiếu các polypeptit nhiễm bản từ sinh vật giống nhau mà polypeptit mut-PPO thu được từ sinh vật đó. Thông thường, các polypeptit này được tạo ra bằng sự biểu hiện tái tổ hợp của, ví dụ, polypeptit mut-PPO ở cây mà khác với, hoặc trong các vi sinh vật như *C. glutamicum*, lông mìn, tảo, hoặc nấm.

Như được mô tả ở trên, sáng chế mô tả hợp phần và các phương pháp để làm tăng sự dung chịu dẫn xuất benzoxazinon của cây thời vụ hoặc hạt giống khi so với giống kiểu dại của cây hoặc hạt giống. Theo phương án được ưu tiên, sự dung chịu dẫn xuất benzoxazinon của cây thời vụ hoặc hạt giống được tăng lên sao cho cây hoặc hạt giống có thể chịu được sự áp dụng thuốc diệt cỏ chứa dẫn xuất benzoxazinon tốt hơn là khoảng 1-1000 g ai ha⁻¹, tốt hơn nữa là 20-160 g ai ha⁻¹, và tốt nhất là 40-80 g ai ha⁻¹. Trong bản mô tả này, để “chịu được” áp dụng thuốc diệt cỏ chứa dẫn xuất benzoxazinon có nghĩa là cây hoặc không bị chết hoặc không bị tổn thương bởi việc áp dụng này.

Hơn nữa, sáng chế đề xuất các phương pháp liên quan đến việc sử dụng ít nhất một thuốc diệt cỏ chứa dẫn xuất benzoxazinon như được mô tả trong chi tiết ở trên.

Trong các phương pháp này, thuốc diệt cỏ chứa dẫn xuất benzoxazinon có thể được áp dụng theo phương pháp bất kỳ đã biết trong tình trạng kỹ thuật bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, xử lý hạt giống, xử lý đất, và xử lý lá. Trước khi áp dụng, thuốc diệt cỏ chứa dẫn xuất benzoxazinon có thể được chuyển hóa thành chế phẩm thông thường, ví dụ các dung dịch, nhũ tương, huyền phù, bụi, bột, bột nhão và hạt. Dạng sử dụng phụ thuộc vào mục đích dự định cụ thể; trong mỗi trường hợp, cần đảm bảo sự phân bố mịn và đều của hợp chất theo sáng chế.

Bằng cách tạo ra cây có sự dung chịu tăng đối với thuốc diệt cỏ chứa dẫn xuất benzoxazinon, nhiều giống của các chế phẩm có thể được sử dụng để bảo vệ cây khỏi cỏ dại, sao cho để làm tăng cường sự phát triển cây và làm giảm sự cạnh tranh các chất dinh dưỡng. Thuốc diệt cỏ chứa dẫn xuất benzoxazinon có thể được sử dụng bằng cách tự khổng chế cho trước nhú mầm, sau nhú mầm, trước khi trồng và tại lúc trồng cỏ dại ở các vùng xung quanh cây thời vụ được mô tả trong bản mô tả, hoặc chế phẩm thuốc diệt cỏ chứa dẫn xuất benzoxazinon có thể được sử dụng mà chứa các chất phụ gia khác. Thuốc diệt cỏ chứa dẫn xuất benzoxazinon còn có thể được sử dụng là xử lý hạt

giống. Các chất phụ gia được phát hiện trong chế phẩm thuốc diệt cỏ chứa dẫn xuất benzoxazinon bao gồm các thuốc diệt cỏ khác, các chất tẩy rửa, các chất phụ gia, các tác nhân rải, các chất dính, các chất ổn định, hoặc các chất tương tự. Thuốc diệt cỏ chứa chế phẩm dẫn xuất benzoxazinon có thể là chế phẩm ẩm hoặc khô và có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, bột có thể chảy, chất cô có thể nhũ hóa, và chất cô lỏng. Thuốc diệt cỏ chứa dẫn xuất benzoxazinon và chế phẩm thuốc diệt cỏ có thể có thể được sử dụng theo các phương pháp thông thường, ví dụ, bằng cách phun, tưới, rắc bụi hoặc dạng tương tự.

Các chế phẩm thích hợp được mô tả chi tiết trong PCT/EP2009/063387 và PCT/EP2009/063386, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Cũng cần được hiểu rằng phần mô tả ở trên liên quan đến các phương án được ưu tiên của sáng chế và rằng một số thay đổi có thể được thực hiện mà không vượt ra khỏi phạm vi của sáng chế. Sáng chế còn được minh họa bằng các ví dụ sau, mà không được cấu trúc theo cách bất kỳ mà làm giới hạn phạm vi của nó. Trái lại, cần được hiểu rõ ràng là phương pháp này có thể có các phương án khác nhau, sự biến đổi, và tương đương của nó, mà, sau khi đọc phần mô tả trong bản mô tả, có thể gợi ý người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực mà không vượt ra khỏi tinh thần của sáng chế và/hoặc phạm vi của các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Phát sinh đột biến ở điểm trực tiếp của *AmaranthusPPO*

Tách dòng *Amaranthus PPO*

Trình tự mã hóa *Amaranthustuberculatus* đối với các isoform kháng hoặc có thể dễ bị ảnh hưởng bởi PPO, và kết hợp thể đột biến, (SEQ ID No: 1, 3, 5, 7) được tổng hợp và được tách dòng bởi Geneart (Geneart AG, Regensburg, Đức).

Các plasmid được phân lập từ *E. coli* TOP10 bằng cách thực hiện vi điều chế plasmid (plasmid miniprep) và được xác nhận bằng cách giải trình tự ADN.

Biểu hiện và tinh chế PPO kiểu đại tái tổ hợp và thể đột biến

(được lấy từ: Franck E. Dayan, Pankaj R. Daga, Stephen O. Duke, Ryan M. Lee, Patrick J. Tranel, Robert J. Doerksen. Biochemical and structural consequences of a

glycine deletion in the α -8 helix of protoporphyrinogen oxidase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1804 (2010), 1548-56)

Các dòng vô tính trong vector pRSET được biến nạp vào chủng BL21(DE3)-pLysS của *E. coli*. Các tế bào được phát triển trong 250 mL LB với $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ carbenicillin, lắc qua đêm ở nhiệt độ 37°C . Các môi trường nuôi cấy được pha loãng trong 1 L LB với chất kháng sinh và được phát triển ở nhiệt độ 37°C . Lắc trong 2 giờ, kích thích bằng 1 mM IPTG và được phát triển ở nhiệt độ 25°C . Lắc trong 5 giờ nữa. Các tế bào được thu hoạch bằng cách ly tâm ở tốc độ 16000m/s^2 , rửa với 0,09% NaCl, và được bảo quản ở nhiệt độ -80°C .

Các tế bào được làm tan bằng cách sử dụng French press ở 140 MPa trong 50 mM natri phosphat pH 7,5, 1M NaCl, 5 mM imidazol, 5% glyxerol, và $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ leupeptin. Sau khi phân giải, bổ sung 0,5 U benzonas (Novagen, EMD Chemicals, Inc., Gibbstown, NJ) và PMSF (nồng độ cuối cùng là 1 mM). Mảnh vụn tế bào được loại bỏ bằng cách ly tâm ở tốc độ 30000m/s^2 . Các protein PPO gắn his được tinh chế trên cột Hitrap Chelating HP được hoạt hóa bằng niken (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., Piscataway, NJ) được cân bằng với 20 mM natri phosphat pH 8,0, 50 mM NaCl, 5 mM imidazol, 5 mM MgCl_2 , 0,1mM EDTA, và 17% glyxerol.

PPO được rửa giải với 250 mM imidazol. Protein hoạt tính được khử muối trên cột PD-10 (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., Piscataway, NJ) được cân bằng với 20 mM đệm natri phosphat, pH 7,5, 5 mM MgCl_2 , 1 mM EDTA và 17% glyxerol. Mỗi lít môi trường nuôi cấy được tạo ra khoảng 10 mg PPO tinh khiết, chất này được bảo quản ở nhiệt độ -20°C cho đến khi được sử dụng trong các thử nghiệm.

Thử nghiệm hoạt tính PPO

Thử nghiệm Enzym PPO (không tái tổ hợp). Protein PPO (EC 1.3.3.4) được chiết từ các lá bao mầm hoặc chồi non (150g khối lượng sạch) của cây ngô được phát triển trong bóng tối, cây lu lu đực, cây bìm bìm, và cây giống lá nhưng như được mô tả trước đây (Grossmann et al. 2010). Trước khi thu hoạch, các cây giống được để xanh lá cây trong 2 giờ trong ánh sáng để đạt được các hoạt tính enzym đặc hiệu cao nhất trong các phân đoạn thylakoit ở các nồng độ chất diệp lục thấp. Ở nồng độ chất diệp lục cao, việc làm dừng đáng kể phát huỳnh quang xảy ra, mà làm hạn chế lượng thylakoit màu xanh mà có thể được sử dụng trong thử nghiệm. Các nguyên liệu cây

được đông hóa lạnh bằng thiết bị trộn Braun bằng cách sử dụng tỷ lệ giữa khối lượng sạch so với thể tích là 1:4. Chất đệm đông hóa bao gồm tris(hydroxymetyl)aminometan (Tris)-HCl (50 mM; pH 7,3), sucroza (0,5 M), magie clorua (1 mM), axit etylendiamintetraaxetic (EDTA) (1 mM) và albumin huyết thanh bò (2 g L⁻¹). Sau khi lọc qua bốn lớp của Miracloth, các chế phẩm thể hạt thô thu được sau khi ly tâm ở tốc độ 100.000 m/s² trong 5 phút và tái huyền phù trong chất đệm đông hóa trước khi ly tâm ở tốc độ 1500 m/s² trong 2 phút để loại bỏ cặn bã tế bào thô. Dịch nổi được ly tâm ở tốc độ 40000 m/s² trong 15 phút và đoạn vên tròn được tái huyền phù trong 1 ml chất đệm chứa Tris-HCl (50 mM; pH 7,3), EDTA (2 mM), leupeptin (2 μ M), pepstatin (2 μ M) và glyxerol (200 ml L⁻¹) và được bảo quản ở nhiệt độ -80°C cho đến khi sử dụng. Protein được xác định trong chất chiết enzym với albumin huyết thanh bò như tiêu chuẩn. Hoạt tính PPO được phân tích bằng flo kế bằng cách theo dõi tốc độ hình thành Proto từ protoporphyrinogen IX được khử bằng hóa chất dưới các điều kiện vận tốc ban đầu. Hỗn hợp thử nghiệm bao gồm Tris-HCl (100 mM; pH 7,3), EDTA (1 mM), dithiothreitol (5 mM), Tween 80 (0,085%), protoporphyrinogen IX (2 μ M), và 40 μ g protein được chiết trong tổng thể tích là 200 μ l. Phản ứng này được bắt đầu bằng cách bổ sung chất nền rotoporphyrinogen IX ở nhiệt độ 22°C. Saflufenacil, flumioxazin và butafenacil được điều chế trong dung dịch dimetyl sulfoxit (DMSO) (nồng độ 0,1 mM của DMSO trong thử nghiệm) và bổ sung vào hỗn hợp thử nghiệm với nồng độ nằm trong khoảng từ 0,005 pM đến 5 μ M trước khi ủ. Sự phát huỳnh quang được theo dõi một cách trực tiếp từ hỗn hợp thử nghiệm bằng cách sử dụng POLARstar Optima / Galaxy (BMG) với kích thích ở 405 nm và sự phát xạ được theo dõi ở 630 nm. Hoạt tính không phải enzyme với sự có mặt của chất chiết không được hoạt hoá bằng nhiệt là không đáng kể. Sự ức chế hoạt tính enzyme được kích thích bằng thuốc diệt cỏ được biểu hiện theo phần trăm ức chế liên quan đến các đối chứng chưa được xử lý. Nồng độ mol của hợp chất cần để ức chế 50% enzym (các giá trị IC₅₀) được tính toán bằng cách khớp các giá trị với phương trình phản ứng liều lượng bằng cách sử dụng phương pháp phân tích hồi quy không tuyến tính.

Thử nghiệm PPO Enzym (tái tổ hợp). Proto được mua từ nhà cung cấp Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI). Protogen được điều chế theo Jacobs và Jacobs (N.J. Jacobs, J.M. Jacobs, Assay for enzymatic protoporphyrinogen oxidation, a late step in heme synthesis, Enzyme 28 (1982) 206–219). Các phân tích được tiến hành trong 100 mM

natri phosphat pH 7,4 với 0,1 mM EDTA, 0,1% Tween 20, 5 μ M FAD, và 500mM imidazol. Đường cong phản ứng liều lượng với các chất ức chế PPO, axiflofen, lactofen, benzoxazinon 1.a.35, hoặc dẫn xuất benzoxazinon được ưu tiên (trong đó X là O hoặc S, R⁴ là hydro, C1-C6-alkyl, C1-C6-haloalkyl, C3-C6-xycloalkyl, C3-C6-alkenyl, C3-C6-haloalkenyl, C3-C6-alkynyl, C3-C6-haloalkynyl, C1-C6-alkoxy hoặc C3-C6-xycloalkyl-C1-C6-alkyl, R⁵ là hydro, NH₂, C1-C6-alkyl hoặc C3-C6-alkynyl, R⁶ là hydro hoặc C1-C6-alkyl, hoặc sự kết hợp của chúng), được xác định với sự có mặt của 150 μ M Protogen. Độ rộng dải tần kích thích hoặc phát xạ được đặt ở lần lượt ở 1,5 và 30 nm. Tất cả các thử nghiệm được tiến hành thành hai bản hoặc ba bản và được xác định bằng cách sử dụng POLARstar Optima / Galaxy (BMG) với kích thích ở 405 nm và sự phát xạ được theo dõi ở 630 nm.

Các giá trị phản ứng liều lượng (IC₅₀) đối với các enzym PPO được thể là lớn hơn giá trị IC₅₀ đối với enzym PPO kiểu dại (không được thể) (Bảng 4a và 4ab). Bảng này chỉ ra rằng enzym PPO đã được thể này có tính kháng vốn có đối với benzoxazinon và đối với một số trong các dẫn xuất benzoxazinon được thử nghiệm. Enzym PPO được thể dG210 và R128L là các enzym PPO được thể đã biết được tìm thấy trong *Amaranthustuberculatus* và được thể hiện là chịu trách nhiệm đối với tính kháng *in planta* PPO đối với giống của thuốc diệt cỏ PPO (Dayan et al., 2010, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1804:1548). Điều này chỉ ra rằng các enzym PPO được thể khác được liệt kê, với giá trị IC₅₀ cao hơn so với dG210 hoặc R128L, cũng là các enzym PPO được thể mà chịu trách nhiệm đối với tính kháng *in planta* chống lại giống của thuốc diệt cỏ PPO, bao gồm benzoxazinon 1.a.35 (Bảng 4a) và dẫn xuất benzoxazinon được liệt kê (Bảng 4b). Tất cả các enzym PPO được thể thể hiện hoạt tính enzym có thể so sánh được, sự thay đổi đơn vị phát huỳnh quang cho mỗi phút (FU/phút) so với enzym PPO kiểu dại (Bảng 4a). Ngoài ra, tất cả các giá trị hoạt tính đối với các enzym PPO được thể là lớn hơn so với enzym PPO dG210 được thể. Enzym PPO dG210 được thể có hoạt tính đủ đối với chức *in planta*. Điều này chỉ ra rằng tất cả các enzym PPO được thể khác đã chỉ ra là cũng có hoạt tính đủ cho chức *in planta*.

Bảng 4a: Giá trị IC₅₀ (M) đối với enzym kiểu dại và enzym PPO được thể axit amin, đối với chất ức chế benzoxazinon 1.a.35.

Sự thay thế	IC ₅₀ (M) Benzoxazinon	Hoạt tính (FU/phút)
kiểu dại	1,20E-10	800
R128A	1,40E-10	731
R128L	7,73E-10	750
dG210	2,12E-09	80
L397D	2,72E-10	250
L397N	2,35E-10	165
F420M	2,75E-10	353
F420I	4,95E-10	179
F420L	9,93E-10	203
F420V	2,45E-09	200
R128A, F420M	6,24E-09	378
R128A, F420I	1,98E-08	330
R128A, F420L	2,38E-08	281

Bảng 4b: Các giá trị IC₅₀ (M) đối với enzym kiểu dại và enzym PPO được thể axit amin, đối với dẫn xuất benzoxazinon được liệt kê.

Sự thay thế	IC ₅₀ (M) Các thể tương tự benzoxazinon							Hoạt tính (FU/phút)
	X là O	R ⁴ là hydro	X là O, R ⁴ là hydro	R ⁵ là hydro	R ⁶ là hydro	X là O, R ⁵ là hydro	X là O, R ⁶ là hydro	
Kiểu dại	2,20E-10	2,99E-10	2,04E-08	1,78E-09	1,78E-09	2,27E-08	2,27E-08	800
R128L	3,82E-08	2,02E-07	3,57E-06					750
dG210	3,33E-08	1,10E-07	1,64E-06					80
L397D				4,41E-07	4,41E-07	2,43E-06	2,43E-06	250
F420I				6,17E-07	6,17E-07	1,00E-05	1,00E-05	179
R128A, F420I				1,00E-05	1,00E-05	1,00E-05	1,00E-05	330

Ví dụ 2: Sàng lọc các tế bào tạo được gây đột biến để nhận diện các dòng vô tính dung chịu thuốc diệt cỏ và sự đột biến nguyên nhân trong các gen PPO.

Để tạo ra những đột biến liên quan đến sự kháng thuốc diệt cỏ chứa dẫn xuất benzoxazinon trong các gen PPO, có thể được sử dụng sự phát sinh đột biến do hóa chất hoặc UV. Đặc biệt là các sinh vật đơn bào như *Chlamydomonas reinhardtii* hoặc *Scenedesmus obliquus* là hữu ích để nhận diện sự đột biến trội trong sự kháng thuốc diệt cỏ.

Các tế bào tảo của các chủng *Chlamydomonas reinhardtii* CC-503 và CC-1691 (Duke University, Durham, USA) được nhân giống trong môi trường TAP (Gorman và Levine (1965) PNAS 54: 1665-1669) bằng cách lắc không đổi ở tốc độ 100 vòng/phút, 22°C và 30 $\mu\text{mol Phot} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-2}$ chiếu sáng. *Scenedesmus obliquus* (University of Gottingen, Đức) được nhân giống trong môi trường tảo như được mô tả (Boger and Sandmann, (1993) Trong tài liệu: Target assays for modern herbicides and 15 related phytotoxic compounds, Lewis Publishers) trong điều kiện nuôi cấy như đã nêu đối với *Chlamydomonas*. Sàng lọc hợp chất được thực hiện ở chiếu sáng 450 $\mu\text{mol Phot} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-2}$.

Các chủng mẫn cảm của *Chlamydomonas reinhardtii* hoặc *Scenedesmus obliquus* được gây đột biến với 0,14 M etylmetansulfonat (EMS) trong 1 giờ như được mô tả bởi Loppes (1969, 20 Mol Gen Genet 104: 172-177) Các chủng chịu được nhận diện bằng cách sàng lọc các tế bào đã được gây đột biến trên các đĩa dung dịch dinh dưỡng rắn chứa thuốc diệt cỏ chứa dẫn xuất benzoxazinon đang quan tâm ở các nồng độ gây chết người phụ thuộc vào hoạt tính hợp chất trong chủng tảo cụ thể.

Sự khuếch đại của các gen PPO từ *Chlamydomonas reinhardtii* kiểu dại hoặc có tính kháng từ ADN hệ gen hoặc bản sao ADN làm khuôn mẫu được tiến hành bằng các kỹ thuật PCR tiêu chuẩn với oligonucleotit ADN. Sự đột biến được nhận diện bằng cách so sánh các trình tự PPO kiểu dại và thể đột biến bằng cách sử dụng trình tự sắp thẳng hàng tool Align X (Vector NTI Advance Software Version 10,3, Invitrogene, Carlsbad, CA, USA).

Fig. 2 thể hiện sự chọn lựa của các chủng *Chlamydomonas reinhardtii* có tính kháng đối với thuốc diệt cỏ 1.a.35 có dẫn xuất benzoxazinon. (A) Các tế bào đã được gây đột biến được đặt trên môi trường rắn mà không có tác nhân chọn lọc. (B) Các tế bào đã được gây đột biến được đặt trên môi trường rắn chứa 1×10^{-7} M dẫn xuất benzoxazinon I.a.35. Các tế bào mà có tính kháng đối với thuốc diệt cỏ chứa dẫn xuất

benzoxazinon tạo thành các khuẩn lạc (được tạo vòng và được đánh số 33, 34, 35 và 36), trong khi các tế bào mẫn cảm không sinh trưởng. Số lượng các cụm khuẩn lạc trên đĩa A so với B, thể hiện rằng các khuẩn lạc trên đĩa B có tính kháng đối với dẫn xuất benzoxazinon I.a.35.

Fig. 3 thể hiện sự tái phát triển của các chủng *Chlamydomonas reinhardtii* được chọn, có tính kháng đối với thuốc diệt cỏ 1.a.35 có dẫn xuất benzoxazinon. (A) Các tế bào kiểu dại trong môi trường lỏng mà không có tác nhân chọn lọc. (B) Các tế bào kiểu dại trong môi trường lỏng chứa dẫn xuất benzoxazinon I.a.35 tăng (nằm trong khoảng 1×10^{-9} - 5×10^{-6} M). (C) Các tế bào đã được gây đột biến trong môi trường lỏng mà không có tác nhân chọn lọc. (D1, D2, E1, E2) Các chủng gây đột biến và được chọn trong môi trường lỏng, chứa dẫn xuất benzoxazinon I.a.35 tăng (nằm trong khoảng 1×10^{-9} - 5×10^{-6} M). Các chủng có tính kháng đối với thuốc diệt cỏ 1.a.35 có dẫn xuất benzoxazinon, phát triển đến sự sinh trưởng thể hiện màu đậm hơn. Các chủng mẫn cảm không phát triển và vẫn còn màu. Mật độ tế bào cao hơn trong môi trường lỏng với các tế bào sinh trưởng là chịu trách nhiệm cho màu đậm hơn. Mật độ thấp hơn phát triển dường như có màu sáng hơn hoặc hoàn toàn trong suốt.

Ví dụ 3. Sàng lọc quần thể *Arabidopsis thaliana* EMS được gây đột biến để nhận diện cây dung chịu với thuốc diệt cỏ và xác định sự đột biến nguyên nhân trong các gen PPO.

Quần thể M2 của các cây *Arabidopsis thaliana* đã được xử lý bằng EMS thu được từ Lehle Seeds (Round Rock, TX, USA). Việc sàng lọc được thực hiện bằng cách dàn hạt giống *Arabidopsis* trên dung dịch dinh dưỡng half-strength murashige skoog nutrient solution chứa 0,5% tác nhân gel Gelrite® và thuốc diệt cỏ chứa dẫn xuất benzoxazinon (0,1 đến 500 μ M), phụ thuộc vào hoạt tính của hợp chất. Các đĩa được ủ trong buồng phát triển trong chu trình sáng:tối 16:8 giờ ở nhiệt độ 22°C cho đến ba tuần. Cây dung chịu thể hiện phenotyp tẩy trắng ít mạnh hơn trong được trồng trong đất và phát triển đến maturity trong các điều kiện nhà kính. Trong giai đoạn cây thể hoa thị, các đĩa lá được thu hoạch từ cây dung chịu với thuốc diệt cỏ chứa dẫn xuất benzoxazinon để phân lập ADN hệ gen với DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Đức) hoặc mARN tổng với RNeasy Plant Mini Kit (Quagen, Hilden, Đức).

Trình tự PPO được khuếch đại bằng các kỹ thuật PCR tiêu chuẩn từ ADN hệ gen với các oligonucleotit tương ứng. Để khuếch đại PPO từ mARN, ADN bản sao được tổng hợp in vitro bằng cách sử dụng phiên mã ngược Superscript III Reverse Transcriptase (Invitrogene, Carlsbad, CA, USA). Sau khi tách dòng các sản phẩm PCR trong plasmid giải trình tự tiêu chuẩn, trình tự ADN của các gen PPO bị đột biến được nhận diện bằng các kỹ thuật giải trình tự tiêu chuẩn. Sự đột biến được nhận diện bằng cách so sánh các trình tự PPO kiểu dại và thể đột biến bằng cách sử dụng dụng cụ sắp thẳng hàng trình tự Align X (Vector NTI Advance Software Version 10,3, Invitrogene, Carlsbad, CA, Mỹ).

Ví dụ 4. Cây dung chịu thuốc diệt cỏ chứa dẫn xuất benzoxazinon có các trình tự PPO kiểu dại hoặc bị đột biến.

Cây đậu tương (*Glycine max*) dung chịu thuốc diệt cỏ chứa dẫn xuất benzoxazinon được tạo ra bằng phương pháp như được mô tả bởi Olhoft *et al.* (US patent 2009/0049567). Các trình tự PPO bị đột biến được tách dòng bằng các kỹ thuật tách dòng tiêu chuẩn như được mô tả trong Sambrook *et al.* (Molecular cloning (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press) trong vector nhị nguyên chứa ca xet gen đánh dấu có tính kháng (AHAS) và trình tự PPO bị đột biến (được ký hiệu là GOI) ở giữa trình tự gen khởi đầu ubiquitin (PcUbi) và trình tự kết thúc nopalin syntaza (NOS). Các plasmid nhị nguyên được đưa vào *Agrobacterium tumefaciens* để biến nạp cây. Các cấu trúc plasmid được đưa vào các tế bào mô phân sinh nách của cây đậu tương ở mẫu ban đầu của đoạn cây trồng từ hạt thông qua sự biến nạp do *Agrobacterium* gây ra. Sau khi cấy ghép và cùng trồng với *Agrobacteria*, các đoạn cây này được chuyển đến môi trường kích thích cành non mà không lựa chọn trong một tuần. Các đoạn cây này sau đó được chuyển đến môi trường kích thích cành non với 1-3 μM imazapyr (Arsenal) trong 3 tuần để chọn các tế bào đã được biến nạp. Các đoạn cây có các đốm thể chai/cành non khỏe mạnh ở hạch ban đầu sau đó được chuyển nhiễm đến môi trường shoot elongation medium chứa 1-3 μM imazapyr cho đến khi cành non được dài ra hoặc đoạn cây chết. Cây chuyển gen được mọc rễ, phải qua phân tích TaqMan để thể hiện gen chuyển, được chuyển đến đất và được phát triển đến chín trong nhà kính. Sự biến nạp của cây ngô được thực hiện bằng phương pháp được mô tả bởi McElver and Singh (WO 2008/124495). Cấu trúc vector biến nạp ở cây chứa các trình

tự PPO bị đột biến được đưa vào phôi ở cây ngô chưa chín thông qua sự biến nạp do *Agrobacterium* gây ra.

Các tế bào được biến nạp được chọn lọc trong môi trường chọn lọc đã được bổ sung với 0,5-1,5 μM imazethapyr trong 3-4 tuần. Các cây non chuyển gen được tái tạo trên môi trường tái sinh cây và được mọc rễ sau đó. Các cây non chuyển gen phải qua phân tích TaqMan về sự có mặt của gen chuyển trước khi được chuyển vào hỗn hợp trồng chậu và phát triển đến trưởng thành trong nhà kính. *Arabidopsis thaliana* được biến nạp với các trình tự PPO bị đột biến bằng phương pháp ngâm cây cỏ như được mô tả bởi McElver and Singh (WO 2008/124495). Sự biến nạp của *Oryza sativa* (cây lúa) được thực hiện bằng sự biến nạp tế bào nguyên sinh như được mô tả bởi Peng *et al.* (US 6653529) cây chuyển gen T0 hoặc T1 của cây đậu tương, cây ngô, cây lúa và *Arabidopsis thaliana* chứa các trình tự PPO bị đột biến được thử nghiệm đối với sự chịu được cải thiện đối với thuốc diệt cỏ được dẫn xuất từ PPO trong các nghiên cứu nhà kính.

Ví dụ 5. Thử nghiệm bổ sung và sàng lọc chức năng.

(xem thêm: William L. Patzoldt, Aaron G. Hager, Joel S. McCormick, và Patrick J. Tranel. A codon deletion confers resistance to herbicides inhibiting protoporphyrinogen oxidase. PNAS 103 (33), 12329-34)

Tạo thư viện PPO:

Thư viện gen PPO được tạo ra bằng cách phát sinh đột biến ngẫu nhiên (error prone PCR) hoặc sự phát sinh đột biến bão hòa của gen PPO (Geneart AG, Regensburg, Đức), và được tách dòng vào vector biểu hiện (pBAD-TOPO) để sàng lọc in vivo. Ngoài ra, kiểu được làm ngắn của các gen PPO kiểu dại và thể đột biến được tách dòng thành vector biểu hiện pBAD-TOPO (Invitrogen) sao cho sự dịch mã được bắt đầu ở codon bắt đầu ATG thứ hai. PPO cADN là PCR được khuếch đại bằng cách sử dụng đoạn xuôi 5-CAGGAATAAGTAATGGGCAACATTTCTGAG- 3, chứa cả điểm gắn ribosom (AGGA) và codon bắt đầu ATG, và đoạn ngược 5-GAAGAATTACGCGGTCTTCTCATC-3 chứa codon dừng. Các plasmit PPO dễ bị ảnh hưởng và có tính kháng giả được dùng cho chủng đột biến transformant hemG của *E. coli*, SASX38, được tạo ra bởi Harry Dailey (University of Georgia, Athens, GA). Chủng SASX38 *E. coli* được giữ trong môi trường LB đã được bổ sung với 20 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$

hematin. Các cụm khuẩn lạc được biến nạp của SASX38, và kiểm soát không được biến nạp, được thử nghiệm về khả năng của chúng để phát triển một mình trên môi trường LB hoặc đã được bổ sung với $20 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ hematin hoặc với lactofen chất ức chế PPO và các thuốc diệt cỏ chứa dẫn xuất benzoxazinon nằm trong khoảng từ 0,01 đến 500 μM , và được ủ ở nhiệt độ 37°C trong 14 giờ.

Thử nghiệm bổ sung và sàng lọc đã sử dụng chủng đột biến *hemG* (PPO) của *Escherichia coli*, SASX38, (Sasarman, A., Chartrand, P., Lavoie, M., Tardif, D., Proschek, R. & Lapointe, C. (1979) *J. Gen. Microbiol.* 113, 297–303.) để đánh giá tác dụng đột biến PPO đối với các phản ứng thuốc diệt cỏ PPO. Chủng SASX38 phát triển rất chậm trễ khi được cung cấp với hem ngoại sinh hoặc được giải thoát với nguồn thay thế khác của PPO. Hơn nữa, bởi vì *E. coli* kiểu dại dung chịu một cách tự nhiên với các chất ức chế PPO, sử dụng chủng SASX38 cho phép thử nghiệm tương đối trực tiếp đối với độ nhạy của thuốc diệt cỏ của các dạng PPO kiểu dại và thể đột biến từ *A. tuberculatus*. Chủng SASX38 *E. coli* được biến nạp với các cấu trúc plasmid mã hóa cho PPO kiểu dại và thể đột biến. Các cấu trúc có khả năng giải thoát sự phát triển của chủng SASX38 *E. coli*, Như vậy chỉ ra rằng các gen PPO đã mã hóa các protein chức năng. Tuy nhiên, việc bổ sung môi trường phát triển với thuốc diệt cỏ chứa dẫn xuất benzoxazinon đã làm ức chế một cách đột ngột sự phát triển của *E. coli* được biến nạp với PPO kiểu dại nhưng không phải *E. coli* được biến nạp với một số thể đột biến PPO.

Ví dụ 6. Các điều kiện nuôi cấy mô

Thử nghiệm phát sinh đột biến môi trường nuôi cấy mô *in vitro* đã được phát triển để phân lập và biệt hóa mô cây (ví dụ, mô cây ngô, cây lúa) tức là dung chịu với thuốc diệt cỏ chứa chất ức chế protoporphyrinogen oxidaza, (ví dụ saflufenacil, bifenox, diuron, lactofen, butafenacil). Thử nghiệm này sử dụng biến đổi tách dòng soma mà được tìm thấy trong môi trường nuôi cấy mô *in vitro*. Sự đột biến đồng thời thu được từ sự biến đổi tách dòng soma có thể được tăng cường bằng sự phát sinh đột biến hóa học và sự lựa chọn tiếp theo theo cách từng bước, khi làm tăng nồng độ của thuốc diệt cỏ.

Sáng chế đề xuất các điều kiện nuôi cấy mô để khuyến khích sự phát triển của friable, embryogenic cây ngô hoặc cây lúa thể chai mà có thể tái sinh. Các mô sẹo

được bắt đầu từ 4 cây ngô hoặc cây lúa khác nhau bao gồm các loài *Zea mays* và *Japonica* (Taipei 309, Nipponbare, Koshihikari) và *Indica* (Indica 1), một cách tương ứng. Hạt giống được vô trùng bề mặt trong 70% etanol trong khoảng 1 phút sau đó 20% chất tẩy trắng Clorox trên thị trường trong 20 phút. Hạt giống được rửa với nước vô trùng và được dàn mỏng trên môi trường kích thích thể chai. Môi trường kích thích thể chai khác nhau được thử nghiệm. Các danh mục thành phần cho môi trường được thử nghiệm được trình bày trong Bảng 5.

Bảng 5

Thành phần	Nhà cung cấp	R001M	R025M	R026M	R327M	R008M	MS711R
Vitamin B5	Sigma					1,0 X	
Muối MS	Sigma			1,0 X	1,0 X	1,0 X	1,0 X
Vitamin MS	Sigma			1,0 X	1,0 X		
Muối N6	Phytotech	4,0 g/L	4,0g/L				
N6 vitamins	Phytotech	1,0 X	1,0 X				
L-Prolin	Sigma	2,9 g/L	0,5 g/L				1.2 g/L
Axit Casamin	BD	0,3 g/L	0,3 g/L	2 g/L			
Casein Hydrolysate	Sigma						1,0 g/L
L-Asp Monohydrat	Phytotech						150 mg/L
Axit nicotinic	Sigma						0,5 mg/L
Pyridoxin HCl	Sigma						0,5 mg/L
Thiamin HCl	Sigma						1,0 mg/L
Myo-inositol	Sigma						100 mg/L
MES	Sigma	500 mg/L	500 mg/L	500 mg/L	500 mg/L	500 mg/L	500 mg/L
Maltoza	VWR	30 g/L	30 g/L	30 g/L	30 g/L		
Sorbitol	Duchefa			30 g/L			
Sucroza	VWR					10 g/L	30 g/L
NAA	Duchefa					50 µg/L	
2,4-D	Sigma	2,0 mg/L					1,0 mg/L
MgCl ₂ ·6H ₂ O	VWR					750 mg/L	
→pH		5.8	5.8	5.8	5.8	5.8	5.7
Gelrit	Duchefa	4,0 g/L				2,5 g/L	
Agarosa Typ 1	Sigma		7,0 g/L	10 g/L	10 g/L		
→Nồi hấp		15 phút	15 phút	15 phút	15 phút	15 phút	20 phút
Kinetin	Sigma		2,0 mg/L	2,0 mg/L			
NAA	Duchefa		1,0 mg/L	1,0 mg/L			

Thành phần	Nhà cung cấp	R001M	R025M	R026M	R327M	R008M	MS711R
ABA	Sigma		5,0 mg/L				
Cefotaxim	Duchefa		0,1 g/L	0,1 g/L	0,1 g/L		
Vancomyxin	Duchefa		0,1 g/L	0,1 g/L	0,1 g/L		
G418 Disulfat	Sigma		20 mg/L	20 mg/L	20 mg/L		

Môi trường kích thích thể chai R001M được chọn sau khi thử nghiệm một số các biến thể. Môi trường nuôi cấy được giữ trong bóng tối ở nhiệt độ 30°C. Thể chai tạo phôi được gieo lại vào môi trường sạch sau 10-14 ngày.

Ví dụ 7. Lựa chọn dung chịu thuốc diệt cỏ Calli.

Ngay khi xác định được các điều kiện nuôi cấy mô, việc thiết lập thêm các điều kiện lựa chọn được thiết lập thông qua việc phân tích sự sống sót mô trong đường cong tiêu diệt với saflufenacil, bifenox, diuron, lactofen, butafenacil, axiflofen, thuốc diệt cỏ chứa dẫn xuất benzoxazinon. Xem xét cẩn thận sự tích tụ của thuốc diệt cỏ trong mô, cũng như sự tồn tại và độ ổn định của nó trong các tế bào và môi trường nuôi cấy được thực hiện. Trong suốt các thử nghiệm này, đã thiết lập liều lượng dưới mức gây chết cho lựa chọn ban đầu của nguyên liệu đột biến.

Sau khi thiết lập liều ban đầu của saflufenacil, bifenox, diuron, lactofen, butafenacil, axiflofen và thuốc diệt cỏ chứa dẫn xuất benzoxazinon trong môi trường lựa chọn, các mô được chọn lọc theo kiểu từng bước bằng cách làm tăng nồng độ của chất ức chế PPO với mỗi lần chuyển cho đến khi các tế bào được thu hồi mà phát triển mạnh mẽ với sự có mặt của các liều lượng độc tố. Các mô sẹo tạo ra còn được gieo lại cứ 3-4 tuần đến R001M bằng tác nhân lựa chọn. Trên 26.000 mô sẹo phải qua sự chọn lọc trong 4-5 gieo lại cho đến khi áp suất chọn lọc là trên mức độc tố như được xác định bằng đường cong tiêu diệt và quan sát mô trường nuôi cấy tiếp. Theo cách khác, môi trường nuôi cấy lỏng được bắt đầu từ các mô sẹo trong MS711R với lắc chậm và gieo lại hằng tuần. Ngay khi môi trường nuôi cấy lỏng được thiết lập, chất lựa chọn được bổ sung một cách trực tiếp vào bình tại mỗi lần gieo lại. Sau 2-4 chu trình lựa chọn chất lỏng, môi trường nuôi cấy được chuyển đến thiết bị lọc trên môi trường R001M rắn để phát triển thêm.

Ví dụ 8. Sự tái sinh cây

Mô chịu được tái sinh và được biệt hóa về mặt phân tử đối với sự đột biến trình tự gen PPO và/hoặc về mặt hóa sinh đối với hoạt tính PPO được biến đổi với sự có

mặt của tác nhân chọn lọc. Ngoài ra, các gen liên quan một cách trực tiếp và/hoặc gián tiếp trong sinh tổng hợp tetrapyrrol và/hoặc con đường chuyển hóa cũng được tạo trình tự để biệt hóa sự đột biến. Cuối cùng, các enzym làm thay đổi sự chết (ví dụ sự chuyển hóa, sự chuyển vị, sự vận chuyển) cũng là trình tự đối với những đột biến được biệt hóa.

Sau lựa chọn thuốc diệt cỏ, các mô sẹo được tái tạo bằng cách sử dụng trạng thái môi trường của R025M trong 10 – 14 ngày, R026M trong khoảng 2 tuần, R327M cho đến khi chồi non được tạo thành khỏe mạnh được phát triển, và R008S cho đến khi chồi non được mọc rễ tốt để chuyển đến nhà kính. Sự tái sinh được thực hiện trong ánh sáng. Tác nhân lựa chọn không được bao gồm trong quá trình tái sinh.

Ngay khi rễ khỏe được thiết lập, M0 regenerant cấy vào nhà kính trong bình vuông hoặc tròn. Các cây giống được giữ trong cốc nhựa trong cho đến khi chúng thích ứng với các điều kiện nhà kính. Nhà kính được đặt chu trình ngày/đêm ở nhiệt độ 27°C/21°C (80°F/70°F) với ánh sáng natri ở áp suất cao 600W bổ sung ánh sáng để duy trì độ dài ngày 14 giờ. Các cây được tưới nước theo nhu cầu, phụ thuộc vào thời tiết và bón phân hàng ngày.

Ví dụ 9. Phân tích trình tự.

Mô lá được thu gom từ các cây tách dòng được tách ra để cấy và được phân tích dưới các dạng đơn lẻ. ADN hệ gen được chiết bằng cách sử dụng bộ kit Wizard® 96 Magnetic ADN Plant System (Promega, US Patent Nos. 6,027,945 & 6,368,800) như được hướng dẫn bởi nhà sản xuất. ADN được phân lập là PCR được khuếch đại bằng cách sử dụng đoạn môi xuôi và ngược thích hợp.

Việc khuếch đại bằng PCR được thực hiện bằng cách sử dụng ADN polymeraza Hotstar Taq (Qiagen) sử dụng chương trình chu trình nhiệt tiếp đất (touchdown thermocycling program) như sau: 96°C trong 15 phút, tiếp theo là 35 chu trình (96°C, 30 giây; 58°C – 0,2°C cho mỗi chu trình, 30 giây; 72°C. 3 phút và 30 giây), 10 phút ở nhiệt độ 72°C.

Các sản phẩm PCR được kiểm tra đối với nồng độ và kích thước đoạn thông qua điện di gel agarosa. Các sản phẩm PCR được khử phosphoryl hóa được phân tích bằng trình tự trực tiếp bằng cách sử dụng các đoạn môi PCR (DNA Landmarks, hoặc Entelechon). Hồ sơ vết biểu đồ ghi màu (.scf) được phân tích để đột biến liên quan đến

gen kiểu đại sử dụng vector NTI Advance 10™ (Invitrogen). Dựa vào thông tin trình tự, đột biến được xác định trong một vài cá thể. Phân tích trình tự được thực hiện trên biểu đồ ghi màu đại diện và sắp thẳng hàng AlignX tương ứng với sắp xếp mặc định và được sắp xếp để gọi là các đỉnh phụ.

Ví dụ 10. Chứng minh sự dung chịu thuốc diệt cỏ.

Được chọn các thể đột biến và sự thoát được chuyển đến các bình nhỏ. Các cây trồng kiểu đại được nảy mầm từ hạt giống để dùng làm đối chứng.

Sau khoảng 3 tuần sau khi cấy ghép, các chất tái sinh M0 được phun bằng cách sử dụng thiết bị phun đường với saflufenacil (BAS 800H) hoặc dẫn xuất benzoxazinon I.a.35 đã được bổ sung với 0,1% dầu hạt giống đã được metyl hóa. Sau khi các cây đã được làm thích ứng với các điều kiện nhà kính, nhóm phụ được phun với saflufenacil bổ sung (BAS 800H) hoặc dẫn xuất benzoxazinon I.a.35. Ngay khi phun, cây được giữ trong điều kiện khô hạn trong 24 giờ trước khi được tưới nước và bón phân lại. Các cây được phun được vẽ đồ thị và xác định tỷ lệ tổn thương do thuốc diệt cỏ ở thời điểm 1 và 2 tuần sau điều trị.

Ví dụ 11. Lựa chọn thuốc diệt cỏ sử dụng môi trường nuôi cấy.

Môi trường được chọn để sử dụng và tiêu diệt đường cong được phát triển như được biệt hóa ở trên. Để lựa chọn, sử dụng các kỹ thuật khác nhau. Áp dụng lựa chọn từng bước, hoặc áp dụng mức gây chết ngay của thuốc diệt cỏ. Trong trường hợp, tất cả trong số các mô sẹo được chuyển cho mỗi chu trình lựa chọn mới. Sự lựa chọn là 4-5 chu trình của môi trường nuôi cấy với 3-5 tuần cho mỗi chu trình. Các mô sẹo được đặt lên trên màng nylon để tạo điều kiện chuyển (tấm có lỗ 200 micron, Biodesign, Saco, Maine). Các màng được cắt để lắp khớp các đĩa Petri 100x20 mm và được hấp trước khi sử dụng 25-35 mô sẹo (khối lượng trung bình/các mô sẹo là 22mg) được sử dụng trong từng đĩa. Ngoài ra, một bộ trong số các mô sẹo phải qua sự lựa chọn trong môi trường nuôi cấy lỏng với gieo lại hàng tuần sau đó lựa chọn thêm trên môi trường bán rắn.

Các dòng thể đột biến được chọn lọc sử dụng saflufenacil (BAS 800H) hoặc dẫn xuất benzoxazinon I.a.35. Hiệu quả của các thể đột biến thu được là cao dựa trên tỷ lệ phần trăm của các mô sẹo mà làm tăng khả năng tái tạo, dòng thể đột biến hoặc một số

dòng như được xác định bằng gam mô sử dụng. Về tổng thể, số lần đột biến được so với seashore paspalum là 5 lần và so với Maizee là 2 lần.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp tăng cường sự sinh trưởng của cây trồng bằng cách kiểm soát thực vật không mong muốn bao quanh cây trồng tại vị trí canh tác, phương pháp này bao gồm các bước:

a) tại vị trí đã nêu, cung cấp cây mang ít nhất một axit nucleic chứa trình tự nucleotit mã hóa protoporphyrinogen oxidaza đột biến (mut-PPO) kháng hoặc chịu được chất diệt cỏ dẫn xuất benzoxazinon; và

b) đưa lên vị trí này lượng hữu hiệu chất diệt cỏ đã nêu,

trong đó trình tự nucleotit ở bước a) bao gồm trình tự có độ đồng nhất về trình tự ít nhất 80% so với trình tự SEQ ID NO: 1, và trong đó mut-PPO được mã hóa là biến thể của SEQ ID NO: 2 trong đó axit amin ở vị trí 128 là Alanin, và axit amin ở vị trí 420 là Methionin, Isoleuxin hoặc Leuxin, và trong đó lượng hữu hiệu chất diệt cỏ không tiêu diệt hoặc ức chế sự sinh trưởng của cây kháng thuốc diệt cỏ ở bước a).

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó cây mang ít nhất một axit nucleic khác loại bổ sung chứa trình tự nucleotit mã hóa enzym dung chịu chất diệt cỏ.

3. Phương pháp theo điểm 1 hoặc 2, trong đó chất diệt cỏ dẫn xuất benzoxazinon được áp dụng cùng với một hoặc nhiều chất diệt cỏ hướng đích PPO khác.

4. Axit nucleic phân lập mã hóa mut-PPO, trong đó mut-PPO được mã hóa là biến thể của SEQ ID NO: 2, trong đó axit amin ở vị trí 128 là Alanin, và axit amin ở vị trí 420 là Methionin, Isoleuxin hoặc Leuxin.

5. Tế bào thực vật chuyển gen được biến nạp bằng axit nucleic mut-PPO như được xác định theo điểm 4, trong đó việc biểu hiện axit nucleic này trong tế bào thực vật làm tăng tính kháng hoặc tính dung chịu chất diệt cỏ dẫn xuất benzoxazinon so với tế bào thực vật giống hoang dại.

6. Cây chuyển gen chứa tế bào thực vật như được xác định trong điểm 5, trong đó việc biểu hiện axit nucleic trong cây này làm tăng tính kháng của cây với chất diệt cỏ dẫn xuất benzoxazinon so với cây giống hoang dại.

7. Cây biểu hiện mut-PPO đột biến hoặc tái tổ hợp mang SEQ ID NO: 2, trong đó trình tự axit amin khác với trình tự axit amin của PPO kiểu hoang dại của cây kiểu hoang dại tương

ứng, trong đó axit amin ở vị trí 128 là Alanin, và axit amin ở vị trí 420 là Methionin, Isoleuxin hoặc Leuxin.

8. Hạt được tạo ra bởi cây chuyển gen chứa tế bào thực vật như được xác định theo điểm 5 hoặc bởi cây như được xác định theo điểm 6 hoặc 7, trong đó hạt này thuần chủng để tăng tính kháng lại chất diệt cỏ dẫn xuất benzoxazinon so với hạt giống hoang dại.

9. Phương pháp sản xuất tế bào thực vật chuyển gen với tính kháng chất diệt cỏ dẫn xuất benzoxazinon gia tăng so với tế bào thực vật giống hoang dại, bao gồm bước biến nạp tế bào thực vật bằng catxet biểu hiện chứa axit nucleic mut-PPO như được xác định theo điểm 4.

10. Phương pháp sản xuất cây chuyển gen bao gồm bước (a) biến nạp tế bào thực vật bằng catxet biểu hiện chứa axit nucleic mut-PPO như được xác định theo điểm 4, và (b) tạo ra cây với tính kháng chất diệt cỏ dẫn xuất benzoxazinon tăng cường từ tế bào thực vật này.

11. Phương pháp theo điểm 9 hoặc 10, trong đó axit nucleic mut-PPO chứa polynucleotit có độ đồng nhất về trình tự ít nhất 80% so với trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1.

12. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 9 đến 11, trong đó catxet biểu hiện còn chứa thêm vùng điều hòa khởi đầu phiên mã và vùng điều hòa khởi đầu dịch mã mà hoạt động chức năng ở thực vật.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110>	BASF SE	
<120>	CÂY CỎ KHẢ NĂNG CHỊU ĐƯỢC THUỐC DIỆT CỎ TĂNG	
<130>	PF71580	
<150>	US 61/423604	
<151>	2010-12-16	
<150>	EP 10195296.8	
<151>	2010-12-16	
<160>	46	
<170>	Patent Phiên bản 3.4	
<210>	1	
<211>	1605	
<212>	ADN	
<213>	Amaranthus tuberculatus	
<400>	1	
atggttaattc	aatccattac ccacctttca ccaaaccttg cattgccatc gccattgtca	60
gtttcaacca	agaactaccc agtagctgta atgggcaaca tttctgagcg ggaagaaccc	120
actttctgcta	aaagggttgc tgttggttggg gctggagtta gtggacttgc tgctgcatat	180
aagctaaaat	cccatggttt gagtgtgaca ttgtttgaag ctgattctag agctggaggc	240
aaacttaaaa	ctgttaaaaa agatgggtttt atttgggatg agggggcaaa tactatgaca	300
gaaagtgagg	cagaggtctc gagtttgatc gatgatcttg ggcttcgtga gaagcaacag	360
ttgccaat	ttt cacaaaataa aagatacata gctagagacg gtcttcctgt gctactacct	420
tcaaatcccg	ctgcactact cacgagcaat atcctttcag caaaatcaaa gctgcaaatt	480
atggttgaac	catttctctg gagaaaacac aatgctactg aactttctga tgagcatggt	540
caggaaagcg	ttggtgaatt ttttgagcga cattttggga aagagtttgt tgattatggt	600
atcgaccctt	ttgttgcggg tacatgtggg ggagatcctc aatcgctttc catgcacat	660
acatttccag	aagtatggaa tattgaaaaa aggtttggct ctgtgtttgc tggactaatt	720
caatcaacat	tggtatctaa gaaggaaaag ggtggagaaa atgcttctat taagaagcct	780
cgtgtacgtg	gttcattttc atttcaaggt ggaatgcaga cacttgttga cacaatgtgc	840
aaacagcttg	gtgaagatga actcaaactc cagtgtgagg tgctgtcctt gtcataatac	900
cagaagggga	tcccctcatt aggggaattgg tcagtctctt ctatgtcaaa taataccagt	960
gaagatcaat	cttatgatgc tgtgggttgc actgctccaa ttcgcaatgt caaagaaatg	1020
aagattatga	aatttggaat tccattttca cttgacttta ttccagaggt gacgtacgta	1080
cccccttccg	ttatgattac tgcattcaaa aaggataaag tgaagagacc tcttgagggc	1140
ttcggagttc	ttatcccctc taaagagcaa cataatggac tgaagactct tgggtacttta	1200
ttttcctcca	tgatgtttcc tgatcgtgct ccatctgaca tgtgtctctt tactacattt	1260

gtcggaggaa gcagaaatag aaaacttgca aacgcttcaa cggatgaatt gaagcaaata 1320
 gtttcttctg accttcagca gctgttgggc actgaggacg aaccttcatt tgtcaatcat 1380
 ctcttttggg gcaacgcatt cccattgtat ggacacaatt acgattctgt tttgagagcc 1440
 atagacaaga tggaaaagga tcttcctgga tttttttatg caggtaacca taagggtgga 1500
 ctttcagtgg gaaaagcgat ggctccgga tgcaaggctg cggaacttgt aatatcctat 1560
 ctggactctc atatatatcgt gaagatggat gagaagaccg cgtaa 1605

<210> 2
 <211> 534
 <212> PRT
 <213> *Amaranthus tuberculatum*

<400> 2

Met Val Ile Gln Ser Ile Thr His Leu Ser Pro Asn Leu Ala Leu Pro
 1 5 10 15

Ser Pro Leu Ser Val Ser Thr Lys Asn Tyr Pro Val Ala Val Met Gly
 20 25 30

Asn Ile Ser Glu Arg Glu Glu Pro Thr Ser Ala Lys Arg Val Ala Val
 35 40 45

Val Gly Ala Gly Val Ser Gly Leu Ala Ala Ala Tyr Lys Leu Lys Ser
 50 55 60

His Gly Leu Ser Val Thr Leu Phe Glu Ala Asp Ser Arg Ala Gly Gly
 65 70 75 80

Lys Leu Lys Thr Val Lys Lys Asp Gly Phe Ile Trp Asp Glu Gly Ala
 85 90 95

Asn Thr Met Thr Glu Ser Glu Ala Glu Val Ser Ser Leu Ile Asp Asp
 100 105 110

Leu Gly Leu Arg Glu Lys Gln Gln Leu Pro Ile Ser Gln Asn Lys Arg
 115 120 125

Tyr Ile Ala Arg Asp Gly Leu Pro Val Leu Leu Pro Ser Asn Pro Ala
 130 135 140

Ala Leu Leu Thr Ser Asn Ile Leu Ser Ala Lys Ser Lys Leu Gln Ile
 145 150 155 160

Met Leu Glu Pro Phe Leu Trp Arg Lys His Asn Ala Thr Glu Leu Ser
 165 170 175

Asp Glu His Val Gln Glu Ser Val Gly Glu Phe Phe Glu Arg His Phe

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

Leu Gly Thr Glu Asp Glu Pro Ser Phe Val Asn His Leu Phe Trp Ser
450 455 460

Asn Ala Phe Pro Leu Tyr Gly His Asn Tyr Asp Ser Val Leu Arg Ala
465 470 475 480

Ile Asp Lys Met Glu Lys Asp Leu Pro Gly Phe Phe Tyr Ala Gly Asn
485 490 495
His Lys Gly Gly Leu Ser Val Gly Lys Ala Met Ala Ser Gly Cys Lys
500 505 510

Ala Ala Glu Leu Val Ile Ser Tyr Leu Asp Ser His Ile Tyr Val Lys
515 520 525

Met Asp Glu Lys Thr Ala
530

<210> 3
<211> 1605
<212> ADN
<213> *Amaranthus tuberculatus*

<400> 3
atggtaattc aatccattac ccacctttca ccaaaccttg cattgccatc gccattgtca 60
gtttcaacca agaactaccc agtagctgta atgggcaaca tttctgagcg ggaagaacct 120
acttctgcta aaagggttgc tgttggttgg gctggagtta gtggacttgc tgctgcata 180
aagctaaaat cccatggttt gagtgtgaca ttgtttgaag ctgattctag agctggaggc 240
aaacttaaaa ctgttaaaaa agatggtttt atttgggatg agggggcaaa tactatgaca 300
gaaagtgagg cagaggtctc gagtttgatc gatgatcttg ggcttcgtga gaagcaacag 360
ttgccaattt cacaaaataa aagatacata gctagagccg gtcttcctgt gctactacct 420
tcaaatcccg ctgcactact cagagcaat atcctttcag caaatcaaa gctgcaaatt 480
atgttggaac ctttctctg gagaaaacac aatgctactg aactttctga tgagcatgtt 540
caggaaagcg ttggtgaatt ttttgagcga cttttggga aagagtttgt tgattatgtt 600
attgaccctt ttgttgcggt tacatgtggt ggagatcctc aatcgcttc catgcacat 660
acatttccag aagtatggaa tattgaaaaa aggtttggct ctgtgtttgc cggactaatt 720
caatcaacat tgttatctaa gaaggaaaag ggtggagaaa atgcttctat taagaagcct 780
cgtgtacgtg gttcattttc atttcaaggt ggaatgcaga cacttgttga cacaatgtgc 840
aaacagcttg gtgaagatga actcaaactc cagtgtgagg tgctgtcctt gtcataatac 900
cagaagggga tccctcact aggaattgg tcagtctctt ctatgtcaaa taataccagt 960
gaagatcaat cttatgatgc tgtggttgtc actgctccaa ttcgcaatgt caaagaaatg 1020
aagattatga aatttgaaa tccattttca cttgacttta ttccagaggt gacgtacgta 1080

```

ccccctttccg ttatgattac tgcattcaaa aaggataaaag tgaagagacc tcttgagggc 1140
ttcggaggttc ttatcccctc taaagagcaa cataatggac tgaagactct tggactttta 1200
ttttcctcca tgatgtttcc tgatcgtgct ccatctgaca tgtgtctctt tactacattt 1260
gtcggaggaa gcagaaatag aaaacttgca aacgcttcaa cggatgaatt gaagcaaata 1320
gtttcttctg accttcagca gctgttgggc actgaggacg aaccttcatt tgtcaatcat 1380
ctcttttggg gcaacgcatt cccattgtat ggacacaatt acgattctgt tttgagagcc 1440
atagacaaga tggaaaagga tcttcctgga tttttttatg caggtaacca taagggtgga 1500
ctttcagtgg gaaaagcgat ggctccgga tgcaaggctg cggaacttgt aatatactat 1560
ctggactctc atatatacgt gaagatggat gagaagaccg cgtaa 1605

```

```

<210> 4
<211> 534
<212> PRT
<213> Amaranthus tuberculatum

```

```

<400> 4

```

```

Met Val Ile Gln Ser Ile Thr His Leu Ser Pro Asn Leu Ala Leu Pro
1          5          10          15

```

```

Ser Pro Leu Ser Val Ser Thr Lys Asn Tyr Pro Val Ala Val Met Gly
          20          25          30

```

```

Asn Ile Ser Glu Arg Glu Glu Pro Thr Ser Ala Lys Arg Val Ala Val
          35          40          45

```

```

Val Gly Ala Gly Val Ser Gly Leu Ala Ala Ala Tyr Lys Leu Lys Ser
          50          55          60

```

```

His Gly Leu Ser Val Thr Leu Phe Glu Ala Asp Ser Arg Ala Gly Gly
65          70          75          80

```

```

Lys Leu Lys Thr Val Lys Lys Asp Gly Phe Ile Trp Asp Glu Gly Ala
          85          90          95

```

```

Asn Thr Met Thr Glu Ser Glu Ala Glu Val Ser Ser Leu Ile Asp Asp
          100          105          110

```

```

Leu Gly Leu Arg Glu Lys Gln Gln Leu Pro Ile Ser Gln Asn Lys Arg
          115          120          125

```

```

Tyr Ile Ala Arg Ala Gly Leu Pro Val Leu Leu Pro Ser Asn Pro Ala
          130          135          140

```

```

Ala Leu Leu Thr Ser Asn Ile Leu Ser Ala Lys Ser Lys Leu Gln Ile
145          150          155          160
Met Leu Glu Pro Phe Leu Trp Arg Lys His Asn Ala Thr Glu Leu Ser

```

[illegible]

Ser Thr Asp Glu Leu Lys Gln Ile Val Ser Ser Asp Leu Gln Gln Leu
 435 440 445

Leu Gly Thr Glu Asp Glu Pro Ser Phe Val Asn His Leu Phe Trp Ser
 450 455 460

Asn Ala Phe Pro Leu Tyr Gly His Asn Tyr Asp Ser Val Leu Arg Ala
 465 470 475 480

Ile Asp Lys Met Glu Lys Asp Leu Pro Gly Phe Phe Tyr Ala Gly Asn
 485 490 495

His Lys Gly Gly Leu Ser Val Gly Lys Ala Met Ala Ser Gly Cys Lys
 500 505 510

Ala Ala Glu Leu Val Ile Ser Tyr Leu Asp Ser His Ile Tyr Val Lys
 515 520 525

Met Asp Glu Lys Thr Ala
 530

<210> 5
 <211> 1602
 <212> ADN
 <213> *Amaranthus tuberculatus*

<400> 5
 atggtaattc aatccattac ccacctttca ccaaaccttg cattgccatc gccattgtca 60
 gtttccacca agaactaccc agtagctgta atgggcaaca tttctgagcg agaagaaccc 120
 acttctgcta aaagggttgc tgttggttggg gctggagtta gtggacttgc tgctgcatat 180
 aagctaaaat cccatggttt gagtgtgaca ttgtttgaag ctgattctag agctggaggc 240
 aaacttaaaa ctgttaaaaa agatggtttt atttgggatg agggggcaaa tactatgaca 300
 gaaagtgagg cagaggtctc gagtttgatc gatgatcttg ggcttcgtga gaagcaacag 360
 ttgccaattt cacaaaataa aagatacata gctagagacg gtcttcctgt gctactacct 420
 tcaaattccg ctgcactact cacgagcaat atcctttcag caaaatcaaa gctgcaaatt 480
 atgttggaac ctttctctg gagaaaacac aatgctactg aactttctga tgagcatggt 540
 caggaaagcg ttggtgaatt ttttgagcga cattttggga aagagtttgt tgattatggt 600
 attgaccctt ttgttgcggg tacatgtgga gatcctcaat cgctttccat gcaccatata 660
 tttccagaag tatggaatat tgaaaaaagg tttggctctg tgtttgctgg actaattcaa 720
 tcaacattgt tatctaagaa ggaaaagggt ggagaaaatg cttctattaa gaagcctcgt 780
 gtacgtgggt cattttcatt tcaaggtgga atgcagacac ttgttgacac aatgtgcaaa 840
 cagcttggtg aagatgaact caaactccag tgtgaggtgc tgccttctgc atataaccag 900

```

aaggggatcc cctcattagg gaattggtca gtctcttcta tgtcaaataa taccagttaa 960
gatcaatctt atgatgctgt ggttgctact gctccaattc gcaatgtcaa agaaatgaag 1020
attatgaaat ttggaaatcc attttcactt gactttattc cagagggtgac gtacgtaccc 1080
ctttccgtta tgattactgc attcaaaaag gataaagtga agagacctct tgagggcttc 1140
ggagttctta tcccctctaa agagcaacat aatggactga agactcttgg tactttattt 1200
tcctccatga tgtttctga tcgtgctcca tctgacatgt gtctctttac tacatttgct 1260
ggaggaagca gaaatagaaa acttgcaaac gcttcaacgg atgaattgaa gcaaatagtt 1320
tcttctgacc ttcagcagct gttgggctact gaggacgaac cttcatttgt caatcatctc 1380
ttttggagca acgcattccc attgtatgga cacaattacg attgtgtttt gagagccata 1440
gacaagatgg aaaaggatct tcctggatgt ttttatgcag gtaaccataa ggggtggactt 1500
tcagtgggaa aagcgatggc ctccgatgac aaggctgcgg aacttgtaat atcctatctg 1560
gactctcata tatacgtgaa gatggatgag aagaccgcgt aa 1602

```

```

<210> 6
<211> 533
<212> PRT
<213> Amaranthus tuberculatum

```

```

<400> 6

```

```

Met Val Ile Gln Ser Ile Thr His Leu Ser Pro Asn Leu Ala Leu Pro
1          5          10          15

```

```

Ser Pro Leu Ser Val Ser Thr Lys Asn Tyr Pro Val Ala Val Met Gly
          20          25          30

```

```

Asn Ile Ser Glu Arg Glu Glu Pro Thr Ser Ala Lys Arg Val Ala Val
          35          40          45

```

```

Val Gly Ala Gly Val Ser Gly Leu Ala Ala Ala Tyr Lys Leu Lys Ser
          50          55          60

```

```

His Gly Leu Ser Val Thr Leu Phe Glu Ala Asp Ser Arg Ala Gly Gly
65          70          75          80

```

```

Lys Leu Lys Thr Val Lys Lys Asp Gly Phe Ile Trp Asp Glu Gly Ala
          85          90          95

```

```

Asn Thr Met Thr Glu Ser Glu Ala Glu Val Ser Ser Leu Ile Asp Asp
          100          105          110

```

```

Leu Gly Leu Arg Glu Lys Gln Gln Leu Pro Ile Ser Gln Asn Lys Arg
          115          120          125

```

Tyr Ile Ala Arg Asp Gly Leu Pro Val Leu Leu Pro Ser Asn Pro Ala
 130 135 140

Ala Leu Leu Thr Ser Asn Ile Leu Ser Ala Lys Ser Lys Leu Gln Ile
 145 150 155 160

Met Leu Glu Pro Phe Leu Trp Arg Lys His Asn Ala Thr Glu Leu Ser
 165 170 175
 Asp Glu His Val Gln Glu Ser Val Gly Glu Phe Phe Glu Arg His Phe
 180 185 190

Gly Lys Glu Phe Val Asp Tyr Val Ile Asp Pro Phe Val Ala Gly Thr
 195 200 205

Cys Gly Asp Pro Gln Ser Leu Ser Met His His Thr Phe Pro Glu Val
 210 215 220

Trp Asn Ile Glu Lys Arg Phe Gly Ser Val Phe Ala Gly Leu Ile Gln
 225 230 235 240

Ser Thr Leu Leu Ser Lys Lys Glu Lys Gly Gly Glu Asn Ala Ser Ile
 245 250 255

Lys Lys Pro Arg Val Arg Gly Ser Phe Ser Phe Gln Gly Gly Met Gln
 260 265 270

Thr Leu Val Asp Thr Met Cys Lys Gln Leu Gly Glu Asp Glu Leu Lys
 275 280 285

Leu Gln Cys Glu Val Leu Ser Leu Ser Tyr Asn Gln Lys Gly Ile Pro
 290 295 300

Ser Leu Gly Asn Trp Ser Val Ser Ser Met Ser Asn Asn Thr Ser Glu
 305 310 315 320

Asp Gln Ser Tyr Asp Ala Val Val Val Thr Ala Pro Ile Arg Asn Val
 325 330 335

Lys Glu Met Lys Ile Met Lys Phe Gly Asn Pro Phe Ser Leu Asp Phe
 340 345 350

Ile Pro Glu Val Thr Tyr Val Pro Leu Ser Val Met Ile Thr Ala Phe
 355 360 365

Lys Lys Asp Lys Val Lys Arg Pro Leu Glu Gly Phe Gly Val Leu Ile
 370 375 380

Pro Ser Lys Glu Gln His Asn Gly Leu Lys Thr Leu Gly Thr Leu Phe
 385 390 395 400

Ser Ser Met Met Phe Pro Asp Arg Ala Pro Ser Asp Met Cys Leu Phe
405 410 415
Thr Thr Phe Val Gly Gly Ser Arg Asn Arg Lys Leu Ala Asn Ala Ser
420 425 430

Thr Asp Glu Leu Lys Gln Ile Val Ser Ser Asp Leu Gln Gln Leu Leu
435 440 445

Gly Thr Glu Asp Glu Pro Ser Phe Val Asn His Leu Phe Trp Ser Asn
450 455 460

Ala Phe Pro Leu Tyr Gly His Asn Tyr Asp Cys Val Leu Arg Ala Ile
465 470 475 480

Asp Lys Met Glu Lys Asp Leu Pro Gly Phe Phe Tyr Ala Gly Asn His
485 490 495

Lys Gly Gly Leu Ser Val Gly Lys Ala Met Ala Ser Gly Cys Lys Ala
500 505 510

Ala Glu Leu Val Ile Ser Tyr Leu Asp Ser His Ile Tyr Val Lys Met
515 520 525

Asp Glu Lys Thr Ala
530

```
<210> 7
<211> 1602
<212> ADN
<213> Amaranthus tuberculatus
```

[illegible]

```

tttccagaag tatggaatat tgaaaaaagg tttggctctg tgtttgctgg actaattcaa 720
tcaacattgt tatctaagaa ggaaaagggt ggagaaaatg cttctattaa gaagcctcgt 780
gtacgtgggt cattttcatt tcaagggtgga atgcagacac ttgttgacac aatgtgcaaa 840
cagcttgggt aagatgaact caaactccag tgtgagggtg tgccttgtc atataaccag 900
aaggggatcc cctcattagg gaattggtca gtctcttcta tgtcaaataa taccagtga 960
gatcaatctt atgatgctgt ggttgctact gctccaattc gcaatgtcaa agaaatgaag 1020
attatgaaat ttggaaatcc attttcaact gactttattc cagaggtgac gtacgtaccc 1080
ctttccgtta tgattactgc attcaaaaag gataaagtga agagacctct tgagggcttc 1140
ggagttctta tccctcttaa agagcaacat aatggactga agactcttgg tactttattt 1200
tcctccatga tgtttcctga tcgtgctcca tctgacatgt gtctctttac tacatttgtc 1260
ggaggaagca gaaatagaaa acttgcaaac gtttcaacgg atgaattgaa gcaaatagtt 1320
tcttctgacc ttcagcagct gttgggcact gaggacgaac cttcatttgt caatcatctc 1380
ttttggagca acgcattccc attgtatgga cacaattacg attctgtttt gagagccata 1440
gacaagatgg aaaaggatct tcctggattt ttttatgcag gtaaccataa ggggtggactt 1500
tcagtgggaa aagcgatggc ctccgatgac aaggctgcgg aacttgtaat atcctatctg 1560
gactctcata tatacgtgaa gatggatgag aagaccgcgt aa 1602

```

```

<210> 8
<211> 533
<212> PRT
<213> Amaranthus tuberculatum

```

```

<400> 8

```

```

Met Val Ile Gln Ser Ile Thr His Leu Ser Pro Asn Leu Ala Leu Pro
1          5          10          15

```

```

Ser Pro Leu Ser Val Ser Thr Lys Asn Tyr Pro Val Ala Val Met Gly
          20          25          30

```

```

Asn Ile Ser Glu Arg Glu Glu Pro Thr Ser Ala Lys Arg Val Ala Val
          35          40          45

```

```

Val Gly Ala Gly Val Ser Gly Leu Ala Ala Ala Tyr Lys Leu Lys Ser
          50          55          60

```

```

His Gly Leu Ser Val Thr Leu Phe Glu Ala Asn Ser Arg Ala Gly Gly
65          70          75          80

```

```

Lys Leu Lys Thr Val Lys Lys Asp Gly Phe Ile Trp Asp Glu Gly Ala
          85          90          95

```

```

Asn Thr Met Thr Glu Ser Glu Ala Glu Val Ser Ser Leu Ile Asp Asp

```

100					105					110					
Leu	Gly	Leu	Arg	Glu	Lys	Gln	Gln	Leu	Pro	Ile	Ser	Gln	Asn	Lys	Arg
		115					120					125			
Tyr	Ile	Ala	Arg	Asp	Gly	Leu	Pro	Val	Leu	Leu	Pro	Ser	Asn	Pro	Ala
	130					135					140				
Ala	Leu	Leu	Thr	Ser	Asn	Ile	Leu	Ser	Ala	Lys	Ser	Lys	Leu	Gln	Ile
145					150					155					160
Met	Leu	Glu	Pro	Phe	Leu	Trp	Arg	Lys	His	Asn	Ala	Thr	Glu	Leu	Ser
				165					170						175
Asp	Glu	His	Val	Gln	Glu	Ser	Val	Gly	Glu	Phe	Phe	Glu	Arg	His	Phe
			180					185					190		
Gly	Lys	Glu	Phe	Val	Asp	Tyr	Val	Ile	Asp	Pro	Phe	Val	Ala	Gly	Thr
		195					200					205			
Cys	Gly	Asp	Pro	Gln	Ser	Leu	Ser	Met	Tyr	His	Thr	Phe	Pro	Glu	Val
	210					215					220				
Trp	Asn	Ile	Glu	Lys	Arg	Phe	Gly	Ser	Val	Phe	Ala	Gly	Leu	Ile	Gln
225					230					235					240
Ser	Thr	Leu	Leu	Ser	Lys	Lys	Glu	Lys	Gly	Gly	Glu	Asn	Ala	Ser	Ile
				245					250					255	
Lys	Lys	Pro	Arg	Val	Arg	Gly	Ser	Phe	Ser	Phe	Gln	Gly	Gly	Met	Gln
			260					265					270		
Thr	Leu	Val	Asp	Thr	Met	Cys	Lys	Gln	Leu	Gly	Glu	Asp	Glu	Leu	Lys
	275						280					285			
Leu	Gln	Cys	Glu	Val	Leu	Ser	Leu	Ser	Tyr	Asn	Gln	Lys	Gly	Ile	Pro
	290					295					300				
Ser	Leu	Gly	Asn	Trp	Ser	Val	Ser	Ser	Met	Ser	Asn	Asn	Thr	Ser	Glu
305					310					315					320
Asp	Gln	Ser	Tyr	Asp	Ala	Val	Val	Val	Thr	Ala	Pro	Ile	Arg	Asn	Val
				325					330					335	
Lys	Glu	Met	Lys	Ile	Met	Lys	Phe	Gly	Asn	Pro	Phe	Ser	Leu	Asp	Phe
			340					345					350		
Ile	Pro	Glu	Val	Thr	Tyr	Val	Pro	Leu	Ser	Val	Met	Ile	Thr	Ala	Phe
		355					360					365			

Lys Lys Asp Lys Val Lys Arg Pro Leu Glu Gly Phe Gly Val Leu Ile
 370 375 380

Pro Ser Lys Glu Gln His Asn Gly Leu Lys Thr Leu Gly Thr Leu Phe
 385 390 395 400

Ser Ser Met Met Phe Pro Asp Arg Ala Pro Ser Asp Met Cys Leu Phe
 405 410 415

Thr Thr Phe Val Gly Gly Ser Arg Asn Arg Lys Leu Ala Asn Ala Ser
 420 425 430
 Thr Asp Glu Leu Lys Gln Ile Val Ser Ser Asp Leu Gln Gln Leu Leu
 435 440 445

Gly Thr Glu Asp Glu Pro Ser Phe Val Asn His Leu Phe Trp Ser Asn
 450 455 460

Ala Phe Pro Leu Tyr Gly His Asn Tyr Asp Ser Val Leu Arg Ala Ile
 465 470 475 480

Asp Lys Met Glu Lys Asp Leu Pro Gly Phe Phe Tyr Ala Gly Asn His
 485 490 495

Lys Gly Gly Leu Ser Val Gly Lys Ala Met Ala Ser Gly Cys Lys Ala
 500 505 510

Ala Glu Leu Val Ile Ser Tyr Leu Asp Ser His Ile Tyr Val Lys Met
 515 520 525

Asp Glu Lys Thr Ala
 530

<210> 9
 <211> 1644
 <212> ADN
 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 9
 atgggcctga ttaaaaacgg taccctttat tgtcgttttg ggataagctg gaattttgcc 60
 gctgtgtttt tttctactta tttccgtcac tgctttcgac tggtcagaga ttttgactct 120
 gaattgttgc agatagcaat ggcgtctgga gcagtagcag atcatcaa at tgaagcggtt 180
 tcaggaaaaa gagtcgcagt cgtagggtgca ggtgtaagt gacttgcggc ggcttacaag 240
 ttgaaatcga ggggtttgaa tgtgactgtg tttgaagctg atggaagagt aggtgggaag 300
 ttgagaagtg ttatgcaaaa tggtttgatt tgggatgaag gagcaaacac catgactgag 360
 gctgagccag aagttgggag tttacttgat gatcttgggc ttcgtgagaa acaacaattt 420
 ccaatttcac agaaaaagcg gtatattgtg cggaatggtg tacctgtgat gctacctacc 480

```

aatcccatag agctgggtcac aagtagtgtg ctctctaccc aatctaagtt tcaaattcttg 540
ttggaaccat ttttatggaa gaaaaagtcc tcaaaagtct cagatgcatac tgctgaagaa 600
agtgtaaagcg agttctttca acgccatttt ggacaagagg ttgttgacta tctcatcgac 660
ccttttgttg gtggaacaag tgctgcggac cctgattccc tttcaatgaa gcattctttc 720
ccagatctct ggaatagttt tggctctatt atagtcggtg caatcagaac aaagtttgct 780
gctaaagggtg gtaaaagtag agacacaaaag agttctcctg gcacaaaaaa gggttcgcgt 840
gggtcattct cttttaaggg gggaatgcag attcttcctg atacgttggtg caaaagtctc 900
tcacatgatg agatcaattt agactccaag gtactctctt tgtcttaciaa ttctggatca 960
agacaggaga actggtcatt atcttggtgt tgcataatg aaacgcagag acaaaacccc 1020
cattatgatg ctgctcctct gtgcaatgtg aaggagatga aggttatgaa aggaggacaa 1080
ccctttcagc taaactttct ccccgagatt aattacatgc ccctctcggg tttaatcacc 1140
acattcaciaa aggagaaagt aaagagacct cttgaaggct ttgggggtact cattccatct 1200
aaggagcaaa agcatgggtt caaaactcta ggtacacttt tttcatcaat gatgtttcca 1260
gatcgttccc ctagtgcagt tcatctatat acaactttta ttggtgggag taggaaccag 1320
gaactagcca aagcttcacac tgacgaatta aaacaagttg tgacttctga ctttcagcga 1380
ctgttggggg ttgaaggtga acccggtgtc gtcaaccatt actattggag gaaagcattc 1440
ccgttgatat acagcagcta tgactcagtc atggaagcaa ttgacaagat ggagaatgat 1500
ctacctgggt tcttctatgc aggtaatcat cgaggggggc tctctgttgg gaaatcaata 1560
gcacaggtt gcaaagcagc tgaccttggt atctcatacc tggagtcttg ctcaaagac 1620
aagaaaccaa atgacagctt ataa 1644

```

```

<210> 10
<211> 547
<212> PRT
<213> Arabidopsis thaliana

```

```
<400> 10
```

```

Met Gly Leu Ile Lys Asn Gly Thr Leu Tyr Cys Arg Phe Gly Ile Ser
1           5           10          15

```

```

Trp Asn Phe Ala Ala Val Phe Phe Ser Thr Tyr Phe Arg His Cys Phe
          20           25           30

```

```

Arg Leu Val Arg Asp Phe Asp Ser Glu Leu Leu Gln Ile Ala Met Ala
          35           40           45

```

```

Ser Gly Ala Val Ala Asp His Gln Ile Glu Ala Val Ser Gly Lys Arg
          50           55           60

```

```

Val Ala Val Val Gly Ala Gly Val Ser Gly Leu Ala Ala Ala Tyr Lys
65                               70                               75                               80

Leu Lys Ser Arg Gly Leu Asn Val Thr Val Phe Glu Ala Asp Gly Arg
                               85                               90                               95

Val Gly Gly Lys Leu Arg Ser Val Met Gln Asn Gly Leu Ile Trp Asp
                               100                              105                              110

Glu Gly Ala Asn Thr Met Thr Glu Ala Glu Pro Glu Val Gly Ser Leu
                               115                              120                              125

Leu Asp Asp Leu Gly Leu Arg Glu Lys Gln Gln Phe Pro Ile Ser Gln
                               130                              135                              140

Lys Lys Arg Tyr Ile Val Arg Asn Gly Val Pro Val Met Leu Pro Thr
145                               150                              155                              160

Asn Pro Ile Glu Leu Val Thr Ser Ser Val Leu Ser Thr Gln Ser Lys
                               165                              170                              175

Phe Gln Ile Leu Leu Glu Pro Phe Leu Trp Lys Lys Lys Ser Ser Lys
                               180                              185                              190

Val Ser Asp Ala Ser Ala Glu Glu Ser Val Ser Glu Phe Phe Gln Arg
                               195                              200                              205

His Phe Gly Gln Glu Val Val Asp Tyr Leu Ile Asp Pro Phe Val Gly
                               210                              215                              220

Gly Thr Ser Ala Ala Asp Pro Asp Ser Leu Ser Met Lys His Ser Phe
225                               230                              235                              240

Pro Asp Leu Trp Asn Ser Phe Gly Ser Ile Ile Val Gly Ala Ile Arg
                               245                              250                              255

Thr Lys Phe Ala Ala Lys Gly Gly Lys Ser Arg Asp Thr Lys Ser Ser
                               260                              265                              270

Pro Gly Thr Lys Lys Gly Ser Arg Gly Ser Phe Ser Phe Lys Gly Gly
                               275                              280                              285

Met Gln Ile Leu Pro Asp Thr Leu Cys Lys Ser Leu Ser His Asp Glu
                               290                              295                              300

Ile Asn Leu Asp Ser Lys Val Leu Ser Leu Ser Tyr Asn Ser Gly Ser
305                               310                              315                              320
Arg Gln Glu Asn Trp Ser Leu Ser Cys Val Ser His Asn Glu Thr Gln
                               325                              330                              335

```

Arg Gln Asn Pro His Tyr Asp Ala Ala Pro Leu Cys Asn Val Lys Glu
340 345 350

Met Lys Val Met Lys Gly Gly Gln Pro Phe Gln Leu Asn Phe Leu Pro
355 360 365

Glu Ile Asn Tyr Met Pro Leu Ser Val Leu Ile Thr Thr Phe Thr Lys
370 375 380

Glu Lys Val Lys Arg Pro Leu Glu Gly Phe Gly Val Leu Ile Pro Ser
385 390 395 400

Lys Glu Gln Lys His Gly Phe Lys Thr Leu Gly Thr Leu Phe Ser Ser
405 410 415

Met Met Phe Pro Asp Arg Ser Pro Ser Asp Val His Leu Tyr Thr Thr
420 425 430

Phe Ile Gly Gly Ser Arg Asn Gln Glu Leu Ala Lys Ala Ser Thr Asp
435 440 445

Glu Leu Lys Gln Val Val Thr Ser Asp Leu Gln Arg Leu Leu Gly Val
450 455 460

Glu Gly Glu Pro Val Ser Val Asn His Tyr Tyr Trp Arg Lys Ala Phe
465 470 475 480

Pro Leu Tyr Asp Ser Ser Tyr Asp Ser Val Met Glu Ala Ile Asp Lys
485 490 495

Met Glu Asn Asp Leu Pro Gly Phe Phe Tyr Ala Gly Asn His Arg Gly
500 505 510

Gly Leu Ser Val Gly Lys Ser Ile Ala Ser Gly Cys Lys Ala Ala Asp
515 520 525

Leu Val Ile Ser Tyr Leu Glu Ser Cys Ser Asn Asp Lys Lys Pro Asn
530 535 540

Asp Ser Leu
545

<210> 11

<211> 1647

<212> ADN

<213> Nicotiana tabacum

<400> 11

atgacaacaa ctcccatcgc caatcatcct aatattttca ctcaccagtc gtcgcatcgc 60

ccattggcat tcttaaaccg tacgagtttc atccctttct cttcaatctc caagcgcaat 120

```

agtgtcaatt gcaatggctg gagaacacga tgctccgttg ccaaagatta cacagttcct 180
tcctcagcgg tcgacggcgg acccgccgcg gagctggact gtgttatagt tggagcagga 240
attagtggcc tctgcattgc gcaggtgatg tccgctaatt accccaattt gatggttaacc 300
gaggcgagag atcgtgccgg tggcaacata acgactgtgg aaagagacgg ctatttgtgg 360
gaagaaggtc ccaacagttt ccagccgtcc gatacctatgt tgactatggc agtagattgt 420
ggattgaagg atgatttggg gttgggagat cctaatagcg cccgtttcgt tttgtggaag 480
ggtaaattaa ggcccgtccc ctcaaaaactc actgatcttc ctttttttga tttgatgagc 540
attcctggca agttgagagc tggttttggg gccattggcc tccgcccttc acctccaggt 600
catgaggaat cagttgagca gttcgtgcgt cgtaatcttg gtggcgaagt ctttgaacgc 660
ttgatagaac cattttgttc tgggtgttat gctgggtgatc cctcaaaaact gagtatgaaa 720
gcagcatttg ggaaagtgtg gaagttggaa gaaactgggtg gtagcattat tggaggaacc 780
tttaaagcaa taaaggagag atccagtaca cctaaagcgc cccgcgatcc gcgtttacct 840
aaacccaaaag gacagacagt tggatcattc aggaaggggc tcagaatgct gccggatgca 900
atcagtgcaa gattgggaag caaattaaaa ctatcatgga agctttctag cattactaag 960
tcagaaaaag gaggatatca cttgacatac gagacaccag aaggagtagt ttctcttcaa 1020
agtcgaagca ttgtcatgac tgtgccatcc tatgtagcaa gcaacatatt acgtcctctt 1080
tcggttgccg cagcagatgc actttcaaat ttctactatc ccccagttgg agcagtcaca 1140
atttcatatc ctcaagaagc tattcgtgat gagcgtctgg ttgatgggtga actaaagga 1200
tttgggcagt tgcattccacg tacacaggga gtggaaacac taggaacgat atatagttca 1260
tcactcttcc ctaaccgtgc cccaaaaggc cgggtgctac tcttgaacta cattggagga 1320
gcaaaaaatc ctgaaatttt gtctaagacg gagagccaac ttgtggaagt agttgatcgt 1380
gacctcagaa aaatgcttat aaaacccaaa gctcaagatc ctcttggtgt ggggtgtgcga 1440
gtatggccac aagctatccc acagtttttg gttgggtcatc tggatacgct aagtactgca 1500
aaagctgcta tgaatgataa tgggcttgaa gggctgtttc ttgggggtaa ttatgtgtca 1560
gggtgtagcat tggggaggtg tgttgaaggc gcttatgaag ttgcatccga ggtaacagga 1620
tttctgtctc ggtatgcata caaatga 1647

```

```

<210> 12
<211> 548
<212> PRT
<213> Nicotiana tabacum

```

```

<400> 12

```

```

Met Thr Thr Thr Pro Ile Ala Asn His Pro Asn Ile Phe Thr His Gln
1           5           10           15

```

```

Ser Ser Ser Ser Pro Leu Ala Phe Leu Asn Arg Thr Ser Phe Ile Pro

```

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

Ser Phe Arg Lys Gly Leu Arg Met Leu Pro Asp Ala Ile Ser Ala Arg
 290 295 300

Leu Gly Ser Lys Leu Lys Leu Ser Trp Lys Leu Ser Ser Ile Thr Lys
 305 310 315 320
 Ser Glu Lys Gly Gly Tyr His Leu Thr Tyr Glu Thr Pro Glu Gly Val
 325 330 335

Val Ser Leu Gln Ser Arg Ser Ile Val Met Thr Val Pro Ser Tyr Val
 340 345 350

Ala Ser Asn Ile Leu Arg Pro Leu Ser Val Ala Ala Ala Asp Ala Leu
 355 360 365

Ser Asn Phe Tyr Tyr Pro Pro Val Gly Ala Val Thr Ile Ser Tyr Pro
 370 375 380

Gln Glu Ala Ile Arg Asp Glu Arg Leu Val Asp Gly Glu Leu Lys Gly
 385 390 395 400

Phe Gly Gln Leu His Pro Arg Thr Gln Gly Val Glu Thr Leu Gly Thr
 405 410 415

Ile Tyr Ser Ser Ser Leu Phe Pro Asn Arg Ala Pro Lys Gly Arg Val
 420 425 430

Leu Leu Leu Asn Tyr Ile Gly Gly Ala Lys Asn Pro Glu Ile Leu Ser
 435 440 445

Lys Thr Glu Ser Gln Leu Val Glu Val Val Asp Arg Asp Leu Arg Lys
 450 455 460

Met Leu Ile Lys Pro Lys Ala Gln Asp Pro Leu Val Val Gly Val Arg
 465 470 475 480

Val Trp Pro Gln Ala Ile Pro Gln Phe Leu Val Gly His Leu Asp Thr
 485 490 495

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

Phe Leu Gly Gly Asn Tyr Val Ser Gly Val Ala Leu Gly Arg Cys Val
 515 520 525

Glu Gly Ala Tyr Glu Val Ala Ser Glu Val Thr Gly Phe Leu Ser Arg
 530 535 540

Tyr Ala Tyr Lys

545

<210> 13

<211> 1668

<212> ADN

<213> Cichorium intybus

<400> 13

```

atgacatctc tcacagacgt ttgttccttc aactgttgcc gtagctggtc ttccttccg      60
ccaccggttt ctggtgggtc gttgacgtca aagaatccta ggtacctaat cacgtatagt      120
ccggcgcatac gcaaatgcaa taggtggagg ttccgctgct ctatagccaa ggattcccca      180
attactcctc ccatttcaaa tgagttcaac tctcagccat tgttggactg tgtcattgtg      240
ggcgccggca ttagcggcct ttgcattgcg caggccctag cgactaaaca cgcctccgtc      300
tctccggatg tgatcgtcac cgaggcacga gacagagtcg ggggtaatat atcaacggtt      360
gaaagggatg gctatctctg ggaagaaggc cctaacagct tccagccatc tgatgccatg      420
ctcaccatgg tgggtggatag tgggttgaag gatgatttgg tgtaggtga cccaacagca      480
ccccgctttg tattatgggg aggtgatttg aaaccggttc cttccaaacc ggctgacctc      540
cctttctttg acctcatgag ctttcctgga aaactcagag ccggttttgg tgctcttgga      600
ttccgtcctt cacctccaga tcgcgaagaa tcggttgagg agtttgtag acgtaatctt      660
ggagatgaag ttttcgaacg cttgatagaa cctttttgct cagggtgtta tgctggatgat      720
ccatcaaaac ttagtatgaa agcagcattt ggggaaggct ggaatctgga gcaaaatggt      780
ggtagcattg ttggtggagc cttcaaggct attcaggaca gaaagaatag tcaaaagcct      840
ccacgggacc cgaggttacc gaaaccaaag ggccaaactg ttggatcttt taggaaagga      900
caagcgatgt tgcctaatgc aatctcaacg aggttaggta gcagagtga attgtgttg      960
aagctcacga gtatttcaaa attggagaat agaggttata atttgacata tgaaacacca     1020
caaggatttg aaagtctgca gactaaaact atcgtgatga ctgttccatc ctacgtggcg     1080
agtgaacttg tgcgtccgct ttcgttgggt gcagcagatg cattgtcaaa attttattat     1140
cctccggttg cagctgtatc aatttcatat ccaaaagacg caattcgtgc tgaccggctg     1200
attgatggtc aactcaaagg ttttgggcaa ttgcatccac gaagtcaagg ggtggaaact     1260
ttaggtacga tctacagttc atctcttttc cctaaccgag cgccacctgg aagggttctg     1320
ctcttgaact acatcgaggg ggctacaaat cctgaaattc tatcaaagac ggagggcgaa     1380
attgtggatg cgggtggacc ggacctacgg acgatgctga taaggcgtga tgcggaagat     1440
ccattgacgt tgggggtgcg ggtgtggcct cgagcaatcc cgcagtttct gatcggtcac     1500
tatgacattc tagattctgc aaaagctgct ctgagtagcg gtggattcca aggtatgttt     1560
cttggtggca actatgtgtc tgggtgtggt ttaggtaaat gtgtcgaggc tgcttatgat     1620
gttgccgctg aggtaatgaa ctttttgtcg caaggggtgt acaagtga                    1668

```

<210> 14

<211> 555
 <212> PRT
 <213> Cichorium

<400> 14

Met Thr Ser Leu Thr Asp Val Cys Ser Leu Asn Cys Cys Arg Ser Trp
 1 5 10 15

Ser Ser Leu Pro Pro Pro Val Ser Gly Gly Ser Leu Thr Ser Lys Asn
 20 25 30

Pro Arg Tyr Leu Ile Thr Tyr Ser Pro Ala His Arg Lys Cys Asn Arg
 35 40 45

Trp Arg Phe Arg Cys Ser Ile Ala Lys Asp Ser Pro Ile Thr Pro Pro
 50 55 60

Ile Ser Asn Glu Phe Asn Ser Gln Pro Leu Leu Asp Cys Val Ile Val
 65 70 75 80

Gly Ala Gly Ile Ser Gly Leu Cys Ile Ala Gln Ala Leu Ala Thr Lys
 85 90 95

His Ala Ser Val Ser Pro Asp Val Ile Val Thr Glu Ala Arg Asp Arg
 100 105 110

Val Gly Gly Asn Ile Ser Thr Val Glu Arg Asp Gly Tyr Leu Trp Glu
 115 120 125

Glu Gly Pro Asn Ser Phe Gln Pro Ser Asp Ala Met Leu Thr Met Val
 130 135 140

Val Asp Ser Gly Leu Lys Asp Asp Leu Val Leu Gly Asp Pro Thr Ala
 145 150 155 160

Pro Arg Phe Val Leu Trp Gly Gly Asp Leu Lys Pro Val Pro Ser Lys
 165 170 175

Pro Ala Asp Leu Pro Phe Phe Asp Leu Met Ser Phe Pro Gly Lys Leu
 180 185 190

Arg Ala Gly Phe Gly Ala Leu Gly Phe Arg Pro Ser Pro Pro Asp Arg
 195 200 205

Glu Glu Ser Val Glu Glu Phe Val Arg Arg Asn Leu Gly Asp Glu Val
 210 215 220

Phe Glu Arg Leu Ile Glu Pro Phe Cys Ser Gly Val Tyr Ala Gly Asp
 225 230 235 240

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

500

505

510

Ser Gly Gly Phe Gln Gly Met Phe Leu Gly Gly Asn Tyr Val Ser Gly
 515 520 525

Val Ala Leu Gly Lys Cys Val Glu Ala Ala Tyr Asp Val Ala Ala Glu
 530 535 540

Val Met Asn Phe Leu Ser Gln Gly Val Tyr Lys
 545 550 555

<210> 15

<211> 1689

<212> ADN

<213> Spinacia oleracea

<400> 15

atgagcgcta tggcgttatc gagtacaatg gccctttcgt tgccgcaatc ttctatgtca 60
 ttatcccatt gtaggcacaa ccgtatcacc attttgattc catcttcgtc gcttcgaaga 120
 cgaggaggaa gctctatccg ctgctctaca atctcaacct ctaattccgc ggctgcagcc 180
 aattaccaga acaaaaacat aggcacaaac ggagttgacg gcggcggagg cggaggagggt 240
 gtgttagact gtgtgattgt aggaggtgga atcagtggac ttgcatgtgc acaggctcta 300
 tctactaaat actccaacct ctccacgaat ttcattgtca ccgaggctaa ggatcgagtt 360
 ggcgggaaca tcactaccat ggaagctgat gggatatttat gggaagaggg tcctaatagc 420
 ttccagccat ctgatgcagt gctcaccatg gctgttgaca gtggtttgaa agaggaattg 480
 gtgctgggag atcccaattc gcctcgcttt gtgctgtgga atggcaaatt aaggcctgta 540
 ccttccaagc tactgacct ccctttcttt gatctcatga gcttccttg aaagattagg 600
 gctggtcttg gtgctcttg cttacgacca tctcctccgg ctcatgagga atccgttgaa 660
 caatttgtcc gtcgtaatct tggatgatgag gtctttgaac gcttgatcga acctttttgt 720
 tcaggtgtgt atgctggtga tccttccaag ttgagtatga aagctgcttt tggcaggggt 780
 tgggtcttg agcaaaagg tggtagtatc attggtggca ccctcaaaac aatccaggaa 840
 agaaaggata atcctaagcc acctcgagac ccgcgcctcc ccaaaccaaa gggccagaca 900
 gttggatcct tcaggaaagg actgagtatg ttgccaaccg ccatttctga aaggcttggc 960
 aacaaagtga aagtatcatg gaccctttct ggtattgcta agtcgtcgaa cggagagtat 1020
 aatctgactt atgaaacacc agatggactg gtttccgtta ggaccaaag tgttgtgatg 1080
 actgtcccgt catatgttgc aagtagcctc cttcgtccac tttcagatgt cgcgcagaa 1140
 tctctttcaa aatttcatta tccaccagtt gcagctgtgt cactttccta tcctaaagaa 1200
 gcaattagat cagagtgcct gattgacggg gaacttaaag gattcgggca attacattcc 1260
 cgcagtcaag gtgtggaaac cttgggaaca atttatagtt catctctttt ccctgggcga 1320
 gcaccacctg gtaggacctt gattttgaac tacattggag gtgatactaa ccctggcata 1380

ttagacaaga cgaaagatga actagctgaa gcagttgaca gggatttgag aagaattctc 1440
 ataaacccta atgcaaaagc tccccgggtt ttgggtgtga gagtatggcc acaagcaatt 1500
 cccaatttt taattggcca ctttgatctg ctcgatgcag caaaagctgc tttgactgat 1560
 ggtggacaca aaggattgtt tcttggtgga aactatgtat caggtgttgc tttgggccga 1620
 tgtatagagg gtgcttatga atctgcagcc gaggtttag attttctgtc acagtactcg 1680
 gataaatag 1689

<210> 16
 <211> 562
 <212> PRT
 <213> Spinacia

<400> 16

Met Ser Ala Met Ala Leu Ser Ser Thr Met Ala Leu Ser Leu Pro Gln
1 5 10 15

Ser Ser Met Ser Leu Ser His Cys Arg His Asn Arg Ile Thr Ile Leu
20 25 30

Ile Pro Ser Ser Ser Leu Arg Arg Arg Gly Gly Ser Ser Ile Arg Cys
35 40 45

Ser Thr Ile Ser Thr Ser Asn Ser Ala Ala Ala Ala Asn Tyr Gln Asn
50 55 60

Lys Asn Ile Gly Thr Asn Gly Val Asp Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
65 70 75 80

Val Leu Asp Cys Val Ile Val Gly Gly Gly Ile Ser Gly Leu Cys Ile
85 90 95

Ala Gln Ala Leu Ser Thr Lys Tyr Ser Asn Leu Ser Thr Asn Phe Ile
100 105 110

Val Thr Glu Ala Lys Asp Arg Val Gly Gly Asn Ile Thr Thr Met Glu
115 120 125

Ala Asp Gly Tyr Leu Trp Glu Glu Gly Pro Asn Ser Phe Gln Pro Ser
130 135 140

Asp Ala Val Leu Thr Met Ala Val Asp Ser Gly Leu Lys Glu Glu Leu
145 150 155 160

Val Leu Gly Asp Pro Asn Ser Pro Arg Phe Val Leu Trp Asn Gly Lys
165 170 175

Leu Arg Pro Val Pro Ser Lys Leu Thr Asp Leu Pro Phe Phe Asp Leu

```

      180      185      190
Met Ser Phe Pro Gly Lys Ile Arg Ala Gly Leu Gly Ala Leu Gly Leu
      195      200      205

Arg Pro Ser Pro Pro Ala His Glu Glu Ser Val Glu Gln Phe Val Arg
      210      215      220

Arg Asn Leu Gly Asp Glu Val Phe Glu Arg Leu Ile Glu Pro Phe Cys
      225      230      235      240

Ser Gly Val Tyr Ala Gly Asp Pro Ser Lys Leu Ser Met Lys Ala Ala
      245      250      255

Phe Gly Arg Val Trp Val Leu Glu Gln Lys Gly Gly Ser Ile Ile Gly
      260      265      270

Gly Thr Leu Lys Thr Ile Gln Glu Arg Lys Asp Asn Pro Lys Pro Pro
      275      280      285

Arg Asp Pro Arg Leu Pro Lys Pro Lys Gly Gln Thr Val Gly Ser Phe
      290      295      300

Arg Lys Gly Leu Ser Met Leu Pro Thr Ala Ile Ser Glu Arg Leu Gly
      305      310      315      320

Asn Lys Val Lys Val Ser Trp Thr Leu Ser Gly Ile Ala Lys Ser Ser
      325      330      335

Asn Gly Glu Tyr Asn Leu Thr Tyr Glu Thr Pro Asp Gly Leu Val Ser
      340      345      350

Val Arg Thr Lys Ser Val Val Met Thr Val Pro Ser Tyr Val Ala Ser
      355      360      365

Ser Leu Leu Arg Pro Leu Ser Asp Val Ala Ala Glu Ser Leu Ser Lys
      370      375      380

Phe His Tyr Pro Pro Val Ala Ala Val Ser Leu Ser Tyr Pro Lys Glu
      385      390      395      400

Ala Ile Arg Ser Glu Cys Leu Ile Asp Gly Glu Leu Lys Gly Phe Gly
      405      410      415

Gln Leu His Ser Arg Ser Gln Gly Val Glu Thr Leu Gly Thr Ile Tyr
      420      425      430
Ser Ser Ser Leu Phe Pro Gly Arg Ala Pro Pro Gly Arg Thr Leu Ile
      435      440      445

Leu Asn Tyr Ile Gly Gly Asp Thr Asn Pro Gly Ile Leu Asp Lys Thr

```

450 455 460
 Lys Asp Glu Leu Ala Glu Ala Val Asp Arg Asp Leu Arg Arg Ile Leu
 465 470 475 480
 Ile Asn Pro Asn Ala Lys Ala Pro Arg Val Leu Gly Val Arg Val Trp
 485 490 495
 Pro Gln Ala Ile Pro Gln Phe Leu Ile Gly His Phe Asp Leu Leu Asp
 500 505 510
 Ala Ala Lys Ala Ala Leu Thr Asp Gly Gly His Lys Gly Leu Phe Leu
 515 520 525
 Gly Gly Asn Tyr Val Ser Gly Val Ala Leu Gly Arg Cys Ile Glu Gly
 530 535 540
 Ala Tyr Glu Ser Ala Ala Glu Val Val Asp Phe Leu Ser Gln Tyr Ser
 545 550 555 560

Asp Lys

<210> 17
 <211> 1596
 <212> ADN
 <213> Spinacia oleracea

<400> 17
 atggttaatac taccggtttc ccagctatca actaatctgg gtttatcgct ggtttcaccc 60
 accaagaaca acccagttat gggcaacggt tctgagcgaa atcaagtcaa tcaacccatt 120
 tctgctaaaa gggttgctgt tgttggtgct ggtgttagtg gacttgctgc ggcgtataag 180
 ctaaaatcga atggcttgaa tgtgacattg tttgaagctg atagtagagc tggtgggaaa 240
 ctcaaaaactg ttgtaaagga tggtttgatt tgggatgaag gggcaaatac catgacagag 300
 agcgatgagg aggtcacgag tttgtttgat gatctcggga ttcgtgagaa gctacagcta 360
 ccaatttcac aaaacaaaag atacattgcc agagatgggc ttctgtgct gttaccttca 420
 aatccagttg cgctcctgaa gagcaatatc ctttcagcaa aatctaagct acaaattatg 480
 ttggaacctt ttctttggaa aaaacacaat ggtgctaagg tttctgacga gaatgcccaa 540
 gaaagtgtgg ctgagttttt tgagcggcat tttgggaaag agtttgttga ttatttaatt 600
 gatccttttg tcgcgggtac aagtgggtga gatcctcaat ctctttctat gcgtcatgca 660
 tttccagaat tatggaatat tgagaacagg tttggttcag tgatttctgg attcattcag 720
 tctaaactgt catccaagaa ggaaaagggt ggagaaaagc aatcttctaa taagaagcca 780
 cgtgtacgtg gttcgttttc ttttcagggt ggaatgcaga cactagttga cactatatgc 840
 aaagagtttg gtgaagatga actcaaactc cagtctgagg ttctttcatt gtcatacagc 900

```

cataatggaa gccttacatc agagaattgg tcagtgtctt ctatgtcaaa cagcaccatc      960
caagatcaac catatgatgc tgtcgttggt accgccccaa tcaataatgt caaagaactg      1020
aagattatga aagtggaaaa cccattttct cttgacttca ttccagaggt gagctgtcta      1080
cccctctctg ttattattac tacattcaag aagaccaatg tgaagagacc tcttgagggt      1140
tttggtgttc ttgtaccctc taatgagcaa cataatgggc tgaagactct tggtagcttg      1200
ttttcctcaa tgatgtttcc tgatcgtgct ccctctgatg tgtatctata cactaccttt      1260
gttgagggta gcagaaatag agaacttgca aaagcttcaa cggatgaact gaagcaaata      1320
gtttcttctg acctccagca gctgttgggc accgagggcg aacctacttt tgtgaatcat      1380
ttttactgga gcaaagcatt ccctctttat ggacgcaatt acgactcagt tcttagagca      1440
atagagaaga tggaaaggga ccttccttga cttttttacg caggtaacca taagggtgga      1500
ctgtctgtgg gaaagtcaat agcctctgga tacaaagctg ccgagcttgc gatatcctat      1560
ctcgagtcta acaagatgac cgaggagact atataa                                1596

```

```

<210> 18
<211> 531
<212> PRT
<213> Spinacia

```

```

<400> 18

```

```

Met Val Ile Leu Pro Val Ser Gln Leu Ser Thr Asn Leu Gly Leu Ser
1              5              10              15

Leu Val Ser Pro Thr Lys Asn Asn Pro Val Met Gly Asn Val Ser Glu
                20              25              30

Arg Asn Gln Val Asn Gln Pro Ile Ser Ala Lys Arg Val Ala Val Val
          35              40              45

Gly Ala Gly Val Ser Gly Leu Ala Ala Ala Tyr Lys Leu Lys Ser Asn
50              55              60

Gly Leu Asn Val Thr Leu Phe Glu Ala Asp Ser Arg Ala Gly Gly Lys
65              70              75              80

Leu Lys Thr Val Val Lys Asp Gly Leu Ile Trp Asp Glu Gly Ala Asn
          85              90              95

Thr Met Thr Glu Ser Asp Glu Glu Val Thr Ser Leu Phe Asp Asp Leu
          100             105             110

Gly Ile Arg Glu Lys Leu Gln Leu Pro Ile Ser Gln Asn Lys Arg Tyr
          115             120             125

Ile Ala Arg Asp Gly Leu Pro Val Leu Leu Pro Ser Asn Pro Val Ala
          130             135             140

Leu Leu Lys Ser Asn Ile Leu Ser Ala Lys Ser Lys Leu Gln Ile Met
145             150             155             160

```

Leu Glu Pro Phe Leu Trp Lys Lys His Asn Gly Ala Lys Val Ser Asp
 165 170 175

Glu Asn Ala Gln Glu Ser Val Ala Glu Phe Phe Glu Arg His Phe Gly
 180 185 190

Lys Glu Phe Val Asp Tyr Leu Ile Asp Pro Phe Val Ala Gly Thr Ser
 195 200 205

Gly Gly Asp Pro Gln Ser Leu Ser Met Arg His Ala Phe Pro Glu Leu
 210 215 220

Trp Asn Ile Glu Asn Arg Phe Gly Ser Val Ile Ser Gly Phe Ile Gln
 225 230 235 240

Ser Lys Leu Ser Ser Lys Lys Glu Lys Gly Gly Glu Lys Gln Ser Ser
 245 250 255

Asn Lys Lys Pro Arg Val Arg Gly Ser Phe Ser Phe Gln Gly Gly Met
 260 265 270

Gln Thr Leu Val Asp Thr Ile Cys Lys Glu Phe Gly Glu Asp Glu Leu
 275 280 285

Lys Leu Gln Ser Glu Val Leu Ser Leu Ser Tyr Ser His Asn Gly Ser
 290 295 300

Leu Thr Ser Glu Asn Trp Ser Val Ser Ser Met Ser Asn Ser Thr Ile
 305 310 315 320

Gln Asp Gln Pro Tyr Asp Ala Val Val Val Thr Ala Pro Ile Asn Asn
 325 330 335

Val Lys Glu Leu Lys Ile Met Lys Val Glu Asn Pro Phe Ser Leu Asp
 340 345 350

Phe Ile Pro Glu Val Ser Cys Leu Pro Leu Ser Val Ile Ile Thr Thr
 355 360 365

Phe Lys Lys Thr Asn Val Lys Arg Pro Leu Glu Gly Phe Gly Val Leu
 370 375 380

Val Pro Ser Asn Glu Gln His Asn Gly Leu Lys Thr Leu Gly Thr Leu
 385 390 395 400

Phe Ser Ser Met Met Phe Pro Asp Arg Ala Pro Ser Asp Val Tyr Leu
 405 410 415

Tyr Thr Thr Phe Val Gly Gly Ser Arg Asn Arg Glu Leu Ala Lys Ala
 420 425 430

Ser Thr Asp Glu Leu Lys Gln Ile Val Ser Ser Asp Leu Gln Gln Leu
 435 440 445

Leu Gly Thr Glu Gly Glu Pro Thr Phe Val Asn His Phe Tyr Trp Ser
450 455 460

Lys Ala Phe Pro Leu Tyr Gly Arg Asn Tyr Asp Ser Val Leu Arg Ala
465 470 475 480

Ile Glu Lys Met Glu Arg Asp Leu Pro Gly Leu Phe Tyr Ala Gly Asn
485 490 495

His Lys Gly Gly Leu Ser Val Gly Lys Ser Ile Ala Ser Gly Tyr Lys
500 505 510

Ala Ala Glu Leu Ala Ile Ser Tyr Leu Glu Ser Asn Lys Met Thr Glu
515 520 525

Glu Thr Ile
530

<210> 19
<211> 1674
<212> ADN
<213> Solanum tuberosum

<400> 19
atgacaacaa cggccgtcgc caaccatcct agcattttca ctcaccggtc gccgctgccg 60
tcgccgtcgt cctcctctc atcgccgtca tttttatttt taaaccgtac gaatttcatt 120
ccttactttt ccacctccaa gcgcaatagt gtcaattgca atggctggag aacacgatgt 180
tcggttgcca aggattatac agttcctccc tcggaagtcg acggtaatca gttcccggag 240
ctggattgtg tggtagtgg agcaggaatt agtggactct gcattgctaa ggtgatttcg 300
gctaattatc ccaatttgat ggtgacggag gcgagggatc gtgccggtgg aaacataacg 360
acggtggaaa gagatggata cttatgggaa gaaggtccta acagtttcca gccttcggat 420
cctatgttga caatggctgt agattgtgga ttgaaggatg atttggtgtt gggagatcct 480
gatgcgcctc gctttgtctt gtggaaggat aaactaaggc ctgttcccgg caagctcact 540
gatcttcctt tctttgattt gatgagtatc cctggcaagc tcagagctgg ttttggtgcc 600
attggccttc gcccttcacc tccaggttat gaggaatcag ttgagcagtt cgtgcgtcgt 660
aatcttggtg cagaagtctt tgaacgtttg attgaaccat tttgttctgg tgtttacgcc 720
ggtgaccctt caaaattgat tatgaaagca gcatttgga aagtgtggaa gctagaacaa 780
actggtggta gcattattgg gggaaccttt aaagcaatta aggagagatc cagtaacctt 840
aaaccgcctc gtgatccgcg ttaccaaca ccaaaggac aaactggtgg atcatttagg 900
aagggctctga gaatgctgcc ggatgcaatt tgtgaaagac tgggaagcaa agtaaaacta 960
tcatggaagc tttctagcat tacaagtca gaaaaaggag gatattctctt gacatacgag 1020
acaccagaag gagtagtttc tctgcgaagt cgaagcattg tcatgactgt tccatcctat 1080

gtagcaagca acatattacg ccctcttttcg gtcgctgcag cagatgcact ttcaagtttc 1140
 tactatcccc cagtagcagc agtgacaatt tcatatcctc aagaggctat tcgtgatgag 1200
 cgtctggttg atggtgaact aaagggattt gggcagttgc atccacgttc acagggagtg 1260
 gaaacactag gaacaatata tagttcatca ctctttccta accgtgctcc aaatggccgg 1320
 gtgctactct tgaactacat tggaggagca acaaatactg aaattgtgtc taagacggag 1380
 agccaacttg tggaagcagt tgaccgtgac ctcagaaaaa tgcttataaa acccaaagca 1440
 caagatccct ttgttacggg tgtgcgagta tggccacaag ctatcccaca gtttttggtc 1500
 ggacatctgg atacactagg tactgcaaaa actgctctaa gtgataatgg gcttgacggg 1560
 ctattccttg ggggtaatta tgtgtctggt gtagcattgg gaaggtgtgt tgaaggtgct 1620
 tatgaaatag catctgaggt aactggattt ctgtctcagt atgcatacaa atga 1674

<210> 20

<211> 557

<212> PRT

<213> Solanum tuberosum

<400> 20

Met Thr Thr Thr Ala Val Ala Asn His Pro Ser Ile Phe Thr His Arg
1 5 10 15

Ser Pro Leu Pro Ser Pro Ser Ser Ser Ser Ser Pro Ser Phe Leu
20 25 30

Phe Leu Asn Arg Thr Asn Phe Ile Pro Tyr Phe Ser Thr Ser Lys Arg
35 40 45

Asn Ser Val Asn Cys Asn Gly Trp Arg Thr Arg Cys Ser Val Ala Lys
50 55 60

Asp Tyr Thr Val Pro Pro Ser Glu Val Asp Gly Asn Gln Phe Pro Glu
65 70 75 80

Leu Asp Cys Val Val Val Gly Ala Gly Ile Ser Gly Leu Cys Ile Ala
85 90 95

Lys Val Ile Ser Ala Asn Tyr Pro Asn Leu Met Val Thr Glu Ala Arg
100 105 110

Asp Arg Ala Gly Gly Asn Ile Thr Thr Val Glu Arg Asp Gly Tyr Leu
115 120 125

Trp Glu Glu Gly Pro Asn Ser Phe Gln Pro Ser Asp Pro Met Leu Thr
130 135 140

Met Ala Val Asp Cys Gly Leu Lys Asp Asp Leu Val Leu Gly Asp Pro
145 150 155 160

Asp Ala Pro Arg Phe Val Leu Trp Lys Asp Lys Leu Arg Pro Val Pro
 165 170 175

Gly Lys Leu Thr Asp Leu Pro Phe Phe Asp Leu Met Ser Ile Pro Gly
 180 185 190

Lys Leu Arg Ala Gly Phe Gly Ala Ile Gly Leu Arg Pro Ser Pro Pro
 195 200 205

Gly Tyr Glu Glu Ser Val Glu Gln Phe Val Arg Arg Asn Leu Gly Ala
 210 215 220

Glu Val Phe Glu Arg Leu Ile Glu Pro Phe Cys Ser Gly Val Tyr Ala
 225 230 235 240

Gly Asp Pro Ser Lys Leu Ile Met Lys Ala Ala Phe Gly Lys Val Trp
 245 250 255

Lys Leu Glu Gln Thr Gly Gly Ser Ile Ile Gly Gly Thr Phe Lys Ala
 260 265 270

Ile Lys Glu Arg Ser Ser Asn Pro Lys Pro Pro Arg Asp Pro Arg Leu
 275 280 285

Pro Thr Pro Lys Gly Gln Thr Val Gly Ser Phe Arg Lys Gly Leu Arg
 290 295 300

Met Leu Pro Asp Ala Ile Cys Glu Arg Leu Gly Ser Lys Val Lys Leu
 305 310 315 320

Ser Trp Lys Leu Ser Ser Ile Thr Lys Ser Glu Lys Gly Gly Tyr Leu
 325 330 335

Leu Thr Tyr Glu Thr Pro Glu Gly Val Val Ser Leu Arg Ser Arg Ser
 340 345 350

Ile Val Met Thr Val Pro Ser Tyr Val Ala Ser Asn Ile Leu Arg Pro
 355 360 365

Leu Ser Val Ala Ala Ala Asp Ala Leu Ser Ser Phe Tyr Tyr Pro Pro
 370 375 380

Val Ala Ala Val Thr Ile Ser Tyr Pro Gln Glu Ala Ile Arg Asp Glu
 385 390 395 400

Arg Leu Val Asp Gly Glu Leu Lys Gly Phe Gly Gln Leu His Pro Arg
 405 410 415

Ser Gln Gly Val Glu Thr Leu Gly Thr Ile Tyr Ser Ser Ser Leu Phe
 420 425 430

Pro Asn Arg Ala Pro Asn Gly Arg Val Leu Leu Leu Asn Tyr Ile Gly
 435 440 445

Gly Ala Thr Asn Thr Glu Ile Val Ser Lys Thr Glu Ser Gln Leu Val
 450 455 460

Glu Ala Val Asp Arg Asp Leu Arg Lys Met Leu Ile Lys Pro Lys Ala
 465 470 475 480

Gln Asp Pro Phe Val Thr Gly Val Arg Val Trp Pro Gln Ala Ile Pro
 485 490 495

Gln Phe Leu Val Gly His Leu Asp Thr Leu Gly Thr Ala Lys Thr Ala
 500 505 510

Leu Ser Asp Asn Gly Leu Asp Gly Leu Phe Leu Gly Gly Asn Tyr Val
 515 520 525

Ser Gly Val Ala Leu Gly Arg Cys Val Glu Gly Ala Tyr Glu Ile Ala
 530 535 540

Ser Glu Val Thr Gly Phe Leu Ser Gln Tyr Ala Tyr Lys
 545 550 555

<210> 21
 <211> 1608
 <212> ADN
 <213> Zea mays

<400> 21
 atggtcgccg ccacagccac cgccatggcc accgctgcat cgccgctact caacgggacc 60
 cgaataacctg cgcggtccg ccatcgagga ctacgctgctg gctgctgctg tgtggcgggc 120
 ggcggggccg aggcaccggc atccaccggc gcgcggtgt ccgcggtgctg cgtcgtggtg 180
 ggcggaggca tcagtggcct ctgcaccgctg caggcgctgg ccacgcggca cggcgctcggg 240
 gacgtgcttg tcacggaggc ccgcgcccg cccggcgga acattaccac cgtcgagcgc 300
 cccgaggaag ggtacctctg ggaggagggt cccaacagct tccagccctc cgaccccggt 360
 ctcacatgg ccgtggacag cggactgaag gatgacttgg tttttggga cccaaacgcg 420
 ccgcttttcg tgctgtggga ggggaagctg aggccgtgc catccaagcc cgccgacctc 480
 ccgttcttcg atctcatgag catcccaggg aagctcaggg ccggtctagg cgcgcttgcc 540
 atccgcccgc ctctccagg ccgcgaagag tcagtggagg agttcgtgctg ccgcaacctc 600

```

ggtgctgagg tctttgagcg cctcattgag cctttctgct caggtgtcta tgctggtgat      660
ccttctaagc tcagcatgaa ggctgcattt gggaagggtt ggcggttgga agaaactgga      720
ggtagtatta ttggtggaac catcaagaca attcaggaga ggagcaagaa tccaaaacca      780
ccgaggggatg cccgccttcc gaagccaaaa gggcagacag ttgcatcttt caggaagggt      840
cttgccatgc ttccaaatgc cattacatcc agcttgggta gtaaagtcaa actatcatgg      900
aaactcacga gcattacaaa atcagatgac aagggatatg ttttggagta tgaaacgcca      960
gaaggggttg tttcgggtgca ggctaaaagt gttatcatga ctattccatc atatgttgct    1020
agcaacattt tgcgtccact ttcaagcgat gctgcagatg ctctatcaag attctattat    1080
ccaccggttg ctgctgtaac tgtttcgtat ccaaaggaag caattagaaa agaattgctta    1140
attgatgggg aactccaggg ctttggccag ttgcatccac gtagtcaagg agttgagaca    1200
ttaggaacaa tatacagttc ctactcttt ccaaactcgtg ctctgacgg taggggtgta    1260
cttctaaact acataggagg tgctacaaac acaggaattg tttccaagac tgaaagtgag    1320
ctggtcgaag cagttgaccg tgacctccga aaaatgctta taaattctac agcagtggac    1380
cctttagtcc ttggtgttcg agtttggcca caagccatac ctgagttcct ggtaggacat    1440
cttgatcttc tggaagccgc aaaagctgcc ctggaccgag gtggctacga tgggctgttc    1500
ctaggaggga actatgttgc aggagttgcc ctgggcagat gcgttgaggg cgcgatatgaa    1560
agtgcctcgc aaatatctga cttcttgacc aagtatgcct acaagtga                    1608

```

<210> 22

<211> 535

<212> PRT

<213> Zea mays

<400> 22

```

Met Val Ala Ala Thr Ala Thr Ala Met Ala Thr Ala Ala Ser Pro Leu
1              5              10              15

```

```

Leu Asn Gly Thr Arg Ile Pro Ala Arg Leu Arg His Arg Gly Leu Ser
                20              25              30

```

```

Val Arg Cys Ala Ala Val Ala Gly Gly Ala Ala Glu Ala Pro Ala Ser
        35              40              45

```

```

Thr Gly Ala Arg Leu Ser Ala Asp Cys Val Val Val Gly Gly Gly Ile
50              55              60

```

```

Ser Gly Leu Cys Thr Ala Gln Ala Leu Ala Thr Arg His Gly Val Gly
65              70              75              80

```

```

Asp Val Leu Val Thr Glu Ala Arg Ala Arg Pro Gly Gly Asn Ile Thr
        85              90              95

```

```

Thr Val Glu Arg Pro Glu Glu Gly Tyr Leu Trp Glu Glu Gly Pro Asn
        100             105             110

```

```

Ser Phe Gln Pro Ser Asp Pro Val Leu Thr Met Ala Val Asp Ser Gly
        115             120             125

```

Leu Lys Asp Asp Leu Val Phe Gly Asp Pro Asn Ala Pro Arg Phe Val
 130 135 140

Leu Trp Glu Gly Lys Leu Arg Pro Val Pro Ser Lys Pro Ala Asp Leu
 145 150 155 160

Pro Phe Phe Asp Leu Met Ser Ile Pro Gly Lys Leu Arg Ala Gly Leu
 165 170 175

Gly Ala Leu Gly Ile Arg Pro Pro Pro Gly Arg Glu Glu Ser Val
 180 185 190

Glu Glu Phe Val Arg Arg Asn Leu Gly Ala Glu Val Phe Glu Arg Leu
 195 200 205

Ile Glu Pro Phe Cys Ser Gly Val Tyr Ala Gly Asp Pro Ser Lys Leu
 210 215 220

Ser Met Lys Ala Ala Phe Gly Lys Val Trp Arg Leu Glu Glu Thr Gly
 225 230 235 240

Gly Ser Ile Ile Gly Gly Thr Ile Lys Thr Ile Gln Glu Arg Ser Lys
 245 250 255

Asn Pro Lys Pro Pro Arg Asp Ala Arg Leu Pro Lys Pro Lys Gly Gln
 260 265 270

Thr Val Ala Ser Phe Arg Lys Gly Leu Ala Met Leu Pro Asn Ala Ile
 275 280 285

Thr Ser Ser Leu Gly Ser Lys Val Lys Leu Ser Trp Lys Leu Thr Ser
 290 295 300

Ile Thr Lys Ser Asp Asp Lys Gly Tyr Val Leu Glu Tyr Glu Thr Pro
 305 310 315 320

Glu Gly Val Val Ser Val Gln Ala Lys Ser Val Ile Met Thr Ile Pro
 325 330 335

Ser Tyr Val Ala Ser Asn Ile Leu Arg Pro Leu Ser Ser Asp Ala Ala
 340 345 350

Asp Ala Leu Ser Arg Phe Tyr Tyr Pro Pro Val Ala Ala Val Thr Val
 355 360 365

Ser Tyr Pro Lys Glu Ala Ile Arg Lys Glu Cys Leu Ile Asp Gly Glu
 370 375 380

Leu Gln Gly Phe Gly Gln Leu His Pro Arg Ser Gln Gly Val Glu Thr
 385 390 395 400

Leu Gly Thr Ile Tyr Ser Ser Ser Leu Phe Pro Asn Arg Ala Pro Asp
 405 410 415

Gly Arg Val Leu Leu Leu Asn Tyr Ile Gly Gly Ala Thr Asn Thr Gly
 420 425 430

Ile Val Ser Lys Thr Glu Ser Glu Leu Val Glu Ala Val Asp Arg Asp

435 440 445
 Leu Arg Lys Met Leu Ile Asn Ser Thr Ala Val Asp Pro Leu Val Leu
 450 455 460

 Gly Val Arg Val Trp Pro Gln Ala Ile Pro Gln Phe Leu Val Gly His
 465 470 475 480

 Leu Asp Leu Leu Glu Ala Ala Lys Ala Ala Leu Asp Arg Gly Gly Tyr
 485 490 495

 Asp Gly Leu Phe Leu Gly Gly Asn Tyr Val Ala Gly Val Ala Leu Gly
 500 505 510

 Arg Cys Val Glu Gly Ala Tyr Glu Ser Ala Ser Gln Ile Ser Asp Phe
 515 520 525

 Leu Thr Lys Tyr Ala Tyr Lys
 530 535

<210> 23
 <211> 1635
 <212> ADN
 <213> Zea mays

<400> 23
 atgctcgctt tgactgcctc agcctcatcc gcttcgtccc atccttatcg ccacgcctcc 60
 gcgcacactc gtcgcccccg cctacgtgcg gtcctcgoga tggcgggctc cgacgacccc 120
 cgtgcagcgc ccgccagatc ggctgcgcgtc gtcggcgccg gggtcagcgg gctcgcggcg 180
 gcgtacaggc tcagacagag cggcgtgaac gtaacgggtg tcgaagcggc cgacagggcg 240
 ggaggaaaga tacggaccaa ttccgagggc gggtttgtct gggatgaagg agctaacacc 300
 atgacagaag gtgaatggga ggccagtaga ctgattgatg atcttgggtc acaagacaaa 360
 cagcagtatc ctaactccca acacaagcgt tacattgtca aagatggagc accagcactg 420
 attccttcgg atcccatttc gctaataaaa agcagtgttc tttcgacaaa atcaaagatt 480
 gcgttatattt ttgaaccatt tctctacaag aaagctaaca caagaaactc tggaaaagtg 540
 tctgaggagc acttgagtga gagggttggg agcttctgtg aacgccactt tggaagagaa 600
 gttgttgact attttgttga tccatttgta gctggaacaa gtgcaggaga tccagagtca 660
 ctatctattc gtcatgcatt cccagcattg tggaatttgg aaagaaagta tggttcagtt 720
 attgttggtg ccatcttgtc taagctagca gctaaagggt atccagtaaa gacaagacat 780
 gattcatcag ggaaaagaag gaatagacga gtgtcgtttt catttcatgg tggaatgcag 840
 tcactaataa atgcacttca caatgaagtt ggagatgata atgtgaagct tggtagacaa 900
 gtgttgtcat tggcatgtac atttgatgga gttcctgcac taggcagggt gtcaatttct 960

```

gttgattcga aggatagcgg tgacaaggac cttgctagta accaaacctt tgatgctggt 1020
ataatgacag ctccattgtc aaatgtccgg aggatgaagt tcaccaaagg tggagctccg 1080
gttgttcttg actttcttcc taagatggat tatctaccac tatctctcat ggtgactgct 1140
tttaagaagg atgatgtcaa gaaacctctg gaaggatttg gggctcttaac accttacaag 1200
gaacagcaaa aacatgggtct gaaaaccctt gggactctct tttcctcaat gatgttccca 1260
gatcgagctc ctgatgacca atatttatat acaacatttg ttgggggtag ccacaataga 1320
gatcttgctg gagctccaac gtctattctg aaacaacttg tgacctctga ccttaaaaaa 1380
ctcttgggcg tagaggggca accaactttt gtcaagcatg tatactgggg aaatgctttt 1440
cctttgtatg gccatgatta tagttctgta ttggaagcta tagaaaagat ggagaaaaac 1500
cttccagggt tcttctacgc aggaaatagc aaggatgggc ttgctgttgg aagtgttata 1560
gcttcaggaa gcaaggctgc tgaccttgca atctcatatc ttgaatctca caccaagcat 1620
aataattcac attga 1635

```

```

<210> 24
<211> 544
<212> PRT
<213> Zea mays

```

```

<400> 24

```

```

Met Leu Ala Leu Thr Ala Ser Ala Ser Ser Ala Ser Ser His Pro Tyr
1          5          10          15

```

```

Arg His Ala Ser Ala His Thr Arg Arg Pro Arg Leu Arg Ala Val Leu
          20          25          30

```

```

Ala Met Ala Gly Ser Asp Asp Pro Arg Ala Ala Pro Ala Arg Ser Val
          35          40          45

```

```

Ala Val Val Gly Ala Gly Val Ser Gly Leu Ala Ala Ala Tyr Arg Leu
          50          55          60

```

```

Arg Gln Ser Gly Val Asn Val Thr Val Phe Glu Ala Ala Asp Arg Ala
65          70          75          80

```

```

Gly Gly Lys Ile Arg Thr Asn Ser Glu Gly Gly Phe Val Trp Asp Glu
          85          90          95

```

```

Gly Ala Asn Thr Met Thr Glu Gly Glu Trp Glu Ala Ser Arg Leu Ile
          100          105          110

```

```

Asp Asp Leu Gly Leu Gln Asp Lys Gln Gln Tyr Pro Asn Ser Gln His
          115          120          125

```

```

Lys Arg Tyr Ile Val Lys Asp Gly Ala Pro Ala Leu Ile Pro Ser Asp

```

130	135	140
Pro Ile Ser Leu Met Lys Ser Ser Val Leu Ser Thr Lys Ser Lys Ile		
145	150	155 160
Ala Leu Phe Phe Glu Pro Phe Leu Tyr Lys Lys Ala Asn Thr Arg Asn		
	165	170 175
Ser Gly Lys Val Ser Glu Glu His Leu Ser Glu Ser Val Gly Ser Phe		
	180	185 190
Cys Glu Arg His Phe Gly Arg Glu Val Val Asp Tyr Phe Val Asp Pro		
	195	200 205
Phe Val Ala Gly Thr Ser Ala Gly Asp Pro Glu Ser Leu Ser Ile Arg		
	210	215 220
His Ala Phe Pro Ala Leu Trp Asn Leu Glu Arg Lys Tyr Gly Ser Val		
225	230	235 240
Ile Val Gly Ala Ile Leu Ser Lys Leu Ala Ala Lys Gly Asp Pro Val		
	245	250 255
Lys Thr Arg His Asp Ser Ser Gly Lys Arg Arg Asn Arg Arg Val Ser		
	260	265 270
Phe Ser Phe His Gly Gly Met Gln Ser Leu Ile Asn Ala Leu His Asn		
	275	280 285
Glu Val Gly Asp Asp Asn Val Lys Leu Gly Thr Glu Val Leu Ser Leu		
	290	295 300
Ala Cys Thr Phe Asp Gly Val Pro Ala Leu Gly Arg Trp Ser Ile Ser		
305	310	315 320
Val Asp Ser Lys Asp Ser Gly Asp Lys Asp Leu Ala Ser Asn Gln Thr		
	325	330 335
Phe Asp Ala Val Ile Met Thr Ala Pro Leu Ser Asn Val Arg Arg Met		
	340	345 350
Lys Phe Thr Lys Gly Gly Ala Pro Val Val Leu Asp Phe Leu Pro Lys		
	355	360 365
Met Asp Tyr Leu Pro Leu Ser Leu Met Val Thr Ala Phe Lys Lys Asp		
	370	375 380
Asp Val Lys Lys Pro Leu Glu Gly Phe Gly Val Leu Ile Pro Tyr Lys		
385	390	395 400

Glu Gln Gln Lys His Gly Leu Lys Thr Leu Gly Thr Leu Phe Ser Ser
 405 410 415

Met Met Phe Pro Asp Arg Ala Pro Asp Asp Gln Tyr Leu Tyr Thr Thr
 420 425 430

Phe Val Gly Gly Ser His Asn Arg Asp Leu Ala Gly Ala Pro Thr Ser
 435 440 445

Ile Leu Lys Gln Leu Val Thr Ser Asp Leu Lys Lys Leu Leu Gly Val
 450 455 460

Glu Gly Gln Pro Thr Phe Val Lys His Val Tyr Trp Gly Asn Ala Phe
 465 470 475 480

Pro Leu Tyr Gly His Asp Tyr Ser Ser Val Leu Glu Ala Ile Glu Lys
 485 490 495

Met Glu Lys Asn Leu Pro Gly Phe Phe Tyr Ala Gly Asn Ser Lys Asp
 500 505 510

Gly Leu Ala Val Gly Ser Val Ile Ala Ser Gly Ser Lys Ala Ala Asp
 515 520 525

Leu Ala Ile Ser Tyr Leu Glu Ser His Thr Lys His Asn Asn Ser His
 530 535 540

<210> 25
 <211> 1692
 <212> ADN
 <213> Chlamydomonas reinhardtii

<400> 25
 atgatgttga cccagactcc tgggaccgcc acggcttcta gccggcggtc gcagatccgc 60
 tcggctgcgc acgtctccgc caaggctcgc cctcggccca cgccattctc ggtcgcgagc 120
 cccgcgaccg ctgcgagccc cgcgaccgcg gcggcccgcc gcacactcca ccgcactgct 180
 gcggcgggcca ctggtgctcc cacggcgctc ggagccggcg tcgccaagac gctcgacaat 240
 gtgtatgacg tgatcgtggt cgggtggaggt ctctcgggcc tggtgaccgg ccaggccctg 300
 gcggctcagc aaaaaattca gaacttcctt gttacggagg ctccgcgagc cgtcggcggc 360
 aacattacgt ccatgtcggg cgatggctac gtgtgggagg agggcccgaa cagcttccag 420
 cccaacgata gcatgctgca gattgcgggtg gactctggct gcgagaagga ccttgtgttc 480
 ggtgacccca cggctccccg ctctcgtgtg tgggagggca agctgcgccc cgtgccctcg 540
 ggcttgagc ccttcacctt cgacctcatg tccatccccg gcaagatccg cgccgggctg 600
 ggcgccatcg gcctcatcaa cggagccatg cctccttcg aggagagtgt ggagcagttc 660

```

atccgccgca acctgggcga tgaggtgttc ttccgcctga tcgagccctt ctgctccggc 720
gtgtacgcgg gcgacccctc caagctgtcc atgaaggcgg ccttcaacag gatctggatt 780
ctggagaaga acggcggcag cctggtgga ggtgccatca agctgttcca ggaacgccag 840
tccaaccgcg ccccgccgcg ggacccgcgc ctgccgccca agcccaaggg ccagacggtg 900
ggctcgttcc gcaagggcct gaagatgctg cgggacgcca ttgagcgcaa catccccgac 960
aagatccgcg tgaactggaa gctggtgtct ctgggcccgc aggcggacgg gcggtacggg 1020
ctggtgtacg acacgcccga gggccgtgtc aagggtgtttg cccgcgccgt ggctctgacc 1080
gcgcccagct acgtggtggc ggacctggtc aaggagcagg cgcccgccgc cgccgaggcc 1140
ctgggctcct tcgactaccc gccggtgggc gccgtgacgc tgtcgtaccc gctgagcgcc 1200
gtgcgggagg agcgcaaggc ctcgacggg tccgtgccgg gcttcgggtca gctgcacccg 1260
cgcacgcagg gcatcaccac tctgggcacc atctacagct ccagcctgtt ccccgccgc 1320
gcgcccgagg gccacatgct gctgctcaac tacatcggcg gcaccaccaa ccgcggcatc 1380
gtcaaccaga ccaccgagca gctggtggag caggtggaca aggacctgcg caacatggtc 1440
atcaagcccc acgcgcccga gccccgtgtg gtgggcgtgc gcgtgtggcc gcgcgccatc 1500
ccgcagttca acctgggcca cctggagcag ctggacaagg cgcgcaaggc gctggacgcg 1560
gcggggctgc agggcggtgca cctggggggc aactacgtca gcggtgtggc cctgggcaag 1620
gtggtggagc acggctacga gtccgcagcc aacctggcca agagcgtgtc caaggccgca 1680
gtcaaggcct aa 1692

```

```

<210> 26
<211> 563
<212> PRT
<213> Chlamydomonas

```

```

<400> 26

```

```

Met Met Leu Thr Gln Thr Pro Gly Thr Ala Thr Ala Ser Ser Arg Arg
1          5          10          15

Ser Gln Ile Arg Ser Ala Ala His Val Ser Ala Lys Val Ala Pro Arg
20          25          30

Pro Thr Pro Phe Ser Val Ala Ser Pro Ala Thr Ala Ala Ser Pro Ala
35          40          45

Thr Ala Ala Ala Arg Arg Thr Leu His Arg Thr Ala Ala Ala Ala Thr
50          55          60

Gly Ala Pro Thr Ala Ser Gly Ala Gly Val Ala Lys Thr Leu Asp Asn
65          70          75          80

Val Tyr Asp Val Ile Val Val Gly Gly Gly Leu Ser Gly Leu Val Thr
85          90          95

Gly Gln Ala Leu Ala Ala Gln His Lys Ile Gln Asn Phe Leu Val Thr
100         105         110

```

Glu Ala Arg Glu Arg Val Gly Gly Asn Ile Thr Ser Met Ser Gly Asp
 115 120 125
 Gly Tyr Val Trp Glu Glu Gly Pro Asn Ser Phe Gln Pro Asn Asp Ser
 130 135 140
 Met Leu Gln Ile Ala Val Asp Ser Gly Cys Glu Lys Asp Leu Val Phe
 145 150 155 160
 Gly Asp Pro Thr Ala Pro Arg Phe Val Trp Trp Glu Gly Lys Leu Arg
 165 170 175
 Pro Val Pro Ser Gly Leu Asp Ala Phe Thr Phe Asp Leu Met Ser Ile
 180 185 190
 Pro Gly Lys Ile Arg Ala Gly Leu Gly Ala Ile Gly Leu Ile Asn Gly
 195 200 205
 Ala Met Pro Ser Phe Glu Glu Ser Val Glu Gln Phe Ile Arg Arg Asn
 210 215 220
 Leu Gly Asp Glu Val Phe Phe Arg Leu Ile Glu Pro Phe Cys Ser Gly
 225 230 235 240
 Val Tyr Ala Gly Asp Pro Ser Lys Leu Ser Met Lys Ala Ala Phe Asn
 245 250 255
 Arg Ile Trp Ile Leu Glu Lys Asn Gly Gly Ser Leu Val Gly Gly Ala
 260 265 270
 Ile Lys Leu Phe Gln Glu Arg Gln Ser Asn Pro Ala Pro Pro Arg Asp
 275 280 285
 Pro Arg Leu Pro Pro Lys Pro Lys Gly Gln Thr Val Gly Ser Phe Arg
 290 295 300
 Lys Gly Leu Lys Met Leu Pro Asp Ala Ile Glu Arg Asn Ile Pro Asp
 305 310 315 320
 Lys Ile Arg Val Asn Trp Lys Leu Val Ser Leu Gly Arg Glu Ala Asp
 325 330 335
 Gly Arg Tyr Gly Leu Val Tyr Asp Thr Pro Glu Gly Arg Val Lys Val
 340 345 350
 Phe Ala Arg Ala Val Ala Leu Thr Ala Pro Ser Tyr Val Val Ala Asp
 355 360 365
 Leu Val Lys Glu Gln Ala Pro Ala Ala Ala Glu Ala Leu Gly Ser Phe
 370 375 380
 Asp Tyr Pro Pro Val Gly Ala Val Thr Leu Ser Tyr Pro Leu Ser Ala
 385 390 395 400
 Val Arg Glu Glu Arg Lys Ala Ser Asp Gly Ser Val Pro Gly Phe Gly

405 410 415
 Gln Leu His Pro Arg Thr Gln Gly Ile Thr Thr Leu Gly Thr Ile Tyr
 420 425 430
 Ser Ser Ser Leu Phe Pro Gly Arg Ala Pro Glu Gly His Met Leu Leu
 435 440 445
 Leu Asn Tyr Ile Gly Gly Thr Thr Asn Arg Gly Ile Val Asn Gln Thr
 450 455 460
 Thr Glu Gln Leu Val Glu Gln Val Asp Lys Asp Leu Arg Asn Met Val
 465 470 475 480
 Ile Lys Pro Asp Ala Pro Lys Pro Arg Val Val Gly Val Arg Val Trp
 485 490 495
 Pro Arg Ala Ile Pro Gln Phe Asn Leu Gly His Leu Glu Gln Leu Asp
 500 505 510
 Lys Ala Arg Lys Ala Leu Asp Ala Ala Gly Leu Gln Gly Val His Leu
 515 520 525
 Gly Gly Asn Tyr Val Ser Gly Val Ala Leu Gly Lys Val Val Glu His
 530 535 540
 Gly Tyr Glu Ser Ala Ala Asn Leu Ala Lys Ser Val Ser Lys Ala Ala
 545 550 555 560
 Val Lys Ala

<210> 27
 <211> 1734
 <212> ADN
 <213> Polytomella sp

<400> 27
 atgtcgagtt ccgcactaag gctattatgc gggcgaacaa gtttctttaa tttatgccaa 60
 aaatatcctc cttcctttct gtcacaattg tcgaccttaa atttctcaac ccattcgctt 120
 ttcgatagca cttatgatgt cgtcgtcggt ggtgccggaa tctctgggtt gtctactgcc 180
 caagcactta gcattcaaca taagatcgat aatgttcttg ttactgaagc tgatcatcgt 240
 gtaggcggta aaattacgac gaaaaggaat aaagatttcc tgtgggagga gggcccaaat 300
 agttgcctaa tgaacgacgc tttatatcgc gctgcccag atgccggcgt ggaatccaaa 360
 attctatcgg cggatccaaa attaccacgt tggattctgt ggggtcgtcg tttgcgtgtg 420
 gccccattg gaagctacgc tttaaaatcc gaccttttat ctaccaagg cctactccgt 480
 gccatccgag gagtcacagg ttttggtgtg tcaccggctc cacctaaggg tcaggaggag 540
 agcgtggagg gctttgttcg acggacctta ggagacgaga tttttgagcg actcgttgag 600

```

cccttttgc tccgggggttta tgcgggggat cctagcaaat tgtccatgcg tgctgctttc 660
ggaaaaacttg tggaattcga agagacgggt gatggtagct tacttcgcgg cgtctttcgt 720
tacgtaatga acaaacgacg cgaaagaagg acgggcgggg cgaaagacgg ggacacggtc 780
cctttgaacg agacggccaa ggcacccaaa tcacacctctg gcccaacagt atcgtctttc 840
gaggggggaa tcgagatcct gcccaaggcc attgcgcaaa agctgggtga tcgagttcgt 900
cttggcctac gactcgtgcg catcgatccc acgcagctcg cggatggtac gacagcgtac 960
cgtctgtcgt accgtcggat ggtcatcaa ggcgatgacg actcgagtcg tacggcaggt 1020
gctgtaccgc gtacggcgga gggggatgtc gcggcggggg acgaggacgc cgtggtggag 1080
gtggtggcga agaaggtcgt gctgacgacg ccggcattcg acgccgga catcttctcg 1140
cgttcgggct tgggtggcgc ggcgaaccgc ttgaaggagg tggattaccc gccagtagcg 1200
ttggtcgctt ttcgtacga cgtcgactcg atttcgcga tacaccgctg gagtcacgtg 1260
gctcatggcc tcagcggctt tggccaactc caccctcgcc cagagggctc ccgtacatta 1320
ggaaccattt acggcagtag attatttccc aaccgttccc ccgtagctcg tacgacgctt 1380
ttaaatttcg ttggtggatc caccgaccgt gcagtggggg ccgcggatcc aatggctttg 1440
gcgatggagg tggatctgga tctgaaaaag agcgggttga tccgagaggg agctgcgaag 1500
ccagaagtcc tcggggtgaa agtatatcca aaggtattc ctcagtttga tattggtcat 1560
ttggatcgag tggaaaaggc caaatgatg ttaaagaacg aaaggggggg tgcagattgg 1620
agtggggtca aattggcggg aaattatgtg tgcggcgtcg cagtgggcag atgcatagaa 1680
tttggttcg aaattgcgga gaacttggcg caggaattgg cgagaaaaaa atag 1734

```

<210> 28
 <211> 577
 <212> PRT
 <213> Polytomella

<400> 28

Met Ser Ser Ser Ala Leu Arg Leu Leu Cys Gly Arg Thr Ser Phe Phe
 1 5 10 15

Asn Leu Cys Gln Lys Tyr Pro Pro Ser Phe Leu Ser Gln Leu Ser Thr
 20 25 30

Leu Asn Phe Ser Thr His Ser Pro Phe Asp Ser Thr Tyr Asp Val Val
 35 40 45

Val Val Gly Ala Gly Ile Ser Gly Leu Ser Thr Ala Gln Ala Leu Ser
 50 55 60

Ile Gln His Lys Ile Asp Asn Val Leu Val Thr Glu Ala Asp His Arg
 65 70 75 80

Val Gly Gly Lys Ile Thr Thr Lys Arg Asn Lys Asp Phe Leu Trp Glu
 85 90 95

Glu Gly Pro Asn Ser Cys Leu Met Asn Asp Ala Leu Tyr Arg Ala Ala
 100 105 110

Arg Asp Ala Gly Val Glu Ser Lys Ile Leu Ser Ala Asp Pro Lys Leu
 115 120 125

Pro Arg Trp Ile Leu Trp Gly Arg Arg Leu Arg Val Ala Pro Ile Gly
 130 135 140

Ser Tyr Ala Leu Lys Ser Asp Leu Leu Ser Thr Gln Gly Leu Leu Arg
 145 150 155 160

Ala Ile Arg Gly Val Thr Gly Phe Gly Val Ser Pro Ala Pro Pro Lys
 165 170 175

Gly Gln Glu Glu Ser Val Glu Gly Phe Val Arg Arg Thr Leu Gly Asp
 180 185 190

Glu Ile Phe Glu Arg Leu Val Glu Pro Phe Cys Ser Gly Val Tyr Ala
 195 200 205

Gly Asp Pro Ser Lys Leu Ser Met Arg Ala Ala Phe Gly Lys Leu Val
 210 215 220

Glu Phe Glu Glu Thr Gly Asp Gly Ser Leu Leu Arg Gly Val Phe Arg
 225 230 235 240

Tyr Val Met Asn Lys Arg Arg Glu Arg Arg Thr Gly Gly Ala Lys Asp
 245 250 255

Gly Asp Thr Val Pro Leu Asn Glu Thr Ala Lys Ala Pro Lys Ser Ser
 260 265 270

Ser Gly Pro Thr Val Ser Ser Phe Glu Gly Gly Ile Glu Ile Leu Pro
 275 280 285

Lys Ala Ile Ala Gln Lys Leu Gly Asp Arg Val Arg Leu Gly Leu Arg
 290 295 300

Leu Val Arg Ile Asp Pro Thr Gln Leu Ala Asp Gly Thr Thr Ala Tyr
 305 310 315 320

Arg Leu Ser Tyr Arg Arg Met Ser His Gln Gly Asp Asp Asp Ser Ser
 325 330 335

```

Arg Thr Ala Gly Ala Val Pro Arg Thr Ala Glu Gly Asp Val Ala Ala
      340                      345                      350
Gly Asp Glu Asp Ala Val Val Glu Val Val Ala Lys Lys Val Val Leu
      355                      360                      365

Thr Thr Pro Ala Phe Asp Ala Ala Asp Ile Leu Ser Arg Ser Gly Leu
      370                      375                      380

Val Ala Ala Ala Asn Pro Leu Lys Glu Val Asp Tyr Pro Pro Val Ala
      385                      390                      395                      400

Leu Val Val Leu Ser Tyr Asp Val Asp Ser Ile Ser Ala Ile His Arg
      405                      410                      415

Val Ser His Val Ala His Gly Leu Ser Gly Phe Gly Gln Leu His Pro
      420                      425                      430

Arg Pro Glu Gly Leu Arg Thr Leu Gly Thr Ile Tyr Gly Ser Thr Leu
      435                      440                      445

Phe Pro Asn Arg Ser Pro Val Ala Arg Thr Thr Leu Leu Asn Phe Val
      450                      455                      460

Gly Gly Ser Thr Asp Arg Ala Val Gly Ser Ala Asp Pro Met Ala Leu
      465                      470                      475                      480

Ala Met Glu Val Asp Leu Asp Leu Lys Lys Ser Gly Leu Ile Arg Glu
      485                      490                      495

Gly Ala Ala Lys Pro Glu Val Leu Gly Val Lys Val Tyr Pro Lys Ala
      500                      505                      510

Ile Pro Gln Phe Asp Ile Gly His Leu Asp Arg Val Glu Lys Ala Lys
      515                      520                      525

Met Met Leu Lys Asn Glu Arg Gly Gly Ala Asp Trp Ser Gly Val Lys
      530                      535                      540

Leu Ala Gly Asn Tyr Val Cys Gly Val Ala Val Gly Arg Cys Ile Glu
      545                      550                      555                      560

Phe Gly Phe Glu Ile Ala Glu Asn Leu Ala Gln Glu Leu Ala Arg Lys
      565                      570                      575

Lys

<210> 29
<211> 1635
<212> ADN

```

<213> Sorghum bicolor

<400> 29

```

atgctcgctc ggactgccac ggtctcctcc acttcgtccc actcccatcc ttatcgcccc      60
acctccgctc gcagtctccg cctacgtccg gtcctcgca tggcgggctc cgacgactcc      120
cgcgagctc ccgccaggct ggtcgccgct gtcggcgccg gggtcagcgg gctcgtggcg      180
gcgtacaggc tcaggaagag cggcgtgaat gtgacgggtg tcgaggcggc cgacagggcg      240
ggaggaaaga tacggaccaa ttccgagggc gggtttctct gggatgaagg agcgaacacc      300
atgacagaag gtgaattgga ggccagtaga ctgatagatg atctcgggtc acaagacaaa      360
cagcagtatc ctaactccca acacaagcgt tacattgtca aagatggagc accagcactg      420
attccttcgg atcccatttc gctgatgaaa agcagtgttc tttctacaaa atcaaagatt      480
gcgttatttt ttgaaccatt tctctacaag aaagctaaca caagaaaccc tggaaaagta      540
tctgatgagc atttgagtga gagtgttggg agcttctttg aacgccactt cggaagagaa      600
gttggtgact atcttattga tccatttgta gctggaacaa gtgcaggaga tccagagtca      660
ctatctatct gtcattgcatt cccagcactg tggaaatttg aaagaaaata tggttcagtt      720
gttggttggtg ccattctgtc taagctaaca gctaaagggtg atccagtaaa gacaagacgt      780
gattcatcag cgaagaagaag gaatagacgc gtgtcgtttt catttcatgg tggaatgcag      840
tcactaataa atgcacttca caatgaagtt ggagatgata atgtgaagct tggtagagaa      900
gtgttgatcat tggcgtgtac attagatgga gccctgcac caggcgggtg gtcaatttct      960
gatgattcga aggatgctag tggcaaggac cttgctaaaa accaaacctt tgatgctgtt     1020
ataatgacag ctccattgtc aaatgtccag aggatgaagt tcacaaaagg tggagctcct     1080
tttggtctag actttcttcc taagggtgat tatctaccac tatctctcat ggtgactgct     1140
tttaagaagg aagatgtcaa gaaacctctg gaaggatttg gcgtcttaat accctacaag     1200
gaacagcaaa aacatggtct aaaaacctt gggactctct tctcctcaat gatgttccca     1260
gatcgagctc ctgacgacca atatttatat acaacatttg ttgggggtag ccacaataga     1320
gatcttgctg gagctccaac gtctattctg aaacaacttg tgacctctga ccttaaaaaa     1380
ctcttaggcg tacaggggca accaactttt gtcaagcata tatactgggg aaatgctttt     1440
cctttgtatg gtcattgatta caattctgta ttggaagcta tagaaaagat ggagaaaaat     1500
cttcagggt tcttctacgc aggaataaac aaggatgggc ttgctgttgg gagtgttata     1560
gcttcaggaa gcaaggctgc tgaccttgca atctcgtatc ttgaatctca caccaagcat     1620
aataatttac attga                                     1635

```

<210> 30

<211> 544

<212> PRT

<213> Sorghum

<400> 30

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

Lys Thr Arg Arg Asp Ser Ser Ala Lys Arg Arg Asn Arg Arg Val Ser
 260 265 270

Phe Ser Phe His Gly Gly Met Gln Ser Leu Ile Asn Ala Leu His Asn
 275 280 285

Glu Val Gly Asp Asp Asn Val Lys Leu Gly Thr Glu Val Leu Ser Leu
 290 295 300

Ala Cys Thr Leu Asp Gly Ala Pro Ala Pro Gly Gly Trp Ser Ile Ser
 305 310 315 320
 Asp Asp Ser Lys Asp Ala Ser Gly Lys Asp Leu Ala Lys Asn Gln Thr
 325 330 335

Phe Asp Ala Val Ile Met Thr Ala Pro Leu Ser Asn Val Gln Arg Met
 340 345 350

Lys Phe Thr Lys Gly Gly Ala Pro Phe Val Leu Asp Phe Leu Pro Lys
 355 360 365

Val Asp Tyr Leu Pro Leu Ser Leu Met Val Thr Ala Phe Lys Lys Glu
 370 375 380

Asp Val Lys Lys Pro Leu Glu Gly Phe Gly Val Leu Ile Pro Tyr Lys
 385 390 395 400

Glu Gln Gln Lys His Gly Leu Lys Thr Leu Gly Thr Leu Phe Ser Ser
 405 410 415

Met Met Phe Pro Asp Arg Ala Pro Asp Asp Gln Tyr Leu Tyr Thr Thr
 420 425 430

Phe Val Gly Gly Ser His Asn Arg Asp Leu Ala Gly Ala Pro Thr Ser
 435 440 445

Ile Leu Lys Gln Leu Val Thr Ser Asp Leu Lys Lys Leu Leu Gly Val
 450 455 460

Gln Gly Gln Pro Thr Phe Val Lys His Ile Tyr Trp Gly Asn Ala Phe
 465 470 475 480

Pro Leu Tyr Gly His Asp Tyr Asn Ser Val Leu Glu Ala Ile Glu Lys
 485 490 495

Met Glu Lys Asn Leu Pro Gly Phe Phe Tyr Ala Gly Asn Asn Lys Asp
 500 505 510

Gly Leu Ala Val Gly Ser Val Ile Ala Ser Gly Ser Lys Ala Ala Asp
 515 520 525

Leu Ala Ile Ser Tyr Leu Glu Ser His Thr Lys His Asn Asn Leu His
 530 535 540

<210> 31
 <211> 1017
 <212> ADN
 <213> Chlorella sp

<400> 31
 atggcctcca cagcaacact gcacggcgcg ccctgctgct cggcgcgggc cgtggggccgc 60
 cggcatattg cagcaccgag catccagcac aatggggccgc gcctggcggc caggggtgcag 120
 cagcggaagg gggcagggga gggcgctcg gcaactgcgtg tgcaggccgt ccaggcccct 180
 cccgagaagg cggggggcgag cacagggagc gcagcagacg acagcggcgt ttacgacgtt 240
 gtggctcgtgg gcgccggcat ctccggcctc accaccgccc aggcgctgac cagcagcac 300
 agcggcgctgg cgcgggcgggt gctggtgacc gagggccgcg accgcgtggg cggcaacatc 360
 acctccgtgt ccaacaagga ggaggggctg ctgtgggagg aggggcccac ctccttccag 420
 ccaaacgact ccatacctgca ggccgcgggtg gacgccggcg tggcggacca gctggtactg 480
 ggcgacccca cggcgccgcg ttttgtgtac tgggacaaga agctgcgccc cacgccctcc 540
 ggccccgacg cgctcacgtt cgacctgatg agcatcgtgg gcaagatccg ggcggggctg 600
 ggcgcgctgg gcttcaaggc gcccatgcca gactatgagg agagcgtgga gcagtatgtg 660
 cggcgcaacc tgggggcccga ggtgtttgag cgctgatcg agcccttctg cagcggcgtg 720
 tacgccggcg accccaagaa gctgtccatg aaggcggcct ttggcaaggt gtacgacctg 780
 gagaagaagg gcggcagcat cgtgggcggc gtgatcaagc tgattcagga gcggcgcgcc 840
 aaccgcgcgc cgccgcgcag cccagcgtg ccgcccgaagc ccgcgggcca gacggtgggc 900
 tccttccgct ccggcctgcg cacgctgccg gatgccatgg cggcgcggtt gggagacgcg 960
 gtgcgcacca gctggcagct caaggagctc agcaaggaag gggaggccta caagtga 1017

<210> 32
 <211> 338
 <212> PRT
 <213> Chlorella

<400> 32

Met Ala Ser Thr Ala Thr Leu His Gly Ala Pro Cys Cys Ser Ala Arg
 1 5 10 15

Pro Val Gly Arg Arg His Ile Ala Ala Pro Ser Ile Gln His Asn Gly
 20 25 30

Pro Arg Leu Ala Ala Arg Val Gln Gln Arg Lys Gly Ala Gly Glu Arg
 35 40 45

Arg Ser Ala Leu Arg Val Gln Ala Val Gln Ala Pro Pro Glu Lys Ala
 50 55 60

Gly Ala Ser Thr Gly Ser Ala Ala Asp Asp Ser Gly Val Tyr Asp Val
 65 70 75 80

Val Val Val Gly Ala Gly Ile Ser Gly Leu Thr Thr Ala Gln Ala Leu
 85 90 95

Thr Thr Gln His Ser Gly Val Ala Arg Arg Val Leu Val Thr Glu Gly
 100 105 110

Arg Asp Arg Val Gly Gly Asn Ile Thr Ser Val Ser Asn Lys Glu Glu
 115 120 125

Gly Leu Leu Trp Glu Glu Gly Pro Asn Ser Phe Gln Pro Asn Asp Ser
 130 135 140

Ile Leu Gln Ala Ala Val Asp Ala Gly Val Ala Asp Gln Leu Val Leu
 145 150 155 160

Gly Asp Pro Thr Ala Pro Arg Phe Val Tyr Trp Asp Lys Lys Leu Arg
 165 170 175
 Pro Thr Pro Ser Gly Pro Asp Ala Leu Thr Phe Asp Leu Met Ser Ile
 180 185 190

Val Gly Lys Ile Arg Ala Gly Leu Gly Ala Leu Gly Phe Lys Ala Pro
 195 200 205

Met Pro Asp Tyr Glu Glu Ser Val Glu Gln Tyr Val Arg Arg Asn Leu
 210 215 220

Gly Ala Glu Val Phe Glu Arg Leu Ile Glu Pro Phe Cys Ser Gly Val
 225 230 235 240

Tyr Ala Gly Asp Pro Lys Lys Leu Ser Met Lys Ala Ala Phe Gly Lys
 245 250 255

Val Tyr Asp Leu Glu Lys Lys Gly Gly Ser Ile Val Gly Gly Val Ile
 260 265 270

Lys Leu Ile Gln Glu Arg Arg Ala Asn Pro Pro Pro Pro Arg Ser Pro
 275 280 285

Ala Leu Pro Pro Lys Pro Ala Gly Gln Thr Val Gly Ser Phe Arg Ser
 290 295 300

Gly Leu Arg Thr Leu Pro Asp Ala Met Ala Ala Arg Leu Gly Asp Ala

305					310					315					320					
Val	Arg	Thr	Ser	Trp	Gln	Leu	Lys	Glu	Leu	Ser	Lys	Glu	Gly	Glu	Ala					
					325					330					335					
Tyr															Lys					
<210>															33					
<211>															1611					
<212>															ADN					
<213>															Oryza sativa					
<400>															33					
atggccgcgcg															ccgccgcagc	catggccacc	gccacctccg	ccacggcagc	gccgccgctc	60
cgcattcgcg															acgccgcgag	gaggacccgc	cgacgcgggc	acgttcgctg	cgccgtcgcc	120
agcggcgcg															ccgaggcgcc	cgcggcgccc	ggggcgcggg	tgtcggcgga	ctgcgtcgtg	180
gtgggcggcg															gcatcagcgg	gctctgcacc	gcgcaggcgc	tggccacaaa	gcacggcgtc	240
ggcgacgtgc															tcgtcacgga	ggcccgcgcc	cgcccgcggc	gcaacatcac	caccgccgag	300
cgcgccggcg															agggctacct	ctgggaggag	gggcccacaa	gcttcacgcc	ttccgacccc	360
gtcctcacca															tggcgtgga	cagcgggctc	aaggacgac	tcgtgttcgg	ggaccccaac	420
gcgccgcggt															tcgtgctgtg	ggaggggaag	ctaaggcccg	tgccgtccaa	gcccggcgac	480
ctgccgttct															tcgacctcat	gagcatcccc	ggcaagctca	gggccggcct	tggcgcgctc	540
ggcgttcgag															cgccacctcc	agggcgtag	gagtcgggtg	aggacttcgt	gcggcgcaac	600
ctcggcgcg															aggtctttga	gcgcctcatt	gagcctttct	gctcaggtgt	gtatgctggt	660
gaccttcaa															agctcagtat	gaaggctgca	tttggaagg	tgtggaggct	ggaggatact	720
ggaggtagca															ttattggtgg	aaccatcaaa	acaatccagg	agagggggaa	aaaccccaaa	780
ccgccgaggg															atccccgcct	tccaacgcca	aaggggcaga	cagttgcatc	tttcaggaag	840
ggtctgacta															tgctcccgga	tgctattaca	tctaggttgg	gtagcaaagt	caaactttca	900
tggaagttag															caagcattac	aaagtcagac	aacaaggat	atgcattagt	gtatgaaaca	960
ccagaagggg															tggctcgcgt	gcaagctaaa	actgttgtca	tgaccatccc	atcatatggt	1020
gctagtgata															tcttgcggcc	actttcaagt	gatgcagcag	atgctctgtc	aatattctat	1080
tatccaccag															ttgctgctgt	aactgtttca	tatccaaaag	aagcaattag	aaaagaatgc	1140
ttaattgacg															gagagctcca	gggtttcggc	cagctgcac	cgcgtagtca	gggagttgag	1200
actttaggaa															caatatatag	ctcatcactc	tttccaaatc	gtgctccagc	tggaaggggtg	1260
ttacttctga															actacatagg	aggttctaca	aatacaggga	ttgtttccaa	gactgaaagt	1320
gagctggtag															aagcagttga	ccgtgacctc	aggaagatgc	tgataaatcc	taaagcagtg	1380
gaccctttgg															tccttggcgt	ccgggtatgg	ccacaagcca	taccacagtt	cctcattggc	1440
catcttgatc															atcttgaggc	tgcaaaatct	gccctgggca	aaggtgggta	tgatggattg	1500

```

ttcctcggag ggaactatgt tgcaggagtt gccctgggcc gatgcgttga aggtgcatat 1560
gagagtgcct cacaaatatc tgactacttg accaagtacg cctacaagtg a 1611

<210> 34
<211> 536
<212> PRT
<213> Oryza sativa

<400> 34

Met Ala Ala Ala Ala Ala Ala Met Ala Thr Ala Thr Ser Ala Thr Ala
1 5 10 15

Ala Pro Pro Leu Arg Ile Arg Asp Ala Ala Arg Arg Thr Arg Arg Arg
20 25 30

Gly His Val Arg Cys Ala Val Ala Ser Gly Ala Ala Glu Ala Pro Ala
35 40 45

Ala Pro Gly Ala Arg Val Ser Ala Asp Cys Val Val Val Gly Gly Gly
50 55 60

Ile Ser Gly Leu Cys Thr Ala Gln Ala Leu Ala Thr Lys His Gly Val
65 70 75 80

Gly Asp Val Leu Val Thr Glu Ala Arg Ala Arg Pro Gly Gly Asn Ile
85 90 95

Thr Thr Ala Glu Arg Ala Gly Glu Gly Tyr Leu Trp Glu Glu Gly Pro
100 105 110

Asn Ser Phe Gln Pro Ser Asp Pro Val Leu Thr Met Ala Val Asp Ser
115 120 125

Gly Leu Lys Asp Asp Leu Val Phe Gly Asp Pro Asn Ala Pro Arg Phe
130 135 140

Val Leu Trp Glu Gly Lys Leu Arg Pro Val Pro Ser Lys Pro Gly Asp
145 150 155 160

Leu Pro Phe Phe Asp Leu Met Ser Ile Pro Gly Lys Leu Arg Ala Gly
165 170 175

Leu Gly Ala Leu Gly Val Arg Ala Pro Pro Pro Gly Arg Glu Glu Ser
180 185 190

Val Glu Asp Phe Val Arg Arg Asn Leu Gly Ala Glu Val Phe Glu Arg
195 200 205

Leu Ile Glu Pro Phe Cys Ser Gly Val Tyr Ala Gly Asp Pro Ser Lys
210 215 220

Leu Ser Met Lys Ala Ala Phe Gly Lys Val Trp Arg Leu Glu Asp Thr
225 230 235 240

```

Gly Gly Ser Ile Ile Gly Gly Thr Ile Lys Thr Ile Gln Glu Arg Gly
 245 250 255

Lys Asn Pro Lys Pro Pro Arg Asp Pro Arg Leu Pro Thr Pro Lys Gly
 260 265 270

Gln Thr Val Ala Ser Phe Arg Lys Gly Leu Thr Met Leu Pro Asp Ala
 275 280 285

Ile Thr Ser Arg Leu Gly Ser Lys Val Lys Leu Ser Trp Lys Leu Thr
 290 295 300

Ser Ile Thr Lys Ser Asp Asn Lys Gly Tyr Ala Leu Val Tyr Glu Thr
 305 310 315 320

Pro Glu Gly Val Val Ser Val Gln Ala Lys Thr Val Val Met Thr Ile
 325 330 335

Pro Ser Tyr Val Ala Ser Asp Ile Leu Arg Pro Leu Ser Ser Asp Ala
 340 345 350

Ala Asp Ala Leu Ser Ile Phe Tyr Tyr Pro Pro Val Ala Ala Val Thr
 355 360 365

Val Ser Tyr Pro Lys Glu Ala Ile Arg Lys Glu Cys Leu Ile Asp Gly
 370 375 380

Glu Leu Gln Gly Phe Gly Gln Leu His Pro Arg Ser Gln Gly Val Glu
 385 390 395 400

Thr Leu Gly Thr Ile Tyr Ser Ser Ser Leu Phe Pro Asn Arg Ala Pro
 405 410 415

Ala Gly Arg Val Leu Leu Leu Asn Tyr Ile Gly Gly Ser Thr Asn Thr
 420 425 430

Gly Ile Val Ser Lys Thr Glu Ser Glu Leu Val Glu Ala Val Asp Arg
 435 440 445

Asp Leu Arg Lys Met Leu Ile Asn Pro Lys Ala Val Asp Pro Leu Val
 450 455 460

Leu Gly Val Arg Val Trp Pro Gln Ala Ile Pro Gln Phe Leu Ile Gly
 465 470 475 480

His Leu Asp His Leu Glu Ala Ala Lys Ser Ala Leu Gly Lys Gly Gly
 485 490 495

Tyr Asp Gly Leu Phe Leu Gly Gly Asn Tyr Val Ala Gly Val Ala Leu
 500 505 510

Gly Arg Cys Val Glu Gly Ala Tyr Glu Ser Ala Ser Gln Ile Ser Asp
 515 520 525

Tyr Leu Thr Lys Tyr Ala Tyr Lys
 530 535

<210> 35
 <211> 1518
 <212> ADN
 <213> *Amaranthus tuberculatus*

<400> 35
 atgggcaaca tttctgagcg ggatgaaccc acttctgcta aaagggttgc tgttgttggt 60
 gctggagtta gtggacttgc tgctgcatat aagctaaaat cccatggttt gaatgtgaca 120
 ttgtttgaag ctgattctag agctggaggc aaacttaaaa ctgttaaaaa agatggtttt 180
 atttgggatg agggggcaaa tactatgaca gaaagtgagg cagaagtctc gagtttgatc 240
 gatgatcttg ggcttcgtga gaagcaacag ttgccaat ttt cacaaaataa aagatacata 300
 gctagagatg gtcttctgt gctactacct tcaaaccctg ctgcactgct cagcagcaat 360
 atcctttcag caaaatcaaa gctgcaaatt atgttggaac catTTTTctg gagaaaacac 420
 aatgctactg agctttctga tgagcatgtt caggaaagcg ttggtgaatt ttttgagcga 480
 catTTTTgga aagagtttgt tgattatgtt attgaccctt ttgttgcggtg tacatgtggt 540
 ggagatcctc aatcgctttc tatgcaccat acatttccag aagtatggaa tattgaaaaa 600
 aggtttggct ctgtgtttgc tggactaatt caatcaacat tgttatctaa gaaggaaaag 660
 ggtggaggag gaaatgcttc tatcaagaag cctcgtgtac gtggttcatt ttcattccat 720
 ggtggaatgc agacacttgt tgacacaata tgcaaacagc ttggtgaaga tgaactcaaa 780
 ctccagtgtg aggtgctgtc cttgtcatatc aaccagaagg ggatcccttc attagggaaat 840
 tggtcagtct cttctatgtc aaataatacc agtgaagatc aatcttatga tgctgtggtt 900
 gtcactgctc caattcgcaa tgtcaaagaa atgaagatta tgaaattcgg aaatccattt 960
 tcacttgact ttattccaga ggtgagttac gtacccctct ctgttatgat tactgcattc 1020
 aagaaggata aagtgaagag accactcgag ggctttggag ttcttatccc ctctaaagag 1080
 caacataatg gactgaagac tcttggtact ttattttcct ccatgatgtt tcccgatcgt 1140
 gctccatctg acatgtgtct ctttactaca tttgtcggag gaagcagaaa tagaaaactt 1200
 gcaaacgctt caacggatga attgaagcaa atagtttctt ctgaccttca gcagctgttg 1260
 ggcactgagg acgaaccttc atttgtcaat catctctttt ggagcaacgc attcccgttg 1320
 tatggacaca attacgattc tgttttgaga gccatagaca agatggaaaa ggatcttctc 1380
 ggattttttt atgcaggtaa ccataagggt ggactttcag tgggaaaagc gatggcctcc 1440
 ggatgcaagg ctgcggaact tgtaatatcc tatctggact ctcatatata tgtgaagatg 1500
 gatgagaaga ccgcgtaa 1518

<210> 36
 <211> 505
 <212> PRT
 <213> Amaranthus

<400> 36

Met Gly Asn Ile Ser Glu Arg Asp Glu Pro Thr Ser Ala Lys Arg Val
 1 5 10 15

Ala Val Val Gly Ala Gly Val Ser Gly Leu Ala Ala Ala Tyr Lys Leu
 20 25 30

Lys Ser His Gly Leu Asn Val Thr Leu Phe Glu Ala Asp Ser Arg Ala
 35 40 45

Gly Gly Lys Leu Lys Thr Val Lys Lys Asp Gly Phe Ile Trp Asp Glu
 50 55 60

Gly Ala Asn Thr Met Thr Glu Ser Glu Ala Glu Val Ser Ser Leu Ile
 65 70 75 80

Asp Asp Leu Gly Leu Arg Glu Lys Gln Gln Leu Pro Ile Ser Gln Asn
 85 90 95

Lys Arg Tyr Ile Ala Arg Asp Gly Leu Pro Val Leu Leu Pro Ser Asn
 100 105 110

Pro Ala Ala Leu Leu Thr Ser Asn Ile Leu Ser Ala Lys Ser Lys Leu
 115 120 125

Gln Ile Met Leu Glu Pro Phe Phe Trp Arg Lys His Asn Ala Thr Glu
 130 135 140

Leu Ser Asp Glu His Val Gln Glu Ser Val Gly Glu Phe Phe Glu Arg
 145 150 155 160

His Phe Gly Lys Glu Phe Val Asp Tyr Val Ile Asp Pro Phe Val Ala
 165 170 175

Gly Thr Cys Gly Gly Asp Pro Gln Ser Leu Ser Met His His Thr Phe
 180 185 190

Pro Glu Val Trp Asn Ile Glu Lys Arg Phe Gly Ser Val Phe Ala Gly
 195 200 205

Leu Ile Gln Ser Thr Leu Leu Ser Lys Lys Glu Lys Gly Gly Gly Gly
 210 215 220

Asn Ala Ser Ile Lys Lys Pro Arg Val Arg Gly Ser Phe Ser Phe His
 225 230 235 240

Gly Gly Met Gln Thr Leu Val Asp Thr Ile Cys Lys Gln Leu Gly Glu
 245 250 255

Asp Glu Leu Lys Leu Gln Cys Glu Val Leu Ser Leu Ser Tyr Asn Gln
 260 265 270

Lys Gly Ile Pro Ser Leu Gly Asn Trp Ser Val Ser Ser Met Ser Asn
 275 280 285

Asn Thr Ser Glu Asp Gln Ser Tyr Asp Ala Val Val Val Thr Ala Pro
 290 295 300

Ile Arg Asn Val Lys Glu Met Lys Ile Met Lys Phe Gly Asn Pro Phe
 305 310 315 320

Ser Leu Asp Phe Ile Pro Glu Val Ser Tyr Val Pro Leu Ser Val Met
 325 330 335

Ile Thr Ala Phe Lys Lys Asp Lys Val Lys Arg Pro Leu Glu Gly Phe
 340 345 350

Gly Val Leu Ile Pro Ser Lys Glu Gln His Asn Gly Leu Lys Thr Leu
 355 360 365

Gly Thr Leu Phe Ser Ser Met Met Phe Pro Asp Arg Ala Pro Ser Asp
 370 375 380

Met Cys Leu Phe Thr Thr Phe Val Gly Gly Ser Arg Asn Arg Lys Leu
 385 390 395 400

Ala Asn Ala Ser Thr Asp Glu Leu Lys Gln Ile Val Ser Ser Asp Leu
 405 410 415

Gln Gln Leu Leu Gly Thr Glu Asp Glu Pro Ser Phe Val Asn His Leu
 420 425 430

Phe Trp Ser Asn Ala Phe Pro Leu Tyr Gly His Asn Tyr Asp Ser Val
 435 440 445

Leu Arg Ala Ile Asp Lys Met Glu Lys Asp Leu Pro Gly Phe Phe Tyr
 450 455 460

Ala Gly Asn His Lys Gly Gly Leu Ser Val Gly Lys Ala Met Ala Ser
 465 470 475 480

Gly Cys Lys Ala Ala Glu Leu Val Ile Ser Tyr Leu Asp Ser His Ile
 485 490 495

Tyr Val Lys Met Asp Glu Lys Thr Ala
 500 505

<210> 37
 <211> 1521
 <212> ADN
 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 37
 atggagttat ctcttctccg tccgacgact caatcgcttc ttccgtcgtt ttcgaagccc 60
 aatctccgat taaatgttta taagcctctt agactccgtt gttcagtggc cggtaggacca 120
 accgtcggat cttcaaaaat cgaaggcgga ggaggcacca ccatcacgac ggattgtgtg 180
 attgtcggcg gaggtattag tggctcttgc atcgctcagg cgcttgctac taagcatcct 240
 gatgctgctc cgaatttaat tgtgaccgag gctaaggatc gtgttggagg caacattatc 300
 actcgtgaag agaatggttt tctctgggaa gaagggtcca atagttttca accgtctgat 360
 cctatgctca ctatggtggg agatagtggg ttgaaggatg atttgggtgtt gggagatcct 420
 actgcgccaa ggtttgtgtt gtggaatggg aaattgaggc cggttccatc gaagctaaca 480
 gacttaccgt tctttgattt gatgagtatt ggtgggaaga ttagagctgg ttttgggtgca 540
 cttggcattc gaccgtcacc tccaggtcgt gaagaatctg tggaggagt tgtacggcgt 600
 aacctcgggtg atgaggtttt tgagcgcctg attgaaccgt tttgttcagg tgtttatgct 660
 ggtgatcctt caaaactgag catgaaagca gcgtttggga aggtttggaa actagagcaa 720
 aatggtggaa gcataatagg tgggtactttt aaggcaattc aggagaggaa aaacgctccc 780
 aaggcagaac gagaccgcg cctgccaaaa ccacagggcc aaacagttgg ttctttcagg 840
 aagggacttc gaatgttgcc agaagcaata tctgcaagat taggtagcaa agttaagttg 900
 tcttggaagc tctcaggtat cactaagctg gagagcggag gatacaactt aacatatgag 960
 actccagatg gtttagtttc cgtgcagagc aaaagtgttg taatgacggg gccatctcat 1020
 gttgcaagtg gtctcttgcg ccctctttct gaatctgctg caaatgcact ctcaaaaacta 1080
 tattaccac cagttgcagc agtatctatc tcgtaccgca aagaagcaat ccgaacagaa 1140
 tgtttgatag atggtgaact aaagggtttt gggcaattgc atccacgcac gcaaggagtt 1200
 gaaacattag gaactatcta cagctcctca ctctttccaa atcgcgcacc gcccggaaga 1260
 attttctgtg tgaactacat tggcgggtct acaaacaccg gaattctgtc caagtctgaa 1320
 ggtgagttag tggaagcatt tctagttggg cactttgata tccttgacac ggctaaatca 1380
 tctctaacgt cttcgggcta cgaagggcta tttttgggtg gcaattacgt cgctggtgta 1440
 gccttaggcc ggtgtgtaga aggcgcatat gaaaccgcga ttgaggtcaa caacttcatg 1500
 tcacgggtacg cttacaagta a 1521

<210> 38
 <211> 506
 <212> PRT
 <213> Arabidopsis

<400> 38

Met Glu Leu Ser Leu Leu Arg Pro Thr Thr Gln Ser Leu Leu Pro Ser
 1 5 10 15

Phe Ser Lys Pro Asn Leu Arg Leu Asn Val Tyr Lys Pro Leu Arg Leu
 20 25 30

Arg Cys Ser Val Ala Gly Gly Pro Thr Val Gly Ser Ser Lys Ile Glu
 35 40 45

Gly Gly Gly Gly Thr Thr Ile Thr Thr Asp Cys Val Ile Val Gly Gly
 50 55 60

Gly Ile Ser Gly Leu Cys Ile Ala Gln Ala Leu Ala Thr Lys His Pro
 65 70 75 80

Asp Ala Ala Pro Asn Leu Ile Val Thr Glu Ala Lys Asp Arg Val Gly
 85 90 95

Gly Asn Ile Ile Thr Arg Glu Glu Asn Gly Phe Leu Trp Glu Glu Gly
 100 105 110

Pro Asn Ser Phe Gln Pro Ser Asp Pro Met Leu Thr Met Val Val Asp
 115 120 125

Ser Gly Leu Lys Asp Asp Leu Val Leu Gly Asp Pro Thr Ala Pro Arg
 130 135 140

Phe Val Leu Trp Asn Gly Lys Leu Arg Pro Val Pro Ser Lys Leu Thr
 145 150 155 160
 Asp Leu Pro Phe Phe Asp Leu Met Ser Ile Gly Gly Lys Ile Arg Ala
 165 170 175

Gly Phe Gly Ala Leu Gly Ile Arg Pro Ser Pro Pro Gly Arg Glu Glu
 180 185 190

Ser Val Glu Glu Phe Val Arg Arg Asn Leu Gly Asp Glu Val Phe Glu
 195 200 205

Arg Leu Ile Glu Pro Phe Cys Ser Gly Val Tyr Ala Gly Asp Pro Ser
 210 215 220

Lys Leu Ser Met Lys Ala Ala Phe Gly Lys Val Trp Lys Leu Glu Gln
 225 230 235 240

Asn Gly Gly Ser Ile Ile Gly Gly Thr Phe Lys Ala Ile Gln Glu Arg
 245 250 255

Lys Asn Ala Pro Lys Ala Glu Arg Asp Pro Arg Leu Pro Lys Pro Gln
 260 265 270

Gly Gln Thr Val Gly Ser Phe Arg Lys Gly Leu Arg Met Leu Pro Glu
 275 280 285

Ala Ile Ser Ala Arg Leu Gly Ser Lys Val Lys Leu Ser Trp Lys Leu
 290 295 300

Ser Gly Ile Thr Lys Leu Glu Ser Gly Gly Tyr Asn Leu Thr Tyr Glu
 305 310 315 320

Thr Pro Asp Gly Leu Val Ser Val Gln Ser Lys Ser Val Val Met Thr
 325 330 335

Val Pro Ser His Val Ala Ser Gly Leu Leu Arg Pro Leu Ser Glu Ser
 340 345 350

Ala Ala Asn Ala Leu Ser Lys Leu Tyr Tyr Pro Pro Val Ala Ala Val
 355 360 365

Ser Ile Ser Tyr Pro Lys Glu Ala Ile Arg Thr Glu Cys Leu Ile Asp
 370 375 380

Gly Glu Leu Lys Gly Phe Gly Gln Leu His Pro Arg Thr Gln Gly Val
 385 390 395 400

Glu Thr Leu Gly Thr Ile Tyr Ser Ser Ser Leu Phe Pro Asn Arg Ala
 405 410 415

Pro Pro Gly Arg Ile Leu Leu Leu Asn Tyr Ile Gly Gly Ser Thr Asn
 420 425 430

Thr Gly Ile Leu Ser Lys Ser Glu Gly Glu Leu Val Glu Ala Phe Leu
 435 440 445

Val Gly His Phe Asp Ile Leu Asp Thr Ala Lys Ser Ser Leu Thr Ser
 450 455 460

Ser Gly Tyr Glu Gly Leu Phe Leu Gly Gly Asn Tyr Val Ala Gly Val
 465 470 475 480

Ala Leu Gly Arg Cys Val Glu Gly Ala Tyr Glu Thr Ala Ile Glu Val
 485 490 495

Asn Asn Phe Met Ser Arg Tyr Ala Tyr Lys
 500 505

<210> 39
 <211> 1515
 <212> ADN
 <213> Nicotiana tabacum
 <400> 39

```

atggctcctt ctgccggaga agataaacac agttctgcga agagagtcgc agtcattggt      60
gcagggcgtca gtgggcttgc tgcagcatatc aagttgaaaa tccatggcctt gaatgtgaca    120
gtatttgaag  cagaagggaa agctggaggg  aagttacgta gcgtgagcca agatggcctg    180
atatgggatg  aaggggcaaa tactatgact  gaaagtgaag gtgatgttac atttttgatt    240
gattctcttg  gactccgaga aaagcaacaa tttccacttt cacaaaaaca gcgctacatt    300
gccagaaatg  gtactcctgt actgttacct tcaaatccaa ttgatctgat caaaagcaat    360
tttctttcca ctggatcaaa gcttcagatg cttctggaac caatattatg gaagaataaa    420
aagctctccc  aggtgtctga ctcacatgaa agtgtcagtg gattcttcca gcgtcatttt    480
ggaaaggagg  ttgttgacta tctaattgac ccttttggtg ctggaacgtg tgggtggtgat    540
cctgactcgc  tttcaatgca ccattcattt ccagagttgt ggaatttaga gaaaagggtt    600
ggctcagtc  tacttgagc  tattcgatct aagttatccc ctaaaaatga aaagaagcaa    660
gggccaccca aaacttcagc aaataagaag cgccagcggg gatctttttc ctttttgggc    720
ggaatgcaaa cacttactga tgcaatatgc aaagatctca gagaagatga acttagacta    780
aactctagag ttctggaatt atctttagc  tgtactgagg actctgcgat agatagctgg    840
tcaattattt ctgcctctcc acacaaaagg caatcagaag aagaatcatt tgatgctgta    900
attatgacgg cccactctg  tgatgttaag agtatgaaga ttgctaagag aggaaatcca    960
tttctactca actttattcc tgaggttgat tatgtaccgc tatctgttgt tataaccaca   1020
tttaagaggg aaaacgtaaa gtatcccctt gaggggtttg gggttcttgt accttccaag   1080
gagcaacaac atggtctcaa gacactaggc accctcttct cttctatgat gtttccagat   1140
cgggcaccaa acaatgttta tctctatact acttttggtg gtggaagccg aaatagagaa   1200
cttgcaaaag cctcaaggac tgagctgaaa gagatagtaa cttctgacct taagcagctg   1260
ttgggtgctg agggagagcc aacatatgtg aatcatctat actggagtaa agcattttcca   1320
ttgtacgggc ataactatga ttcagtccta gatgcaattg acaaaatgga gaaaaatctt   1380
cctggattat tctatgcagg taaccacagg gggggattgt cagttggcaa agcattatct   1440
tctggatgca atgcagctga tcttggtata tcatatcttg aatccgtctc aactgactcc   1500
aaaagacatt gctga                                     1515

```

```

<210> 40
<211> 504
<212> PRT
<213> Nicotiana

```

```

<400> 40
Met Ala Pro Ser Ala Gly Glu Asp Lys His Ser Ser Ala Lys Arg Val
1          5          10          15

```

```

Ala Val Ile Gly Ala Gly Val Ser Gly Leu Ala Ala Ala Tyr Lys Leu
          20          25          30

```

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

Lys Arg Gln Ser Glu Glu Glu Ser Phe Asp Ala Val Ile Met Thr Ala
 290 295 300

Pro Leu Cys Asp Val Lys Ser Met Lys Ile Ala Lys Arg Gly Asn Pro
 305 310 315 320

Phe Leu Leu Asn Phe Ile Pro Glu Val Asp Tyr Val Pro Leu Ser Val
 325 330 335

Val Ile Thr Thr Phe Lys Arg Glu Asn Val Lys Tyr Pro Leu Glu Gly
 340 345 350

Phe Gly Val Leu Val Pro Ser Lys Glu Gln Gln His Gly Leu Lys Thr
 355 360 365

Leu Gly Thr Leu Phe Ser Ser Met Met Phe Pro Asp Arg Ala Pro Asn
 370 375 380

Asn Val Tyr Leu Tyr Thr Thr Phe Val Gly Gly Ser Arg Asn Arg Glu
 385 390 395 400

Leu Ala Lys Ala Ser Arg Thr Glu Leu Lys Glu Ile Val Thr Ser Asp
 405 410 415

Leu Lys Gln Leu Leu Gly Ala Glu Gly Glu Pro Thr Tyr Val Asn His
 420 425 430

Leu Tyr Trp Ser Lys Ala Phe Pro Leu Tyr Gly His Asn Tyr Asp Ser
 435 440 445

Val Leu Asp Ala Ile Asp Lys Met Glu Lys Asn Leu Pro Gly Leu Phe
 450 455 460

Tyr Ala Gly Asn His Arg Gly Gly Leu Ser Val Gly Lys Ala Leu Ser
 465 470 475 480

Ser Gly Cys Asn Ala Ala Asp Leu Val Ile Ser Tyr Leu Glu Ser Val
 485 490 495

Ser Thr Asp Ser Lys Arg His Cys
 500

<210> 41

<211> 1509

<212> ADN

<213> Glycine max

<400> 41

atggcttcct ctgcaacaga cgataaccca agatctgtaa aaagagtagc tgttggtggt 60

gctggggtaa gtgggcttgc tgcggcttac aaattgaaat cacatgggtct ggatgtcact 120

gtatttgaag ctgaggggaag agctggaggg aggttgagaa gtgtttctca ggatgttcta 180

atttgggatg agggagctaa tacaatgact gaaagtgaaa ttgagggttaa aggtttgatt 240

```

gatgctcttg gacttcaaga aaagcagcag tttccaatat cacagcataa gcgctatatt 300
gtgaaaaatg gggcaccact tctggtaccc acaaatcctg ctgcactact gaagagtaaa 360
ctgcttttctg cacaatcaaa gatccatctc atttttgaac catttatgtg gaaaagaagt 420
gacccctcta atgtgtgtga tgaaaattct gtggaaagtg taggcagggt ctttgaacgt 480
cattttggaa aagaggttgt ggactatctg attgacctt ttgttggggg cactagtgc 540
gcagatcctg aatctctctc tatgcgccat tctttcccag agctatggaa tttggagaaa 600
aggtttggct ccattatagc cggggcattg caatctaagt tattcgccaa aagggaaaaa 660
actggagaaa ataggactgc actaagaaaa aacaaacaca agcgtgggtt gttttctttc 720
caggggtggga tgcagacact gacagataca ttgtgcaaag agcttggcaa agacgacctt 780
aaattaaatg aaaagggttt gacattagct tatggtcatt atggaagttc ctcttcacaa 840
aactggtcta ttactagtgc ttctaaccaa agtacacaag atgttgatgc agtaatcatg 900
acggctcctc tatataatgt caaggacatc aagatcacia aaaggggaac tccctttcca 960
cttaattttc tccccgaggt aagctacgtg ccaatctcag tcatgattac taccttcaaa 1020
aaggagaatg taaagagacc tttggaggga tttggagttc ttgttccttc taaagagcaa 1080
aaaaatgggt taaaaaccct tgggtacact ttttctcta tgatgttccc agatcgtgca 1140
cctagtgatt tatactcta taccaccttc attggcggaa ctcaaacag ggaacttgct 1200
caagcttcaa ctgacgagct taggaaaatt gttacttctg acctgagaaa gttgttggga 1260
gcagaggggg aaccaacatt tgttaacat ttctattgga gtaaaggctt tcctttgtat 1320
ggacgtaact atgggtcagt tcttcaagca attgataaga tagaaaaaga tcttcccggg 1380
tttttctttg caggtaacta caaagggtga ctctcagttg gcaaagcaat agcctcaggg 1440
tgcaaagcag ctgatcttgt gatatactac ctcaactctg cttcagacaa cacagtgcct 1500
gataaatga 1509

```

```

<210> 42
<211> 502
<212> PRT
<213> Glycine

```

```

<400> 42

```

```

Met Ala Ser Ser Ala Thr Asp Asp Asn Pro Arg Ser Val Lys Arg Val
1          5          10          15

```

```

Ala Val Val Gly Ala Gly Val Ser Gly Leu Ala Ala Ala Tyr Lys Leu
          20          25          30

```

```

Lys Ser His Gly Leu Asp Val Thr Val Phe Glu Ala Glu Gly Arg Ala
          35          40          45

```

```

Gly Gly Arg Leu Arg Ser Val Ser Gln Asp Gly Leu Ile Trp Asp Glu
50          55          60

```

Gly Ala Asn Thr Met Thr Glu Ser Glu Ile Glu Val Lys Gly Leu Ile
 65 70 75 80
 Asp Ala Leu Gly Leu Gln Glu Lys Gln Gln Phe Pro Ile Ser Gln His
 85 90 95
 Lys Arg Tyr Ile Val Lys Asn Gly Ala Pro Leu Leu Val Pro Thr Asn
 100 105 110
 Pro Ala Ala Leu Leu Lys Ser Lys Leu Leu Ser Ala Gln Ser Lys Ile
 115 120 125
 His Leu Ile Phe Glu Pro Phe Met Trp Lys Arg Ser Asp Pro Ser Asn
 130 135 140
 Val Cys Asp Glu Asn Ser Val Glu Ser Val Gly Arg Phe Phe Glu Arg
 145 150 155 160
 His Phe Gly Lys Glu Val Val Asp Tyr Leu Ile Asp Pro Phe Val Gly
 165 170 175
 Gly Thr Ser Ala Ala Asp Pro Glu Ser Leu Ser Met Arg His Ser Phe
 180 185 190
 Pro Glu Leu Trp Asn Leu Glu Lys Arg Phe Gly Ser Ile Ile Ala Gly
 195 200 205
 Ala Leu Gln Ser Lys Leu Phe Ala Lys Arg Glu Lys Thr Gly Glu Asn
 210 215 220
 Arg Thr Ala Leu Arg Lys Asn Lys His Lys Arg Gly Ser Phe Ser Phe
 225 230 235 240
 Gln Gly Gly Met Gln Thr Leu Thr Asp Thr Leu Cys Lys Glu Leu Gly
 245 250 255
 Lys Asp Asp Leu Lys Leu Asn Glu Lys Val Leu Thr Leu Ala Tyr Gly
 260 265 270
 His Asp Gly Ser Ser Ser Ser Gln Asn Trp Ser Ile Thr Ser Ala Ser
 275 280 285
 Asn Gln Ser Thr Gln Asp Val Asp Ala Val Ile Met Thr Ala Pro Leu
 290 295 300
 Tyr Asn Val Lys Asp Ile Lys Ile Thr Lys Arg Gly Thr Pro Phe Pro
 305 310 315 320
 Leu Asn Phe Leu Pro Glu Val Ser Tyr Val Pro Ile Ser Val Met Ile

325	330	335
Thr Thr Phe Lys Lys Glu Asn Val Lys Arg Pro Leu Glu Gly Phe Gly		
340	345	350
Val Leu Val Pro Ser Lys Glu Gln Lys Asn Gly Leu Lys Thr Leu Gly		
355	360	365
Thr Leu Phe Ser Ser Met Met Phe Pro Asp Arg Ala Pro Ser Asp Leu		
370	375	380
Tyr Leu Tyr Thr Thr Phe Ile Gly Gly Thr Gln Asn Arg Glu Leu Ala		
385	390	395
Gln Ala Ser Thr Asp Glu Leu Arg Lys Ile Val Thr Ser Asp Leu Arg		
405	410	415
Lys Leu Leu Gly Ala Glu Gly Glu Pro Thr Phe Val Asn His Phe Tyr		
420	425	430
Trp Ser Lys Gly Phe Pro Leu Tyr Gly Arg Asn Tyr Gly Ser Val Leu		
435	440	445
Gln Ala Ile Asp Lys Ile Glu Lys Asp Leu Pro Gly Phe Phe Phe Ala		
450	455	460
Gly Asn Tyr Lys Gly Gly Leu Ser Val Gly Lys Ala Ile Ala Ser Gly		
465	470	475
Cys Lys Ala Ala Asp Leu Val Ile Ser Tyr Leu Asn Ser Ala Ser Asp		
485	490	495
Asn Thr Val Pro Asp Lys		
500		

<210> 43
 <211> 1205
 <212> ADN
 <213> Cucumis sativus

<400> 43
 agcttccaac cttccgatcc tattctcacc atggtggtgg atagtggctt aaaagatgat 60
 ttagttctgg gagaccaga tgcacctga tttgtattgt ggaatggaaa gtcagacca 120
 gtgcctgcga aacctaatga tctacctttc ttgacctga tgagcattgg tggaaaaatc 180
 agagcaggct ttggtgccct gggcattcgc cctcctcctc caggtcgaga ggaatcagtt 240
 gaagaatttg tccgtcggaa ccttggcaat gaagtttttg aacgtttgat agagccattt 300
 tgttctgggtg tatacgctgg tgaccttca aagctaagca tgaaagcagc ttttggttaag 360
 gtttggaggc tagagcaaaa tgggtggtagt attattggtg ggactttcaa agcacttcaa 420

```

gaaaggaata aaactaccaa accaccaaga gatccgcgtc taccaaagcc taagggccaa      480
actgttggat cttttcggaa aggacttacc atgttgccaa atgctatttc tacttgtttg      540
gggagtaaag taaaagtatc ttggaagcta tctagtatca gtaaagtgga tgacggaggt      600
tatagtttga catacgaaac accagaagga ctagtctcca tactaagcag aagtgtcatc      660
atgacgggttc cttcttatat tgctggcact ctgttgcgtc caatctcggg gaaagctgca      720
gatgcacttt caaaatttta ttatccacca gttgcatcag tgaccatata atatccaaaa      780
ggagcaatta ggaaagaatg cttgattgat ggtgaactaa aggggttttg tcaattgcac      840
cctcgtagcc agggggtgac tactttggga actatataca gctcatcact ttttcctaata      900
cgagcgccag atggaagggt attgctcttg aactacattg gaggggctac taatactgga      960
attctttctc agacagagag cgagctcata gaagtagttg atcgggattt aagaaaaatc    1020
ctcataaacc caaacgcaga ggatcctcta ccattgagcg tgagggtgtg gccacaagcc    1080
attccacagt tcttgattgg ccattctgat gttctagaca ccgccaaggc cggactgaga    1140
gaggctggaa tggaggggct atttttaggt ggaaactatg tatgcggtgt ggccttgggg    1200
agatg                                                                1205

```

```

<210> 44
<211> 401
<212> PRT
<213> Cucumis

```

```

<400> 44

```

```

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

```

130	135	140
Thr Thr Lys Pro Pro Arg Asp Pro Arg Leu Pro Lys Pro Lys Gly Gln		
145	150	155 160
Thr Val Gly Ser Phe Arg Lys Gly Leu Thr Met Leu Pro Asn Ala Ile		
	165	170 175
Ser Thr Cys Leu Gly Ser Lys Val Lys Val Ser Trp Lys Leu Ser Ser		
	180	185 190
Ile Ser Lys Val Asp Asp Gly Gly Tyr Ser Leu Thr Tyr Glu Thr Pro		
	195	200 205
Glu Gly Leu Val Ser Ile Leu Ser Arg Ser Val Ile Met Thr Val Pro		
	210	215 220
Ser Tyr Ile Ala Gly Thr Leu Leu Arg Pro Ile Ser Gly Lys Ala Ala		
225	230	235 240
Asp Ala Leu Ser Lys Phe Tyr Tyr Pro Pro Val Ala Ser Val Thr Ile		
	245	250 255
Ser Tyr Pro Lys Gly Ala Ile Arg Lys Glu Cys Leu Ile Asp Gly Glu		
	260	265 270
Leu Lys Gly Phe Gly Gln Leu His Pro Arg Ser Gln Gly Val Thr Thr		
	275	280 285
Leu Gly Thr Ile Tyr Ser Ser Ser Leu Phe Pro Asn Arg Ala Pro Asp		
	290	295 300
Gly Arg Val Leu Leu Leu Asn Tyr Ile Gly Gly Ala Thr Asn Thr Gly		
305	310	315 320
Ile Leu Ser Gln Thr Glu Ser Glu Leu Ile Glu Val Val Asp Arg Asp		
	325	330 335
Leu Arg Lys Ile Leu Ile Asn Pro Asn Ala Glu Asp Pro Leu Pro Leu		
	340	345 350
Ser Val Arg Val Trp Pro Gln Ala Ile Pro Gln Phe Leu Ile Gly His		
	355	360 365
Leu Asp Val Leu Asp Thr Ala Lys Ala Gly Leu Arg Glu Ala Gly Met		
	370	375 380
Glu Gly Leu Phe Leu Gly Gly Asn Tyr Val Cys Gly Val Ala Leu Gly		
385	390	395 400
Arg		
<210>	45	

<211> 1521
 <212> ADN
 <213> Oryza sativa

<400> 45
 atggccgcct ccgacgaccc ccgcggcggg aggtccgctc cgcgcgctcg cgccggcgctc 60
 agtgggctcg cggcggcgta caggctgagg aagcgcggcg tgcaggtgac ggtgttcgag 120
 gcggccgaca gggcgggtgg gaagatacgg accaactccg agggcgggtt catctgggac 180
 gaaggggcca acaccatgac agagagtga ttggaggcaa gcaggcttat tgacgatctt 240
 ggcctacaag gcaaacagca gtatcctaac tcacaacaca agcgttacat tgtcaaagat 300
 ggagcaccaa cactgattcc ctcatatccc attgcgctca tgaaaagcac tgttctttct 360
 acaaaatcaa agctcaagct atttctggaa ccatttctct atgagaaatc tagcagaagg 420
 acctcgggaa aagtgtctga tgaacattta agtgagagtg tgatttttct gtgtatatgt 480
 agagataatc aggttggtga ttatcttatt gatccatttg tggctggaac aagcggagga 540
 gatcctgagt cattatcaat tcgtcatgca tttccagcat tatggaattt ggagaataag 600
 tatggctctg tcattgctgg tgccatcttg tccaaactat ccactaaggg tgattcagtg 660
 aagacaggag gtgcttcgcc agggaaagga aggaataaac gtgtgtcatt ttcatttcat 720
 ggtggaatgc agtcactaat agatgcactt cacaatgaag ttggagatgg taacgtgaag 780
 cttggtacag aagtgttgct attggcatgt tgetgtgatg gagtctcttc ttctgggtgg 840
 tggccaattt ctgttgattc aaaagatgct aaagggaaag atctcagaaa gaaccaatct 900
 ttogatgctg ttataatgac tgctccattg tctaattgtc agaggatgaa gtttacaaaa 960
 ggtggagtct cctttgtgct agactttctt cctaaggctc attatctacc actatctctc 1020
 atggtaacag cttttaagaa ggaagatgtc aaaaaacat tggaaggatt tggcgcttg 1080
 atacctata aggaacagca aaagcatggg ctcaaaaccc ttgggaccct cttctcctcg 1140
 atgatgtttc cagatcgagc tcctaattgat caatatctat atacatcttt cattgggggg 1200
 agccataata gagacctcgc tggggctcca acggctattc tgaaacaact tgtgacctct 1260
 gacctaagaa agctcttggg tgttgaggga caacctactt ttgtgaagca tgtacattgg 1320
 agaaatgctt ttcctttata tggccagaat tatgatctgg tactggaagc tatagcaaaa 1380
 atggagaaca atcttccagg gttcttttac gcaggaaata acaaggatgg gttggctggt 1440
 ggaaatgtta tagcttcagg aagcaaggct gctgaccttg tgatctctta tcttgaatct 1500
 tgcacagatc aggacaatta g 1521

<210> 46
 <211> 506
 <212> PRT
 <213> Oryza sativa

<400> 46

Met Ala Ala Ser Asp Asp Pro Arg Gly Gly Arg Ser Val Ala Val Val
 1 5 10 15

Gly Ala Gly Val Ser Gly Leu Ala Ala Ala Tyr Arg Leu Arg Lys Arg
 20 25 30
 Gly Val Gln Val Thr Val Phe Glu Ala Ala Asp Arg Ala Gly Gly Lys
 35 40 45

 Ile Arg Thr Asn Ser Glu Gly Gly Phe Ile Trp Asp Glu Gly Ala Asn
 50 55 60

 Thr Met Thr Glu Ser Glu Leu Glu Ala Ser Arg Leu Ile Asp Asp Leu
 65 70 75 80

 Gly Leu Gln Gly Lys Gln Gln Tyr Pro Asn Ser Gln His Lys Arg Tyr
 85 90 95

 Ile Val Lys Asp Gly Ala Pro Thr Leu Ile Pro Ser Asp Pro Ile Ala
 100 105 110

 Leu Met Lys Ser Thr Val Leu Ser Thr Lys Ser Lys Leu Lys Leu Phe
 115 120 125

 Leu Glu Pro Phe Leu Tyr Glu Lys Ser Ser Arg Arg Thr Ser Gly Lys
 130 135 140

 Val Ser Asp Glu His Leu Ser Glu Ser Val Ile Phe Leu Cys Ile Cys
 145 150 155 160

 Arg Asp Asn Gln Val Val Asp Tyr Leu Ile Asp Pro Phe Val Ala Gly
 165 170 175

 Thr Ser Gly Gly Asp Pro Glu Ser Leu Ser Ile Arg His Ala Phe Pro
 180 185 190

 Ala Leu Trp Asn Leu Glu Asn Lys Tyr Gly Ser Val Ile Ala Gly Ala
 195 200 205

 Ile Leu Ser Lys Leu Ser Thr Lys Gly Asp Ser Val Lys Thr Gly Gly
 210 215 220

 Ala Ser Pro Gly Lys Gly Arg Asn Lys Arg Val Ser Phe Ser Phe His
 225 230 235 240

 Gly Gly Met Gln Ser Leu Ile Asp Ala Leu His Asn Glu Val Gly Asp
 245 250 255

 Gly Asn Val Lys Leu Gly Thr Glu Val Leu Ser Leu Ala Cys Cys Cys
 260 265 270

 Asp Gly Val Ser Ser Ser Gly Gly Trp Ser Ile Ser Val Asp Ser Lys
 275 280 285
 Asp Ala Lys Gly Lys Asp Leu Arg Lys Asn Gln Ser Phe Asp Ala Val
 290 295 300

```

Ile Met Thr Ala Pro Leu Ser Asn Val Gln Arg Met Lys Phe Thr Lys
305                      310                      315                      320

Gly Gly Val Pro Phe Val Leu Asp Phe Leu Pro Lys Val Asp Tyr Leu
                      325                      330                      335

Pro Leu Ser Leu Met Val Thr Ala Phe Lys Lys Glu Asp Val Lys Lys
                      340                      345                      350

Pro Leu Glu Gly Phe Gly Ala Leu Ile Pro Tyr Lys Glu Gln Gln Lys
                      355                      360                      365

His Gly Leu Lys Thr Leu Gly Thr Leu Phe Ser Ser Met Met Phe Pro
370                      375                      380
Asp Arg Ala Pro Asn Asp Gln Tyr Leu Tyr Thr Ser Phe Ile Gly Gly
385                      390                      395                      400

Ser His Asn Arg Asp Leu Ala Gly Ala Pro Thr Ala Ile Leu Lys Gln
                      405                      410                      415

Leu Val Thr Ser Asp Leu Arg Lys Leu Leu Gly Val Glu Gly Gln Pro
                      420                      425                      430

Thr Phe Val Lys His Val His Trp Arg Asn Ala Phe Pro Leu Tyr Gly
                      435                      440                      445

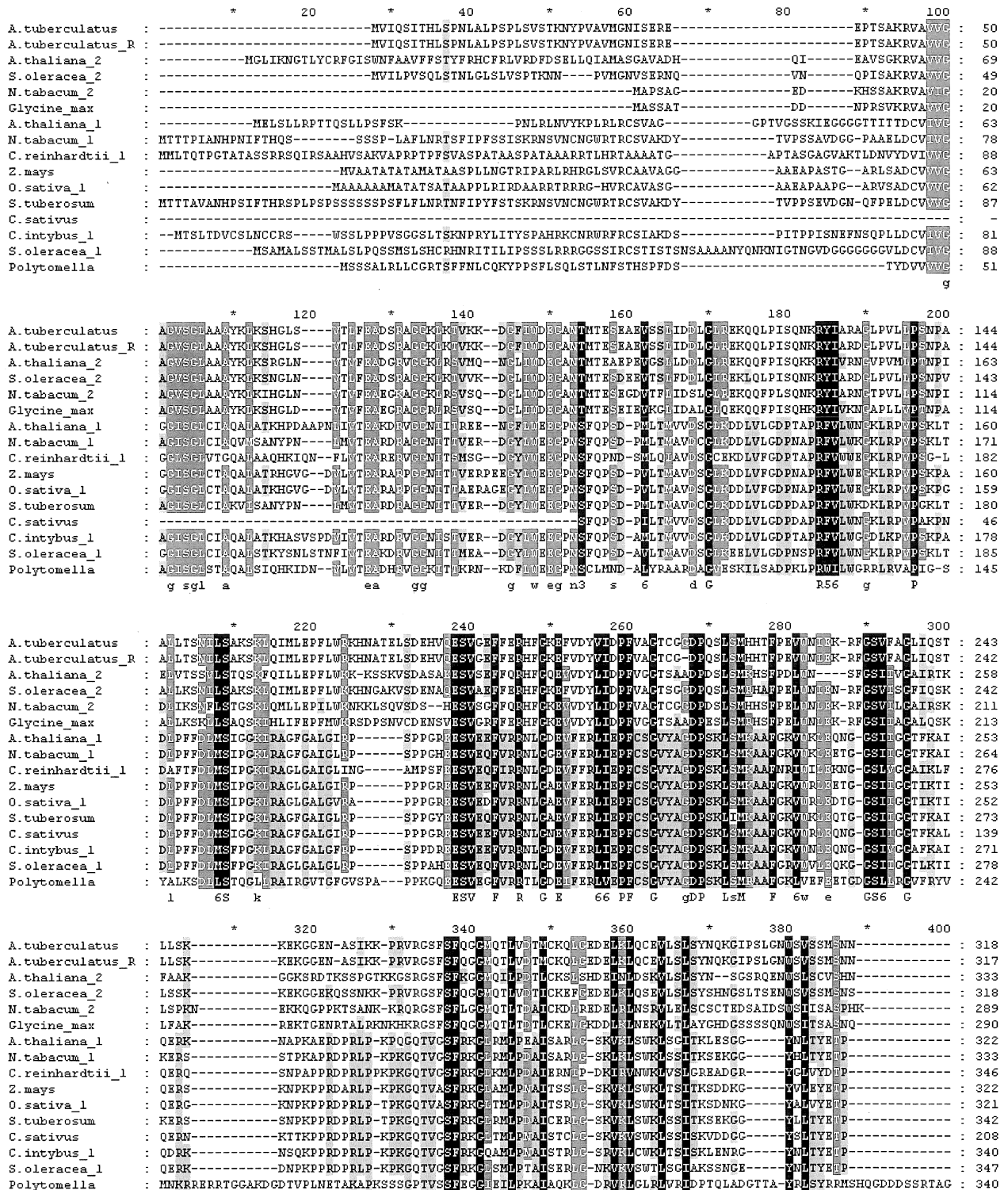
Gln Asn Tyr Asp Leu Val Leu Glu Ala Ile Ala Lys Met Glu Asn Asn
                      450                      455                      460

Leu Pro Gly Phe Phe Tyr Ala Gly Asn Asn Lys Asp Gly Leu Ala Val
465                      470                      475                      480

Gly Asn Val Ile Ala Ser Gly Ser Lys Ala Ala Asp Leu Val Ile Ser
                      485                      490                      495

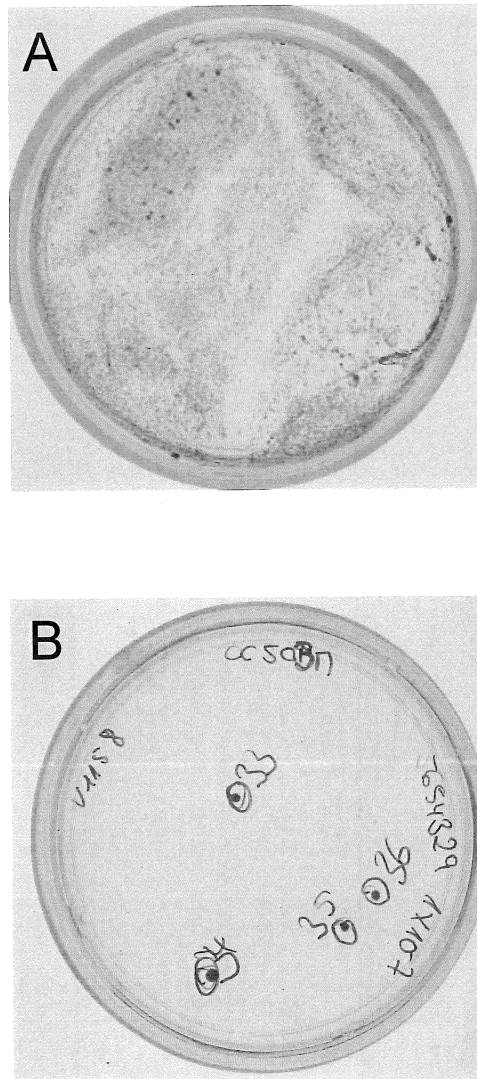
Tyr Leu Glu Ser Cys Thr Asp Gln Asp Asn
                      500                      505

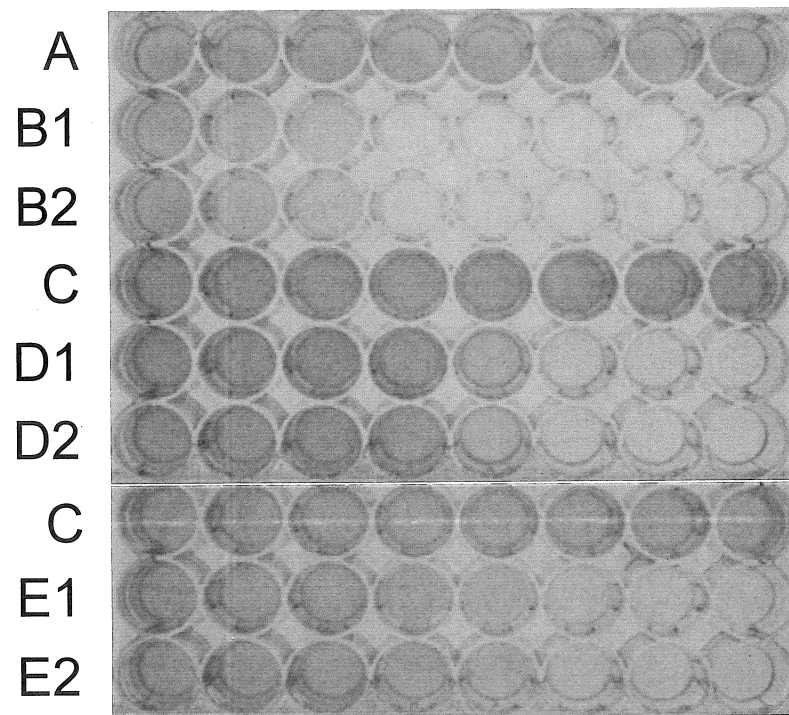
```



[illegible]

Fig. 1 tiếp theo

**Fig. 2**

**Fig. 3**