



- (12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ
(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11) CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ
(51)⁷ A01H 1/00; C12N 9/10; C12N 15/29; (13) B
C12N 15/82; A01H 5/00; C12N 15/05



1-0044553

-
- (21) 1-2013-01222 (22) 28/02/2006
(62) 1-2007-01870
(86) PCT/US2006/007343 28/02/2006 (87) WO/2006/094084 08/09/2006
(30) 60/657,968 02/03/2005 US
(45) 25/04/2025 445 (43) 25/07/2013 304A
(71) Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuaria (AR)
Rivadavia 1439, BUENOS AIRES (AR)
(72) Livore, Alberto, Blas (AR); PRINA, Alberto, raul (AR); SIGH, Bijay, K. (US);
ASCENZI, Robert (US); WITT, Sherry, R. (US).
(74) Công ty TNHH Tư vấn đầu tư và chuyển giao công nghệ (INVESTCONSULT)
-

- (54) POLYNUCLEOTIT MÃ HÓA TIỂU PHẦN LỚN CỦA AXETOHYDROXYAXIT
SYNTHAZA (AHASL1) ĐƯỢC PHÂN LẬP TỪ CÂY LÚA VÀ CATXET BIỂU
HIỆN CHỨA POLYNUCLEOTIT NÀY

(21) 1-2013-01222

(57) Sáng chế đề cập đến polynucleotit mã hoá tiểu phần lớn của axetohydroxyaxit synthaza (AHASL1) được phân lập từ cây lúa bao gồm trình tự nucleotit mã hóa protein AHASL1 chịu thuốc diệt cỏ imidazolinon, và các trình tự axit amin của protein này. Các catxet biểu hiện và các vector biến nạp chứa các polynucleotit theo sáng chế, cũng như các cây trồng, hạt giống và các tế bào chủ được biến nạp với các polynucleotit cũng được đề cập đến. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp sản xuất cây trồng có khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ imidazolinon dựa trên polynucleotit này, và phương pháp kiểm soát cỏ dại ở vùng phụ cận của các cây trồng chịu thuốc diệt cỏ, để diệt trừ thực vật không mong muốn.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến lĩnh vực công nghệ sinh học ứng dụng trong nông nghiệp, cụ thể là cây lúa chống chịu thuốc diệt cỏ và các trình tự nucleotit mới mã hóa tiểu phần lớn của protein axetohydroxyaxit synthaza chống chịu thuốc diệt cỏ.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Cỏ dại là một trong những trở ngại chính đối với việc sản xuất gạo. Việc gieo hạt trực tiếp giảm thiểu được vấn đề liên quan đến nhân công cấy lúa; tuy nhiên, kỹ thuật này lại tạo điều kiện cho sự phát triển của cỏ dại. Việc sử dụng thuốc diệt cỏ cho cây lúa đã trở nên phổ biến ở hầu hết các khu vực trồng lúa sử dụng kỹ thuật gieo hạt trực tiếp và/hoặc các nước phát triển trồng lúa cả bằng kỹ thuật cấy lúa hay kỹ thuật gieo hạt trực tiếp. Thông thường, thuốc diệt cỏ dại và cây lá rộng được phun một hoặc nhiều lần để phòng trừ cỏ dại trong vùng trồng lúa.

Cỏ dại, cây lách và lúa dại (lúa đỏ) là những nhóm thực vật chính có môi trường phát triển tối ưu giống với môi trường phát triển của cây lúa. Chúng được phân bố rộng rãi trên toàn cầu và rất khó phòng trừ cỏ dại ở các vùng trồng lúa. Mặc dù, đã có một số kỹ thuật trồng trọt có tác dụng hỗ trợ phòng trừ cỏ dại và thuận tiện cho việc bảo vệ môi trường, nhưng các kỹ thuật này cũng có nhiều hạn chế và làm tăng chi phí sản xuất. Làm đất, san đất, đắp bờ và độ ngập nước, xoay vòng sử dụng đất, hạt đạt tiêu chuẩn, hệ thống cây trồng và ngày gieo trồng phù hợp là các kỹ thuật trồng trọt giúp làm giảm thiểu số lượng hạt giống của cỏ dại và sự phát triển của cỏ dại có khả năng kháng thuốc diệt cỏ.

Mặc dù đã có nhiều khuyến nghị được đưa ra để có thực hành trồng trọt tốt hơn, nhưng người nông dân vẫn dựa vào việc sử dụng thuốc diệt cỏ như một công cụ chính để phòng trừ cỏ dại. Việc sử dụng và lạm dụng một số loại chất hóa học này dẫn đến các loại cỏ dại có khả năng kháng thuốc như cỏ lồng vực có chịu được propanil và butaclor (*Echinochloa crus galli*). Trong các trường hợp này, tốt hơn cả là sử dụng các loại thuốc diệt cỏ khác với cơ chế hoạt động khác có khả năng phòng trừ hầu hết các giống cỏ dại.

Việc tồn tại các loại thuốc diệt cỏ này cho phép sử dụng quay vòng thuốc diệt cỏ với cơ chế hoạt động khác so với các thuốc diệt cỏ thường được sử dụng trong sản xuất gạo.

Imidazolinon là nhóm thuốc diệt cỏ có cơ chế hoạt động khác so với các loại thuốc diệt cỏ thường được sử dụng trong sản xuất gạo. Các loại thuốc diệt cỏ này được biết đến là loại thuốc ức chế acetohydroxyaxit synthaza (AHAS; EC 4.1.3.18, còn được gọi là acetolactat synthaza hoặc ALS), enzym chính để sinh tổng hợp các axit amin mạch nhánh. Đặc biệt, acetohydroxyaxit synthaza (AHAS; EC 4.1.3.18, còn được gọi là acetolactat synthaza hoặc ALS), là enzym đầu tiên xúc tác cho quá trình sinh tổng hợp của valin, leuxin và isoleuxin của các axit amin mạch nhánh (Singh (1999) "Biosynthesis of valine, leucine and isoleucine," trong *Plant Amino Acid*, Singh, B.K., ed., Marcel Dekker hie. New York, New York, pp. 227-247). AHAS là vị trí hoạt động của bốn họ thuốc diệt cỏ có cấu trúc khác nhau bao gồm sulfonyleurea (LaRossa và Falco (1984) *Trends Biotechnol.* 2:158-161), imidazolinon (Shaner và các đồng tác giả (1984) *Plant Physiol.* 76:545-546), triazolopyrimidin (Subramanian và Gerwick (1989) "Inhibition of acetolactate synthase by triazolopyrimidines", trong *Biocatalysis in Agricultural Biotechnology*, Whitaker, J.R. và Sonnet, P.E.. eds., ACS Symposium Series, American Chemical Society, Washington, D. C, pp. 277-288), và pyrimidylloxybenzoat (Subramanian và các đồng tác giả. (1990) *Plant Physiol.* 94: 239-244.). Thuốc diệt cỏ imidazolinon và sulfonyleurea được sử dụng rộng rãi trong nông nghiệp hiện đại do có tác dụng dù ở lượng áp dụng rất thấp và tương đối không gây độc đối với động vật. Bằng cách ức chế hoạt tính AHAS, các họ thuốc diệt cỏ này cũng ngăn ngừa sự sinh trưởng và phát triển của các loại thực vật nhạy cảm gồm nhiều giống cỏ dại. Một vài ví dụ về các thuốc diệt cỏ imidazolinon hiện có trên thị trường là PURSUIT® (imazethapyr), SCEPTER® (imazaquin) và ARSENAL® (imazapyr). Các ví dụ về thuốc diệt cỏ sulfonyleurea là clorsulfuron, metsulfuron metyl, sulfometuron metyl, clorimuron etyl, thifensulfuron metyl, tribenuron metyl, bensulfuron metyl, nicosulfuron, ethametsulfuron metyl, rimsulfuron, triflurosulfuron metyl, triasulfuron, primisulfuron metyl, xinosulfuron, amidosulfuron, fluzasulfuron, imazosulfuron, etyl pyrazosulfuron và halosulfuron.

Do có hiệu quả cao và độc tính thấp, thuốc diệt cỏ imidazolinon được ưu tiên sử dụng bằng cách phun lên phía bên trên một khoảng rộng các cây trồng. Khả năng phun

thuốc diệt cỏ lên phía bên trên một khoảng rộng các cây trồng làm giảm các chi phí liên quan đến việc thành lập và duy trì các điền trang, và giảm nhu cầu làm đất trước khi sử dụng các loại chất hóa học này. Việc phun lên phía bên trên các giống cây có tính kháng mong muốn đồng thời cũng tạo ra khả năng tối ưu hóa sản lượng tiềm năng của các cây trồng mong muốn do đã diệt được các loại thực vật gây hại. Tuy nhiên, khả năng sử dụng kỹ thuật phun phía bên trên này phụ thuộc vào sự tồn tại của các cây trồng có khả năng chống chịu imidazolinon của loài thực vật mong muốn trong khu vực áp dụng kỹ thuật phun phía bên trên.

Trong các loại cây nông nghiệp chính, một số loại cây thuộc họ đậu như là đậu tương có khả năng tự nhiên chống chịu thuốc diệt cỏ imidazolinon do có khả năng chuyển hóa các hợp chất diệt cỏ một cách nhanh chóng (Shaner và Robinson (1985) *Weed Sci.* 33:469-471). Một số loại cây nông nghiệp khác như ngô (Newhouse và các đồng tác giả (1992) *Plant Physiol.* 100:882-886) và cây lúa (Barrett và các đồng tác giả. (1989) *Crop Safeners for Herbicides*, Academic Press, New York, pp. 195-220) xét theo một khía cạnh cụ thể, được coi là nhạy cảm với thuốc diệt cỏ imidazolinon. Mức độ nhạy cảm khác nhau đối với thuốc diệt cỏ imidazolinon phụ thuộc vào tính chất hóa học của loại thuốc diệt cỏ cụ thể và khả năng khác nhau của cây trồng trong việc chuyển hóa hợp chất từ dạng có tính độc sang không có tính độc (Shaner và các đồng tác giả. (1984) *Plant Physiol.* 76:545-546; Brown và các đồng tác giả, (1987) *Pestic. Biochem. Physiol.* 27:24-29). Sự khác nhau về đặc điểm sinh lý của các cây trồng khác nhau, ví dụ sự hấp thụ và hoán vị cũng đóng vai trò quan trọng đến sự nhạy cảm của cây (Shaner và Robinson (1985) *Weed Sci.* 33:469-471).

Các cây trồng chịu được imidazolinon, sulfonyleurea và triazolopyrimidin đã được sản xuất thành công bằng cách gây đột biến hạt, vi bào tử, hạt phấn và mô sẹo ở các giống loài như ngô *Zea mays*, cải xoong *Arabidopsis thaliana*, *Brassica napus* (cây cải), *Glycine max*, thuốc lá *Nicotiana tabacum*, và lúa *Oryza sativa* (Sebastian và các đồng tác giả (1989) *Crop Sci.* 29:1403-1408; Swanson và các đồng tác giả., 1989 *Theor. Appl. Genet.* 78:525-530; Newhouse và các đồng tác giả, (1991) *Theor. Appl. Genet.* 83:65-70; Sathasivan và các đồng tác giả (1991) *Plant Physiol.* 97:1044-1050; Mourand và các đồng tác giả (1993) *J. Heredity* 84:91-96; Patent Mỹ số 5,545,822). Trong mọi trường hợp, gen

nhân trội một phần, đơn mang lại tính chống chịu thuốc diệt cỏ. Bốn dòng cây lúa mì chịu được imidazolinon cũng đã được phân lập sau khi gây đột biến gen ở hạt của *Triticum aestivum* L. cv. Fidel (Newhouse và các đồng tác giả (1992) *Plant Physiol.* 100:882-886). Các nghiên cứu này cho thấy gen trội một phần đơn tạo ra khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ. Dựa trên các nghiên cứu về alen, các tác giả sáng chế đã kết luận rằng đột biến ở bốn dòng nêu trên đều xảy ra ở cùng một locut. Một trong các gen chống chịu thuốc diệt cỏ của dòng cây lúa mì Fidel được gọi là FS-4 (Newhouse và các đồng tác giả (1992) *Plant Physiol.* 100:882-886).

Việc mô hình hóa bằng máy tính cấu trúc không gian ba chiều của tổ hợp chất ức chế - AHAS đã dự đoán được một vài axit amin trong chất ức chế gắn kết túi dự kiến này là các điểm phát sinh đột biến có khả năng tạo ra khả năng chống chịu thuốc một cách chọn lọc đối với các imidazolinon (Ott và các đồng tác giả. (1996) *J. Mol. Biol.* 263:359-368). Cây lúa mì được tạo ra với một số trong các đột biến được thiết kế theo tỉ lệ ở các vị trí gắn kết dự kiến của enzym AHAS đã có biểu hiện khả năng chống chịu thuốc xác định đối với một nhóm thuốc diệt cỏ duy nhất (Ott và các đồng tác giả (1996) *J. Mol. Biol.* 263:359-368). Khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ của cây trồng đối với các thuốc diệt cỏ imidazolinon cũng đã được đề cập đến trong các patent Mỹ số 4761373, 5331107, 5304732, 6211438, 6211439 và 6222100, trong đó mô tả khái quát việc sử dụng gen AHAS biến đổi để tạo ra khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ ở các giống cây ngô. Patent Mỹ số 5013659 đề cập đến cây trồng biểu hiện khả năng chống chịu thuốc nhờ các đột biến ở ít nhất một axit amin trong một hoặc nhiều vùng được bảo toàn. Các đột biến được mô tả trong tài liệu này mã hóa tính chống chịu chéo đối với cả imidazolinon và sulfonylurea hoặc đặc hiệu với sulfonylurea, nhưng khả năng chống chịu đặc hiệu đối với imidazolinon không được mô tả. Patent Mỹ số 5731180 và patent Mỹ số 5767361 đề cập đến gen được phân lập có một sự thay thế axit amin duy nhất ở trình tự axit amin AHAS của cây một lá mầm kiểu dại mà tạo ra khả năng chống chịu đặc hiệu với imidazolinon. Thêm vào đó, các cây lúa có khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ mà cài xen vào AHAS đã được phát triển bằng cách sinh sản đột biến ở thực vật và cũng bằng cách lựa chọn các cây trồng có khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ từ tập hợp các cây lúa được sinh ra bằng

phương pháp thụ phấn. Tham khảo các Patent Mỹ số 5545822, 5736629, 5773703, 5773704, 5952553 và 6274796.

Ở thực vật, cũng như trong tất cả các sinh vật đã được kiểm tra khác, enzym AHAS bao gồm hai tiểu phần: tiểu phần lớn (có vai trò xúc tác) và tiểu phần nhỏ (có vai trò điều hòa) (Duggleby và Pang (2000) *J. Biochem. Mol. Biol.* 33:1-36). Cấu trúc tiểu phần lớn của AHAS (còn được gọi là AHASL) có thể được mã hóa bởi một gen duy nhất như đối với trường hợp của họ *Arabidopsis* và cây lúa hoặc bởi họ gen gồm nhiều thành viên như trong trường hợp của cây ngô, cây cải, và cây bông. Những thay thế nucleotit đơn, đặc hiệu ở tiểu phần lớn khiến cho enzym này một mức độ nhạy cảm đối với một hoặc nhiều loại thuốc diệt cỏ (Chang và Duggleby (1998) *Biochem J.* 333:765-777).

Ví dụ, cây lúa mì, *Triticum aestivum* L., bao gồm ba gen đồng đẳng mã hóa tiểu phần lớn của axetohydroxyaxit synthaza. Mỗi gen này có mức biểu hiện hữu hiệu dựa trên đáp ứng chất diệt cỏ và dữ liệu hóa sinh từ các thể đột biến ở mỗi gen trong nhóm ba gen này (Ascenzi và các đồng tác giả (2003) International Society of Plant Molecular Biologists Congress, Barcelona, Spain, Ref. No. S 10- 17). Các trình tự mã hóa của cả ba gen đều có độ đồng nhất lớn ở mức độ nucleotit (WO 03/014357). Thông qua việc giải trình tự các gen AHASL từ một vài giống thuộc loài *Triticum aestivum*, cơ sở phân tử của khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ trong các dòng chịu IMI (chịu thuốc imidazolinon) tốt nhất được phát hiện là đột biến S653(At)N, biểu thị việc thay thế serin thành asparagin tại vị trí tương đương với serin ở axit amin 653 ở cây thuộc loài *Arabidopsis thaliana* (WO 03/01436; WO 03/014357). Đột biến này là do hiện tượng đa hình của nucleotit đơn (SNP - single nucleotide polymorphism) ở trình tự ADN mã hóa protein AHASL.

Nhờ có hiệu quả cao và tính độc thấp, thuốc diệt cỏ imidazolinon được ưu tiên sử dụng trong các ứng dụng nông nghiệp. Tuy nhiên, khả năng sử dụng các thuốc diệt cỏ imidazolinon trong hệ thống cây lương thực cụ thể phụ thuộc vào độ hiện hữu của giống cây trồng có khả năng chống chịu imidazolinon của cây lương thực quan tâm. Để tạo ra được các giống cây trồng chịu được imidazolinon, người tạo giống cây trồng cần phát triển các dòng có tính trạng có khả năng chống chịu imidazolinon. Do vậy, có nhu cầu đối với các dòng và giống có khả năng chống chịu imidazolinon của cây lương thực,

cũng như các phương pháp và các chế phẩm để tạo ra và các ứng dụng các giống và dòng có khả năng chống chịu imidazolinon bổ sung.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến cây lúa có khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ tăng cường so với các cây lúa kiểu dại. Đặc biệt, cây lúa theo sáng chế có khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ imidazolinon và sulfonyleurea cao hơn so với các cây lúa kiểu dại. Cây lúa chống chịu thuốc diệt cỏ theo sáng chế bao gồm ít nhất một bản sao của gen hoặc polynucleotit mã hóa tiểu phần lớn 1 của acetohydroxyacid synthase (AHASL1) bao gồm một axit amin được thể tương ứng với trình tự axit amin của protein AHASL1 ở loại cây lúa hoang dại. Theo một phương án của sáng chế này, các cây lúa có khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ bao gồm một protein AHASL1 chịu thuốc bao gồm một valin hoặc aspartat ở vị trí axit amin 179 hoặc vị trí tương đương. Cây lúa có khả năng chống chịu thuốc theo sáng chế này có thể bao gồm một, hai, ba, bốn hoặc nhiều bản sao của gen hoặc polynucleotit mã hóa protein AHASL1 theo sáng chế. Cây lúa theo sáng chế này cũng bao gồm các hạt hoặc các cây thể hệ sau bao gồm ít nhất một phiên bản của gen hoặc polynucleotit mã hóa AHASL1 chịu thuốc diệt cỏ theo sáng chế.

Sáng chế này đề cập đến cây lúa chống chịu thuốc diệt cỏ bắt nguồn từ dòng cây lúa có tên là IMINTA 16. Mẫu hạt của dòng EVIINTA 16 đã được nộp lưu tại trung tâm nộp lưu dữ liệu sáng chế tại NCIMB Ltd. và có số truy nhập NCIMB số NCIMB 41262. Trong bộ gen của cây lúa IMINTA 16 có chứa các trình tự nucleotit nêu trong các SEQ ID số: 1 và 3, hoặc mã hóa protein AHASL1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID số: 2. So sánh với trình tự axit amin của protein AHASL1 được mã hóa bởi gen AHASL1 ở cây lúa kiểu dại (Số truy nhập GenBank: AB049822), trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID số: 2 có một axit amin đơn khác với trình tự axit amin kiểu dại. Trong trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID số: 2, có một valin tại vị trí axit amin số 179. Trong trình tự axit amin của protein AHASL1 của cây lúa kiểu dại, vị trí axit amin này là alanin.

Sáng chế này cũng đề cập đến các polynucleotit được phân lập và các polypeptit được phân lập cho các protein AHASL1 của cây lúa (*Oryza sativa*). Các polynucleotit theo sáng chế bao gồm các trình tự nucleotit mã hóa các protein AHASL1 chịu thuốc diệt cỏ. Các protein AHASL1 chịu thuốc diệt cỏ theo sáng chế là các protein AHASL1 chống

chịu imidazolinon bao gồm đột biến thay thế alanin thành valin tại vị trí 179 ở các trình tự axit amin tương ứng khi so sánh với trình tự axit amin tương ứng kiểu dại. Các polynucleotit theo sáng chế bao gồm các trình tự nucleotit được nêu trong các SEQ ID số: 1 và 3, các trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID số: 2, các mảnh và các biến thể của các trình tự nucleotit nêu trên mã hóa các protein có chứa hoạt tính AHAS, đặc biệt là hoạt tính AHAS chịu thuốc diệt cỏ.

Sáng chế này đề cập đến các catxet biểu hiện để biểu hiện các polynucleotit theo sáng chế ở cây trồng, tế bào thực vật và các tế bào chủ khác không phải của người. Các catxet biểu hiện bao gồm promotor biểu hiện được ở cây trồng, tế bào thực vật và các tế bào chủ mong muốn khác được liên kết có thể điều khiển được với polynucleotit theo sáng chế mã hóa protein AHASL1 chịu thuốc diệt cỏ. Nếu cần biểu hiện định hướng đến lục lạp, catxet biểu hiện còn có thể bao gồm các trình tự hướng đích đến lục lạp liên kết có thể điều khiển được mà mã hóa các peptit chuyển chất lục lạp để định hướng protein AHASL1 được biểu hiện đối với chất lục lạp. Các catxet biểu hiện theo sáng chế có thể ứng dụng trong các phương pháp nhằm tăng cường khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ của cây trồng và tế bào chủ. Phương pháp bao gồm việc biến nạp catxet biểu hiện theo sáng chế vào cây trồng hoặc tế bào chủ, trong đó catxet biểu hiện bao gồm một promotor biểu hiện được ở cây trồng hoặc tế bào chủ mong muốn và promotor được liên kết có thể điều khiển được với polynucleotit theo sáng chế mã hóa protein AHASL1 chịu thuốc diệt cỏ theo sáng chế. Phương pháp còn bao gồm bước tạo cây biến nạp hoàn chỉnh từ các tế bào thực vật được biến nạp.

Sáng chế này đề cập đến phương pháp tăng cường hoạt tính AHAS ở cây trồng bao gồm bước biến nạp cấu trúc polynucleotit vào tế bào thực vật mà bao gồm trình tự nucleotit được liên kết có thể điều khiển được với một promotor định hướng biểu hiện ở tế bào thực vật và tạo cây biến nạp hoàn chỉnh từ các tế bào thực vật được biến nạp. Trình tự nucleotit được chọn từ các trình tự nucleotit mã hóa các protein AHASL1 chịu thuốc diệt cỏ theo sáng chế, cụ thể là các trình tự nucleotit được nêu trong SEQ ID số: 1 và 3, các trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID số: 2, các mảnh và các biến thể của chúng. Cây trồng được sản xuất theo phương pháp này có hoạt tính AHAS cao hơn so với cây trồng không được biến nạp.

Sáng chế này đề cập đến phương pháp sản xuất cây trồng chịu thuốc diệt cỏ bao gồm bước biến nạp cấu trúc polynucleotit vào tế bào thực vật mà có chứa trình tự nucleotit được liên kết có thể điều khiển được với promotor điều khiển sự biểu hiện ở tế bào thực vật và tạo ra cây biến nạp hoàn chỉnh từ tế bào thực vật được biến nạp nêu trên. Trình tự nucleotit được chọn từ các trình tự nucleotit mã hóa các protein AHASL1 chịu thuốc diệt cỏ theo sáng chế, đặc biệt là các trình tự nucleotit được nêu trong các SEQ ID số: 1 và 3, các trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID số: 2, và các mảnh và các biến thể của chúng, bao gồm, nhưng không giới hạn, các dạng trưởng thành của protein AHASL1 chịu thuốc diệt cỏ theo sáng chế. Cây trồng được sản xuất theo phương pháp này có khả năng chống chịu tăng cường đối với ít nhất một thuốc diệt cỏ, đặc biệt là các thuốc diệt cỏ imidazolinon hoặc sulfonylure so với cây trồng không được biến nạp.

Sáng chế này đề cập đến phương pháp tăng cường khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ ở cây trồng chịu thuốc diệt cỏ. Phương pháp này có thể ứng dụng được trong việc tăng cường khả năng chịu đựng của các cây trồng vốn đã có khả năng chịu đựng đối với một lớp thuốc diệt cỏ mà các thuốc diệt cỏ này có thể giết chết hoặc gây thương tổn cho các cây trồng kiểu dại. Các loại cây trồng có khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ này có thể là cây trồng có khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ đã được biến đổi gen để có khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ hoặc là cây trồng có khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ được phát triển thông qua các biện pháp không liên quan đến ADN tái tổ hợp như là, ví dụ, các cây lúa IMINTA 16 theo sáng chế này. Phương pháp bao gồm biến nạp cấu trúc polynucleotit chứa một chuỗi nucleotit được liên kết có thể điều khiển được với một promotor định hướng sự biểu hiện ở tế bào thực vật và tái sinh sản cây trồng được biến đổi từ tế bào thực vật được biến đổi. Trình tự nucleotit được chọn từ các trình tự nucleotit mã hóa các protein AHASL1 chịu thuốc diệt cỏ theo sáng chế, cụ thể là các trình tự nucleotit được nêu trong các SEQ ID số: 1 và 3, các trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID số: 2, và các mảnh và các biến thể của chúng. Sáng chế này cũng đề cập đến các vector biến nạp bao gồm một gen đánh dấu có thể lựa chọn theo sáng chế. Gen đánh dấu có thể lựa chọn bao gồm một promotor định hướng biểu hiện ở tế bào chủ được liên kết có thể điều khiển được với một polynucleotit bao gồm một trình tự nucleotit

mã hóa protein AHASL1 chịu thuốc diệt cỏ theo sáng chế. Vector biến nạp có thể bao gồm gen mong muốn để được biểu hiện trong tế bào chủ và cũng có thể, nếu muốn, bao gồm trình tự hướng đích là lục lạp được liên kết có thể điều khiển được với polynucleotit theo sáng chế.

Sáng chế này còn đề cập đến việc sử dụng các vector biến nạp theo sáng chế để lựa chọn các tế bào được biến nạp gen mong muốn. Các phương pháp này liên quan đến việc biến nạp vector biến nạp vào tế bào chủ, cho tế bào tiếp xúc trực tiếp với lượng thuốc diệt cỏ imidazolinon hoặc sulfonyluera có khả năng giết chết hoặc ức chế sự tăng trưởng của các tế bào chủ không được biến nạp và xác định tế bào chủ được biến nạp thông qua khả năng sinh trưởng của nó trong điều kiện có sự tác động của chất diệt cỏ. Trong một phương án của sáng chế, tế bào chủ ở tế bào thực vật và gen đánh dấu lựa chọn bao gồm một promotor định hướng sự biểu hiện ở tế bào thực vật.

Sáng chế này đề cập đến phương pháp phòng trừ cỏ dại ở các vùng phụ cận của các cây trồng có khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ theo sáng chế, bao gồm các cây lúa có khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ như được mô tả ở trên và các cây trồng được biến nạp các polynucleotit AHASL1 chịu thuốc diệt cỏ theo sáng chế. Hệ gen của các cây trồng được biến nạp này bao gồm ít nhất một promotor định hướng sự biểu hiện ở tế bào thực vật, trong đó promotor được liên kết có thể điều khiển được với polynucleotit AHASL1 theo sáng chế. Phương pháp này bao gồm việc phun một lượng hữu hiệu thuốc diệt cỏ lên cỏ dại và cây trồng chịu thuốc diệt cỏ, trong đó cây trồng chịu thuốc diệt cỏ là cây trồng có khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ tăng cường đối với ít nhất một loại thuốc diệt cỏ, cụ thể là thuốc diệt cỏ imidazolinon hoặc sulfonyluera so với cây trồng kiểu dại hoặc cây trồng không được biến nạp.

Cây trồng theo sáng chế này có thể là thực vật chuyển gen hoặc cây trồng không chuyển gen. Một ví dụ về cây lúa không chuyển gen có khả năng chịu đựng tăng cường đối với các thuốc diệt cỏ imidazolinon và/hoặc sulfonyluera bao gồm cây lúa có số truy nhập NCFVIB là NCIMB 41262, hoặc thể đột biến, thể tái tổ hợp, biến thể được cải biến gen của cây trồng có số truy nhập NCIMB là NCIMB 41262; hoặc bất kỳ thể hệ tiếp theo nào của cây trồng có số truy nhập NCIMB là NCIMB 41262; hoặc cây trồng là thể hệ tiếp

theo của các cây trồng này; hoặc cây trồng có đặc tính chịu thuốc diệt cỏ của cây trồng có số truy nhập NCIMB là NCIMB 41262.

Sáng chế này cũng đề cập đến cây trồng, bộ phận của cây trồng, mô thực vật, tế bào thực vật, hạt giống và các tế bào chủ không phải của người được biến nạp ít nhất một polynucleotit, catxet biểu hiện hoặc vector biến nạp theo sáng chế. Các cây trồng được biến nạp, bộ phận của cây trồng, mô thực vật, tế bào thực vật, hạt giống và các tế bào chủ không phải của người này có khả năng chống chịu tăng cường đối với ít nhất một loại thuốc diệt cỏ, ở các mức độ mà thuốc diệt cỏ có thể giết chết hoặc ức chế sinh trưởng đối với các cây trồng, mô thực vật, tế bào thực vật hoặc tế bào chủ không phải của người không được biến nạp tương ứng. Tốt hơn là, các cây trồng được biến nạp, mô thực vật, tế bào thực vật và các hạt giống theo sáng chế thuộc họ *Arabidopsis thaliana* và các cây lương thực.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 là hình so sánh trình tự nucleotit của gen AHASL1 ở cây lúa chống chịu thuốc diệt cỏ theo sáng chế (SEQ ID số: 1) với một số trình tự nucleotit AHASL ở cây đã biết. Sự chuyển C thành T (so với cây kiểu dại) ở nucleotit 542 trong SEQ ID số: 1 như được biểu hiện bằng chữ màu trắng được bôi đen. Condon mở đầu và kết thúc được in đậm. Tên của các trình tự AHASL khác trong hình vẽ được xác định như sau: "OsAHASL1.1" là trình tự nucleotit AHASL1 kiểu dại lấy từ cây lúa El Paso; "OsAHASL1.2" là trình tự nucleotit AHASL1 kiểu dại lấy từ cây lúa IRGA; "OsAHASL1.4" là trình tự nucleotit AHASL1 từ cây lúa (Số truy nhập: AB049822); "OsAHASL1.6" là trình tự nucleotit AHASL1 từ cây lúa (Số truy nhập: AB049823); "ZmAHASL1" là trình tự nucleotit AHASL1 từ cây ngô (Số truy nhập: X63554); "ZmAHASL2" là trình tự nucleotit AHASL2 từ cây ngô (Số truy nhập X63553); "OsAHASL2" là trình tự nucleotit AHASL2 từ cây ngô (Số truy nhập: AL731599); "AtAHASL" là trình tự nucleotit AHASL từ cây thuộc *Arabidopsis thaliana* (Số truy nhập: AY124092).

Fig. 2 là hình mô tả so sánh trình tự axit amin của proteitn AHASL1 ở cây lúa chống chịu thuốc diệt cỏ theo sáng chế (SEQ ID số: 2) với một số trình tự nucleotit AHASL ở cây trồng đã biết. Việc thế Ala-thành-Val (so với kiểu dại) ở vị trí 179 trong SEQ ID số: 2 được biểu hiện bằng chữ màu trắng được bôi đen. Methionin mở đầu (M)

được biểu thị bằng chữ in đậm. Các tên khác được sử dụng trong hình vẽ là các trình tự axit amin được mã hóa bởi các trình tự nucleotit như được đề cập đến trên phần mô tả của Fig. 1.

Danh mục trình tự

Các trình tự nucleotit và axit amin được liệt kê trong danh mục trình tự kèm theo đây được thể hiện bằng các ký tự viết tắt tiêu chuẩn cho các bazơ nucleotit, và mã ba chữ cho các axit amin. Các trình tự nucleotit theo quy ước tiêu chuẩn được bắt đầu bằng đầu 5' của trình tự và tiếp tục (nghĩa là đi từ phải sang trái theo mỗi hàng) đến đầu 3'. Chỉ một chuỗi của mỗi trình tự axit nucleic được thể hiện, nhưng chuỗi hoàn chỉnh được hiểu là đã bao gồm chuỗi đã được thể hiện. Các trình tự axit amin theo quy ước tiêu chuẩn bắt đầu bằng amin cuối cùng của trình tự và tiếp tục (nghĩa là đi từ trái sang phải) đến carboxyl cuối cùng.

SEQ ID số: 1 là ký hiệu trình tự nucleotit mã hóa protein AHASL1 chống chịu imidazolinon từ cây lúa với việc thể từ Ala₁₇₉-thành-Val. Vùng mã hóa của SEQ ID số: 1 tương ứng với các nucleotit từ số 7 đến 1938.

SEQ ID số: 2 là ký hiệu trình tự axit amin của protein AHASL1 chịu imidazolinon từ cây lúa với việc thể từ Ala₁₇₉-thành- Val được mã hóa bởi trình tự nucleotit được nêu trong SEQ ID số: 1.

SEQ ID số: 3 là ký hiệu trình tự nucleotit của vùng mã hóa của SEQ ID số: 1.

Các SEQ ID số từ 4-18 là ký hiệu các trình tự nucleotit của đoạn môi được sử dụng cho việc khuếch đại PCR và sắp xếp chuỗi ADN của gen AHASL1 theo sáng chế như được mô tả trong ví dụ 2 dưới đây (xem Bảng 1).

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến cây lúa có khả năng chịu đựng thuốc diệt cỏ tốt hơn so với cây lúa kiểu dại. Cây lúa chống chịu thuốc diệt cỏ theo sáng chế này đã được sản xuất như được mô tả dưới đây bằng cách gây đột biến đối với hạt giống kiểu dại (nhằm mục đích để tạo khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ), gieo hạt, để cho cây trưởng thành và sinh sản, và lựa chọn các cây thuộc thế hệ tiếp theo biểu hiện khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ imidazolinon tốt hơn so với khả năng chịu đựng của cây lúa kiểu dại. Sáng chế đề cập đến giống lúa có khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ và các cây trồng của nó được đề cập đến ở

đây với tên gọi DVIINTA 16. Các cây lúa có khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ này có thể ứng dụng trong phương pháp phòng trừ cỏ dại, đặc biệt là loại lúa đỏ và các loại cỏ dại khác nhạy cảm với thuốc diệt cỏ imidazolinon và sulfonylurea.

Vùng mã hóa gen tiểu phần lớn 1 của axetohydroxyaxit synthaza (AHASL1) từ các cây lúa chống chịu thuốc diệt cỏ EVIINTA 16 được phân lập bằng phương pháp khuếch đại phản ứng chuỗi polymeraza (PCR) và giải trình tự. Bằng cách so sánh các trình tự polynucleotit của cây lúa chống chịu thuốc diệt cỏ theo sáng chế với cADN AHASL1 của cây lúa từ cây lúa kiểu dại (Số truy nhập GenBank: AB049822), các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng vùng mã hóa của trình tự polynucleotit AHASL1 từ các cây lúa EVIINTA 16 khác với trình tự cADN AHASL1 của cây lúa kiểu dại một nucleotit duy nhất. Đối với trình tự polynucleotit AHASL1 của cây lúa IMINTA 16, có sự chuyển C-thành-T ở nucleotit 542 (SEQ ID số: 1, Fig. 1). Sự chuyển C-thành -T này ở trình tự polynucleotit AHASL1 dẫn đến việc thế Ala thành Val ở axit amin 179 ở vùng bảo toàn của trình tự axit amin dự đoán của protein AHASL1, tương ứng với trình tự axit amin của protein AHASL1 kiểu dại (Fig. 2).

Sáng chế này cũng đề cập đến các phân tử polynucleotit được phân lập bao gồm các trình tự nucleotit mã hóa protein AHASL1 chịu thuốc diệt cỏ của cây lúa IMINTA 16 và đề cập đến các protein AHASL1 này. Sáng chế này đề xuất việc phân lập và trình tự nucleotit của polynucleotit mã hóa protein AHASL1 của cây lúa chống chịu thuốc diệt cỏ được sản xuất bằng cách gây đột biến cây lúa kiểu dại nhờ hóa chất. Các protein AHASL1 chịu thuốc diệt cỏ theo sáng chế này bao gồm việc thế alanin thành valin ở vị trí 179 trong các trình tự axit amin tương ứng so với trình tự axit amin AHASL1 kiểu dại.

Sáng chế này đề cập đến các phân tử polynucleotit được phân lập mã hóa các protein AHASL1 chịu thuốc diệt cỏ từ cây lúa (*Oryza sativa* L.). Cụ thể là, sáng chế này đề cập đến các phân tử polynucleotit được phân lập bao gồm: các trình tự nucleotit được nêu trong các SEQ ID số: 1 và 3, các trình tự nucleotit mã hóa các protein AHASL1 bao gồm các trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID số: 2, và các mảnh và các biến thể của các trình tự nucleotit này mã hóa protein AHASL1 chức năng bao gồm hoạt tính AHAS chịu thuốc diệt cỏ.

Các phân tử polynucleotit AHASL1 chịu thuốc diệt cỏ được phân lập theo sáng chế bao gồm các trình tự nucleotit mã hóa các protein AHASL1 chịu thuốc diệt cỏ. Các phân tử polynucleotit này có thể được sử dụng trong các cấu trúc polynucleotit để biến nạp vào thực vật, đặc biệt là các cây mùa vụ, để tăng cường khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ của cây trồng, đặc biệt là các thuốc diệt cỏ được biết đến như các loại thuốc ức chế hoạt tính AHAS, đặc biệt hơn nữa là các thuốc diệt cỏ imidazolinon và sulfonylurea. Các cấu trúc polynucleotit như vậy có thể được sử dụng trong các catxet biểu hiện, vector biểu hiện, vector biến nạp, plasmid và tương tự. Các thực vật chuyển gen thu được bằng các phương pháp biến nạp sau đây với các cấu trúc polynucleotit này thể hiện khả năng chịu đựng tăng cường đối với các thuốc diệt cỏ ức chế AHAS như là, ví dụ, các thuốc diệt cỏ imidazolinon và sulfonylurea.

Các chế phẩm theo sáng chế này bao gồm các phân tử polynucleotit chứa các trình tự nucleotit mã hóa các protein AHASL1. Cụ thể là, sáng chế này đề cập đến các phân tử polynucleotit được phân lập chứa các trình tự nucleotit mã hóa axit amin như được thể hiện trong SEQ ID số: 2, và các mảnh và các biến thể của chúng mã hóa các polypeptit có hoạt tính AHAS. Sáng chế cũng đề cập đến các polypeptit chứa các trình tự axit amin được mã hóa bởi các phân tử polynucleotit như được mô tả ở đây, ví dụ về các trình tự này được đề cập đến trong các SEQ ID số: 1 và 3, và các mảnh và các biến thể của chúng mã hóa các polypeptit có hoạt tính AHAS, cụ thể là hoạt tính AHASL chịu thuốc diệt cỏ. Các phân tử polynucleotit theo sáng chế còn bao gồm các trình tự nucleotit mã hóa dạng trưởng thành của các protein AHASL1 có hoạt tính AHAS, cụ thể là hoạt tính AHAS chịu thuốc diệt cỏ, nhưng thiếu các peptit chuyển lục lạp là một phần của các protein AHASL1 có độ dài đầy đủ.

Sáng chế này còn đề cập đến các chế phẩm protein hoặc các axit nucleic về cơ bản là tinh khiết hoặc được phân lập. Thuật ngữ protein hoặc phân tử polynucleotit hoặc các thành phần hoạt tính sinh học được “phân lập” hoặc “tinh khiết” nghĩa là phần lớn hoặc cơ bản là không chứa các thành phần mà thường liên kết hoặc tương tác với phân tử polynucleotit hoặc protein này khi được tìm thấy ở môi trường tự nhiên của nó. Do đó, một phân tử polynucleotit được phân lập hoặc tinh khiết hoặc protein của nó về cơ bản là không bao gồm vật liệu tế bào khác, hoặc môi trường nuôi cấy khi được sản xuất bằng kỹ

thuật tái tổ hợp, hoặc gần như không bao gồm các tiền chất hóa học hoặc các chất hóa học khác khi được tổng hợp hóa học. Tốt hơn là, axit nucleic được “phân lập” không chứa các trình tự (tốt hơn là các trình tự mã hóa protein) mà trong tự nhiên nằm kề cận (flank) với phân tử axit nucleic này (cụ thể là, các trình tự ở đầu 5’ và 3’ của axit nucleic này) trong hệ gen ADN của sinh vật mà axit nucleic được bắt nguồn. Ví dụ, trong các phương án khác nhau, phân tử nucleotit được phân lập có thể bao gồm ít hơn khoảng 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0,5 kb, hoặc 0,1 kb trình tự nucleotit mà trong tự nhiên nằm kề cận phân tử polynucleotit trong hệ gen ADN của tế bào mà axit nucleic phát sinh. Protein về cơ bản là không bao gồm vật liệu tế bào bao gồm các chế phẩm protein có ít hơn khoảng 30%, 20%, 10%, 5%, hoặc 1% (so với trọng lượng khô) protein tạp nhiễm. Khi protein theo sáng chế hoặc thành phần hoạt tính sinh học của nó được sản xuất theo cách thức tái tổ hợp, tốt hơn là môi trường nuôi cấy có ít hơn khoảng 30%, 20%, 10%, 5%, hoặc 1% (tính theo trọng lượng khô) tiền chất hóa học hoặc các chất hóa học không phải là protein quan tâm.

Sáng chế này đề cập đến các polypeptit được phân lập bao gồm các protein AHASL1. Các polypeptit được phân lập này có chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID số: 2, các trình tự axit amin được mã hóa bởi các trình tự axit amin được nêu trong các SEQ ID số: 1 và 3, và các mảnh chức năng và các biến thể của các trình tự axit amin mã hóa polypeptit AHASL1 có chứa hoạt tính AHAS. Thuật ngữ “các mảnh chức năng và các biến thể” dùng để chỉ các mảnh và các biến thể của các polypeptit được minh họa có chứa hoạt tính AHAS.

Cũng được đề cập đến là các polypeptit được phân lập bao gồm các dạng trưởng thành của các protein AHASL1 theo sáng chế. Các dạng trưởng thành này của các protein AHASL1 có chứa hoạt tính AHAS, cụ thể là hoạt tính AHAS chịu thuốc diệt cỏ, nhưng thiếu peptit chuyển lục lạp là một phần của protein AHASL1 có độ dài đầy đủ.

Theo các phương án xác định, sáng chế đề cập đến các phương pháp liên quan đến việc sử dụng các cây trồng chịu thuốc diệt cỏ. Thuật ngữ cây trồng “chống chịu thuốc diệt cỏ” dùng để chỉ các cây trồng chống chịu được ít nhất một loại thuốc diệt cỏ ở mức độ mà thường sẽ giết chết hoặc ức chế sự sinh trưởng của cây trồng thông thường hoặc cây trồng kiểu dại. Theo một phương án của sáng chế, các cây trồng chống chịu thuốc diệt cỏ theo

sáng chế có chứa protein AHASL1 chống chịu thuốc diệt cỏ. Thuật ngữ “protein AHASL1 chống chịu thuốc diệt cỏ” dùng để chỉ protein AHASL1 biểu hiện hoạt tính AHAS cao hơn so với hoạt tính AHAS ở protein AHASL1 kiểu dại, khi có mặt ít nhất một thuốc diệt cỏ được biết là cản trở hoạt tính AHAS và ở một nồng độ hoặc một mức thuốc diệt cỏ được biết là sẽ ức chế hoạt tính AHAS của protein AHASL1 kiểu dại. Hơn nữa, hoạt tính AHAS của các protein AHASL1 chống chịu với thuốc diệt cỏ này có thể được đề cập đến ở đây như là hoạt tính AHAS “chống chịu với thuốc diệt cỏ”.

Trong sáng chế này, các thuật ngữ “chống chịu với thuốc diệt cỏ” và “chịu được thuốc diệt cỏ” được sử dụng hoán đổi cho nhau và đều có cùng ý nghĩa tương đương và có phạm vi tương đương nhau. Tương tự, các thuật ngữ “sự chống chịu với thuốc diệt cỏ” và “sự chịu thuốc diệt cỏ” được sử dụng hoán đổi cho nhau và đều có cùng ý nghĩa tương đương và có phạm vi tương đương nhau. Tương tự, các thuật ngữ “chịu imidazolinon” và “chống chịu imidazolinon” được sử dụng hoán đổi cho nhau và đều có cùng ý nghĩa chung và phạm vi tương đương như thuật ngữ “chống chịu với imidazolinon” và “chịu được đối với imidazolinon” một cách tương ứng.

Sáng chế bao gồm các polynucleotit AHASL1 và các protein AHASL1 chịu thuốc diệt cỏ. Thuật ngữ “polynucleotit AHASL1 chịu thuốc diệt cỏ” được sử dụng để chỉ polynucleotit mã hóa protein có hoạt tính AHAS chịu thuốc diệt cỏ. Thuật ngữ “protein AHASL1 chịu thuốc diệt cỏ” được sử dụng để chỉ protein hoặc polypeptit có hoạt tính AHAS chịu thuốc diệt cỏ.

Hơn nữa, protein AHASL1 chịu thuốc diệt cỏ hoặc chống chịu với thuốc diệt cỏ có thể được cấy ghép vào cây trồng bằng cách biến nạp trình tự nucleotit mã hóa protein AHASL1 chịu thuốc diệt cỏ hoặc chống chịu với thuốc diệt cỏ vào thực vật hoặc cây thuộc thể hệ bố mẹ của chúng. Các protein AHASL1 chịu thuốc diệt cỏ hoặc chống chịu với thuốc diệt cỏ này được mã hóa bởi các polynucleotit AHASL1 chịu thuốc diệt cỏ hoặc chống chịu với thuốc diệt cỏ. Bên cạnh đó, protein AHASL1 chịu thuốc diệt cỏ hoặc chống chịu với thuốc diệt cỏ có thể có mặt ở cây trồng như là kết quả phát sinh tự nhiên hoặc là do được gây đột biến ở gen AHASL1 nội sinh trong bộ gen của cây trồng hoặc thể hệ bố mẹ của chúng. Sáng chế này đề cập đến cây trồng, mô thực vật, tế bào thực vật và các tế bào chủ có khả năng chịu đựng hoặc chống chịu cao với ít nhất một thuốc diệt cỏ,

cụ thể là thuốc diệt cỏ imidazolinon hoặc sulfonyluera. Lượng thuốc hoặc nồng độ thuốc diệt cỏ được ưu tiên là “lượng hữu hiệu” hoặc “nồng độ hữu hiệu”. Thuật ngữ “lượng hữu hiệu” và “nồng độ hữu hiệu” được sử dụng để chỉ lượng hoặc nồng độ, một cách tương ứng, đủ để giết chết hoặc ức chế sự sinh trưởng của cây trồng, mô thực vật, tế bào thực vật hoặc tế bào chủ kiểu đại tương tự nhưng liều lượng nêu trên không giết chết hoặc ức chế mạnh đến sự sinh trưởng của cây trồng, mô thực vật, tế bào thực vật và các tế bào chủ chịu thuốc diệt cỏ theo sáng chế này. Điển hình là, liều lượng hữu hiệu thuốc diệt cỏ là lượng hữu hiệu được sử dụng theo tuyến tính trong hệ thống sản xuất nông nghiệp để diệt các loại cỏ dại mong muốn. Liều lượng này đã được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật biết đến.

Thuật ngữ “cây trồng, mô thực vật, tế bào thực vật hoặc tế bào chủ kiểu đại, tương tự”, dùng để chỉ cây trồng, mô thực vật, tế bào thực vật hoặc tế bào chủ, một cách tương ứng, thiếu đặc tính chịu thuốc diệt cỏ và/hoặc polynucleotit cụ thể theo sáng chế được trình bày trên đây. Việc sử dụng thuật ngữ “kiểu đại” do vậy không dùng để chỉ cây trồng, mô thực vật, tế bào thực vật hoặc các tế bào chủ khác thiếu ADN tái tổ hợp trong bộ gen của nó, và/hoặc không có đặc tính chịu thuốc diệt cỏ khác với đặc tính đã nêu theo sáng chế.

Như được sử dụng ở đây, trừ trường hợp định nghĩa rõ ràng khác, thuật ngữ “thực vật” được sử dụng để chỉ cây trồng ở giai đoạn phát triển bất kỳ, cũng như bất kỳ một bộ phận hoặc các bộ phận nào của cây có thể gắn kết hoặc tách rời khỏi toàn bộ cây trồng nguyên vẹn. Các bộ phận này của cây trồng bao gồm, nhưng không giới hạn, các cơ quan, mô và tế bào của cây trồng. Ví dụ về bộ phận cụ thể của cây trồng là thân cây, lá, rễ, cụm hoa, hoa, nụ hoa, quả, cuống hoa, cuống cụm hoa, nhị hoa, bao phấn, đầu nhụy, vòi nhụy, bầu nhụy, cánh hoa, đài hoa, lá noãn, đầu rễ, chóp rễ, rễ tơ, tơ lá, tơ hạt, hạt phấn, vi 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 bất kỳ bộ phận, mô và các tế bào nào đã biết của cây trồng. Hơn nữa, hạt giống được coi là thực vật.

Các cây trồng theo sáng chế này bao gồm cả thực vật không chuyển gen và thực vật chuyển gen. Thuật ngữ “thực vật không chuyển gen” dùng để chỉ cây trồng không chứa ADN tái tổ hợp trong bộ gen của nó. Thuật ngữ “thực vật chuyển gen” dùng để chỉ

cây trồng có chứa ADN tái tổ hợp trong bộ gen của nó. Thực vật chuyển gen này có thể được sản xuất bằng cách cấy ghép ADN tái tổ hợp vào bộ gen của cây trồng. Khi ADN tái tổ hợp được kết hợp vào bộ gen của thực vật chuyển gen, thế hệ tiếp theo của thực vật này có thể cũng bao gồm ADN tái tổ hợp. Cây trồng thuộc thế hệ tiếp theo bao gồm ít nhất một phần ADN tái tổ hợp của ít nhất thực vật chuyển gen thuộc thế hệ bố mẹ cũng được coi là thực vật chuyển gen. Sáng chế này đề cập đến dòng cây lúa chống chịu thuốc diệt cỏ và cây trồng của chúng được biết đến như là IMINTA 16. Việc ký gửi của ít nhất 250 hạt giống của IMINTA 16 đã được gửi cho trung tâm ký gửi sáng chế của NCIMB Ltd., Ferguson Building, Craibstone Estate Bucksburn, Aberdeen, AB21 9YA, Scotland, UK ngày 5 tháng 01 năm 2005 và được cho số truy nhập NCIMB là NCIMB 41262. Do thiếu các hạt giống của dòng IMINTA 16 tại thời điểm nộp đơn, chỉ có dưới 2500 hạt giống của dòng EV1INTA 16 được nộp lên NCEVIB Ltd. trước ngày nộp đơn. Người nộp đơn sẽ nộp bổ sung hạt giống của dòng IMINTA 16 để có đủ ít nhất 2500 hạt giống khi có đủ hạt giống. Các phần ký gửi này sẽ được duy trì theo công ước Budapest về việc công nhận quốc tế đối với vật liệu ký gửi vi sinh học nhằm mục đích thực hiện việc bảo hộ sáng chế. Phần ký gửi hạt giống MINTA 16 được thực hiện trong vòng ít nhất là 30 năm và ít nhất là 5 năm sau khi hầu hết các yêu cầu hoàn thiện mẫu gần đây được gửi cho NCIMB Ltd. Thêm vào đó, người nộp đơn đã thực hiện đủ các yêu cầu quy định tại điểm 37 C.F.R. §§ 1.801-1.809, bao gồm việc cung cấp số liệu chỉ dẫn của mẫu sinh học đã được nộp.

Sáng chế này cũng đề cập cây lúa chống chịu thuốc diệt cỏ của dòng IMINTA 16 được thực hiện bằng cách gieo giống đột biến. Các cây lúa thuộc kiểu đại được gây đột biến bằng cách cho cây tiếp xúc với phân tử gây đột biến, cụ thể là chất hóa học gây đột biến, cụ thể hơn nữa là natri azit. Tuy nhiên, sáng chế này không giới hạn đối với các cây lúa chống chịu thuốc diệt cỏ được sản xuất bằng phương pháp gây đột biến liên quan đến chất natri azit gây đột biến hóa học. Bất kỳ phương pháp gây đột biến nào đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật đều có thể được sử dụng để sản xuất ra cây lúa chống chịu thuốc diệt cỏ theo sáng chế. Các phương pháp gây đột biến có thể liên quan đến, ví dụ, việc sử dụng một hoặc nhiều kiểu đột biến sau đây: phóng xạ, như là tia X, tia Gamma (ví dụ, coban 60 hoặc xezi 137), neutron, (ví dụ, sản phẩm tách hạt nhân bằng urani 235 trong phản ứng nguyên tử), phóng xạ Beta (ví dụ, tia được phát ra từ các đồng vị phóng xạ như

là phospho 32 hoặc cacbon 14), và chiếu tia cực tím (tốt hơn là có bước sóng nằm trong khoảng từ 2500 đến 2900 nm), và các đột biến hóa học như là các đồng vị bazơ (ví dụ, 5-bromo-uraxil), các hợp chất liên quan (ví dụ, 8-etoxy cafein), các thuốc kháng sinh (ví dụ, streptonigrin), các chất alkyl hóa (ví dụ, mustat sulfua, mustat nitơ, epoxit, etylenarnin, sulfat, sulfonat, sulfon, lacton), azua, hydroxylamin, axit nitơ, etyl metansulfonat (EMS), hoặc acridin. Các cây trồng chịu thuốc diệt cỏ có thể cũng được sản xuất bằng cách sử dụng các phương pháp nuôi cấy mô để lựa chọn các tế bào thực vật có chứa đột biến chịu thuốc diệt cỏ và sau đó tái sinh sản các cây trồng chịu thuốc diệt cỏ từ đó. Xem, ví dụ, Patent Mỹ số 5,773,702 và 5,859,348, cả hai đều được dẫn chiếu nguyên văn để tham khảo. Chi tiết hơn về việc tạo giống đột biến có thể tham khảo trong "Principals of Cultivar Development" Fehr, 1993 Macmillan Publishing Company được dẫn chiếu nguyên văn để tham khảo.

Việc phân tích gen AHASL1 của các cây lúa thuộc dòng IMINTA 16 phát hiện đột biến điểm. Trong gen AHASL1 từ IMINTA 16, đột biến điểm phát sinh từ việc thế valin cho alanin được tìm thấy ở vị trí axit amin số 179 trong trình tự axit amin AHASL1 kiểu dại có số truy nhập GenBank là AB049822. Do đó, sáng chế này đề cập đến việc thế axit amin khác thay vì alanin ở vị trí axit amin số 179 của protein AHASL1 ở cây lúa có thể làm cho cây lúa tăng khả năng chịu đựng đối với thuốc diệt cỏ, cụ thể là đối với thuốc diệt cỏ imidazolinon và/hoặc sulfonylurea. Như được thể hiện trong Ví dụ 3 dưới đây, alanin 179 được tìm thấy trong vùng bảo thủ của các protein AHASL và các phân tử thế axit amin khác cho alanin 179 đã được đề cập, được biết tạo ra khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ ở cây trồng bao gồm một protein AHASL này. Theo đó, các cây lúa chống chịu thuốc diệt cỏ theo sáng chế bao gồm, nhưng không giới hạn đối với các cây lúa có ít nhất một phiên bản của polynucleotit AHASL1 mã hóa protein AHASL1 chịu thuốc diệt cỏ bao gồm aspartat hoặc valin ở vị trí axit amin 179 hoặc vị trí tương đương trong bộ gen.

Cây lúa theo sáng chế còn bao gồm các cây trồng có chứa, tương ứng với protein AHASL1 kiểu dại, aspartat hoặc valin của vị trí axit amin 179 hoặc vị trí tương đương và một hoặc nhiều thay thế axit amin bổ sung trong protein AHASL1 tương ứng với protein AHASL1 kiểu dại, trong đó cây lúa này có khả năng chịu đựng tăng cường đối với ít nhất một chất diệt cỏ so với cây lúa kiểu dại. Việc thế axit amin khác này bao gồm, nhưng

không giới hạn ở: threonin ở vị trí axit amin 96 hoặc vị trí tương đương; alanin, threonin, histidin, leuxin, arginin, isoleuxin, glutamin hoặc serin ở vị trí axit amin 171 hoặc vị trí tương đương; leuxin ở vị trí axit amin 548 hoặc vị trí tương đương; và asparagin, threonin hoặc phenylalanin ở vị trí axit amin 627 hoặc vị trí tương đương.

Sáng chế này đề cập đến các protein AHASL1 với axit amin được thế ở các vị trí axit amin cụ thể nằm trong vùng bảo thủ của các protein AHASL1 ở cây lúa như được mô tả trong sáng chế này. Trừ trường hợp được đề cập cụ thể, các vị trí axit amin cụ thể đề cập đến vị trí của axit amin này trong các trình tự axit amin AHASL1 có độ dài đầy đủ của cây lúa được nêu trong SEQ ID số: 2. Thêm vào đó, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật có thể nhận ra rằng các vị trí axit amin như vậy có thể thay đổi phụ thuộc vào việc axit amin được thêm vào hoặc được xóa bỏ khỏi, ví dụ, đầu N của trình tự axit amin. Do vậy, sáng chế này đề cập đến việc thế amin ở vị trí đối chứng hoặc vị trí tương đương (ví dụ, “vị trí axit amin 179 hoặc vị trí tương đương”). Thuật ngữ “vị trí tương đương” được dùng để chỉ vị trí mà trong cùng vùng bảo thủ với axit amin được đưa ra làm minh họa. Ví dụ về các vùng bảo thủ được liệt kê trong Bảng 2 dưới đây.

Thêm vào đó, sáng chế này cũng đề cập đến các polypeptit AHASL1 của cây lúa bao gồm một aspartat hoặc valin ở vị trí axit amin 179 hoặc vị trí tương đương và một hoặc nhiều việc thế axit amin bổ sung trong protein AHASL1, tương ứng với protein AHASL1 kiểu dại, trong đó polypeptit AHASL1 có chứa hoạt tính AHAS chống chịu với thuốc trừ sâu khi so sánh với hoạt tính AHAS của AHASL1 kiểu dại. Các việc thế axit amin này gồm, nhưng không giới hạn, việc thế các axit amin tạo ra khả năng chịu đựng của cây trồng đối với ít nhất một loại thuốc diệt cỏ, cụ thể là thuốc diệt cỏ imidazolinon và/hoặc sulfonyluera. Việc thế bổ sung của các axit amin này bao gồm nhưng không giới hạn ở: threonin tại vị trí axit amin 96 hoặc vị trí tương đương; alanin, threonin, histidin, leuxin, arginin, leuxin ở vị trí axit amin 171 hoặc vị trí tương đương; leuxin ở vị trí axit amin 548 hoặc vị trí tương đương; và asparagin, threonin hoặc phenylalanin ở vị trí axit amin 627 hoặc vị trí tương đương. Sáng chế này cũng đề cập đến các polynucleotit được phân lập mã hóa các polypeptit AHASL1 cũng như các catxet biểu hiện, vectơ biến nạp, tế bào chủ được biến nạp, cây trồng được biến nạp và phương pháp có liên quan đến các polynucleotit này.

Sáng chế này đề cập đến phương pháp tăng cường khả năng chống chịu hoặc khả năng chịu đựng của cây trồng, mô thực vật, tế bào thực vật, hoặc tế bào chủ khác của ít nhất một chất diệt cỏ tương tác với hoạt tính của enzym AHAS. Tốt hơn là, chất diệt cỏ ức chế AHAS này là thuốc diệt cỏ imidazolinon, thuốc diệt cỏ sulfonyluera, thuốc diệt cỏ triazolopyrimidin, thuốc diệt cỏ sulfonylamino -carbonyltriázolinon, hoặc hỗn hợp của chúng. Tốt hơn nữa là, thuốc diệt cỏ này là thuốc diệt cỏ imidazolinon, thuốc diệt cỏ sulfonylurea, hoặc hỗn hợp của chúng. Trong sáng chế này, các thuốc diệt cỏ imidazolinon bao gồm, nhưng không giới hạn, PURSUIT® (imazethapyr), CADRE® (imazapic), RAPTOR® (imazamox), SCEPTER® (imazaquin), ASSERT® (imazethabenz), ARSENAL® (imazapyr), dẫn xuất của thuốc diệt cỏ bất kỳ nào nêu trên và hỗn hợp của hai hoặc nhiều thuốc diệt cỏ nêu trên, ví dụ, imazapyr/imazamox (ODYSSEY®).

Cụ thể hơn nữa là, thuốc diệt cỏ imidazolinon có thể được chọn từ, nhưng không giới hạn, axit 2- (4-isopropyl-4-metyl-5-oxo-2-imidiazolin-2-yl) -nicotinic, axit [2- (4-isopropyl)-4-] [metyl-5-oxo-2-imidazolin-2-yl]-3-quinolinecarboxylic], axit [5-etyl-2- (4-isopropyl)-4-metyl-5-oxo-2-imidazolin-2-yl) -nicotinic, axit 2- (4- isopropyl-4-metyl-5-oxo-2- imidazolin-2-yl)-5- (methoxymethyl)-nicotinic, [2-axit (4-isopropyl-4-methyl-5-oxo-2-] imidazolin-2-yl)-5-methylnicotinic, và hỗn hợp của metyl [6- (4-isopropyl-4-] metyl-5-oxo-2-imidazolin-2-yl) -m-toluat và metyl [2- (4-isopropyl-4-metyl-5-] oxo-2-imidazolin-2-yl) -p-toluat. Việc sử dụng axit 5-etyl-2- (4-isopropyl-4-metyl-5-oxo- 2-imidazolin-2-yl) –nicotinic và axit [2- (4-isopropyl-4-metyl-5-oxo-2-imidazolin-2-] yl)-5- (metoxymetyl)-nicotinic được ưu tiên. Việc sử dụng axit [2- (4-isopropyl-4-] metyl-5-oxo-2-imidazolin-2-yl)-5- (metoxymetyl)-nicotinic được đặc biệt ưu tiên.

Trong sáng chế này, các thuốc diệt cỏ sulfonylurea bao gồm, nhưng không giới hạn, clorsulfuron, metyl metsulfuron, metyl sulfometuron, etyl clorimuron, metyl thifensulfuron, metyl tribenuron, metyl bensulfuron, nicosulfuron, metyl etametsulfuron, rimsulfuron, metyl triflusulfuron, triasulfuron, metyl primisulfuron, cinosulfuron, amidosulfuon, fluzasulfuron, imazosulfuron, etyl pyrazosulfuron, halosulfuron, azimsulfuron, xyclosulfuron, etoxysulfuron, flazasulfuron, metyl flupyrasulfuron, foramsulfuron, iodosulfuron, oxasulfuron, mesosulfuron, prosulfuron, sulfosulfuron,

trifloxysulfuron, tritosulfuron, một dẫn xuất của bất kỳ thuốc diệt cỏ nào nêu trên, và hỗn hợp của hai hay nhiều thuốc diệt cỏ nêu trên. Các thuốc diệt cỏ triazolopyrimidin theo sáng chế bao gồm, nhưng không giới hạn, cloransulam, diclosulam, florasulam, flumetsulam, metosulam, và penoxsulam. Các thuốc diệt cỏ pyrimidinyloxybenzoat theo sáng chế bao gồm, nhưng không giới hạn, bispyribac, pyriithiobac, pyriminobac, pyribenzoxim và pyriftalit. Các thuốc diệt cỏ sulfonylamino-carbonyltriazolinon bao gồm, nhưng không giới hạn, flucarbazon và propoxycarbazon.

Các thuốc diệt cỏ pyrimidinyloxybenzoat được công nhận là liên quan mật thiết đến các thuốc diệt cỏ pyrimidinylthiobenzoat và được công nhận rộng rãi ở tên thứ hai bởi Cộng đồng khoa học về cỏ dại của Hoa Kỳ. Theo đó, các thuốc diệt cỏ theo sáng chế này còn có các thuốc diệt cỏ pyrimidinylthiobenzoat, bao gồm, nhưng không giới hạn, các thuốc diệt cỏ pyrimidinyloxybenzoat như được mô tả trên đây.

Sáng chế này đề cập đến các phương pháp tăng cường hoạt tính AHAS ở cây trồng bao gồm việc biến nạp vào cây trồng với cấu trúc polynucleotit chứa một promotor liên kết có thể điều khiển được với một trình tự nucleotit AHASL1 theo sáng chế. Các phương pháp gồm việc cấy ghép cấu trúc polynucleotit theo sáng chế vào ít nhất một tế bào thực vật và tái sinh sản cây trồng được biến nạp từ tế bào được cấy ghép đó. Các phương pháp gồm việc sử dụng một promotor có khả năng điều khiển biểu hiện gen ở tế bào thực vật. Tốt hơn là, promotor này là promotor cấu tạo hoặc promotor ái mô. Các phương pháp này được ứng dụng để tăng cường hoặc phát triển khả năng chịu đựng của cây trồng đối với ít nhất một loại thuốc diệt cỏ tương tác với hoạt tính xúc tác của enzym AHAS, cụ thể là thuốc diệt cỏ imidazolinon hoặc sulfonylurea.

Sáng chế này đề cập đến các catxet biểu hiện để biểu hiện các polynucleotit theo sáng chế ở cây trồng, mô thực vật, tế bào thực vật và các tế bào chủ khác. Các catxet biểu hiện có chứa một promotor có thể biểu hiện ở cây trồng, mô thực vật, tế bào thực vật hoặc các tế bào chủ mong muốn khác được liên kết có thể điều khiển được với một polynucleotit theo sáng chế có chứa một trình tự nucleotit mã hóa cả protein AHASLs có độ dài đầy đủ (nghĩa là có chứa peptit chuyển hóa chất lục lạp) hoặc protein AHASL1 trưởng thành (nghĩa là không chứa peptit chuyển lục lạp). Nếu việc biểu hiện là cần thiết ở plastit và lục lạp của cây trồng hoặc tế bào thực vật, các catxet biểu hiện có thể chứa

trình tự hướng đích-lục lạp liên kết có thể điều khiển được mà mã hóa peptit chuyển lục lạp. Các catxet biểu hiện theo sáng chế được ứng dụng trong phương pháp nhằm tăng cường khả năng chống chịu với thuốc diệt cỏ ở cây trồng hoặc tế bào chủ. Phương pháp gồm việc biến nạp vào cây trồng hoặc tế bào chủ với một catxet biểu hiện theo sáng chế, trong đó catxet biểu hiện bao gồm một promotor có thể biểu hiện ở cây trồng hoặc tế bào chủ mong muốn và promotor được liên kết có thể điều khiển được với polynucleotit theo sáng chế mà gồm có một trình tự nucleotit mã hóa protein AHASL1 chịu imidazolinon theo sáng chế.

Việc sử dụng thuật ngữ “các cấu trúc polynucleotit” ở đây không nhằm giới hạn phạm vi sáng chế này đối với các cấu trúc polynucleotit có chứa ADN. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này đều có thể nhận ra được rằng các cấu trúc polynucleotit, cụ thể là các polynucleotit và ogoligonucleotit, gồm các ribonucleotit và phần tử kết hợp của cả ribonucleotit và deoxyribonucleotit cũng có thể được sử dụng trong các phương pháp được mô tả ở đây. Do vậy, các cấu trúc polynucleotit theo sáng chế này bao gồm tất cả các cấu trúc polynucleotit có thể được sử dụng để biến nạp vào cây trồng, bao gồm, nhưng không giới hạn, các cấu trúc bao gồm deoxyribonucleotit, ribonucleotit, và phần tử kết hợp của chúng. Các deoxyribonucleotit và các ribonucleotit này bao gồm cả phân tử có nguồn gốc tự nhiên và các phân tử tương tự có nguồn gốc nhân tạo. Các cấu trúc polynucleotit theo sáng chế cũng bao gồm tất cả các dạng cấu trúc polynucleotit bao gồm, nhưng không giới hạn, các dạng chuỗi đơn, chuỗi kép, cấu trúc kẹp tóc, các cấu trúc thân-và-vòng và tương tự. Hơn nữa, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật đều hiểu được rằng mỗi một trình tự nucleotit được đề cập đến ở đây cũng bao gồm các phần tử bổ sung của các trình tự nucleotit được lấy làm minh họa.

Hơn nữa, các phương pháp theo sáng chế được công nhận là có thể sử dụng cấu trúc polynucleotit có khả năng định hướng sự biểu hiện của ít nhất một protein hoặc ít nhất một ARN trong cây trồng được biến nạp, như là, ví dụ, ARN đối nghĩa bổ sung với ít nhất một phần của mARN. Điển hình là, một cấu trúc polynucleotit như vậy bao gồm một trình tự mã hóa cho protein hoặc ARN được liên kết có thể điều khiển được đối với các vùng điều chỉnh sao chép 5' và 3'. Ngoài ra, các phương pháp theo sáng chế được công nhận là có thể sử dụng cấu trúc polynucleotit không có khả năng định hướng sự biểu hiện

của ARN trong cây trồng được biến nạp. Hơn nữa, cần phải thừa nhận rằng, để biểu hiện một polynucleotit theo sáng chế trong một tế bào chủ mong muốn, polynucleotit điển hình được liên kết có thể điều khiển được với một promotor có khả năng định hướng sự biểu hiện gen trong tế bào chủ mong muốn. Các phương pháp theo sáng chế để biểu hiện các polynucleotit trong các tế bào chủ không phụ thuộc vào promotor cụ thể. Các phương pháp bao gồm việc sử dụng một promotor bất kỳ đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật và có khả năng định hướng biểu hiện gen ở trong tế bào chủ mong muốn.

Sáng chế này đề cập đến các phân tử polynucleotit AHASL1 và các mảnh và các biến thể của nó. Các phân tử polynucleotit là các mảnh của các trình tự nucleotit này cũng được đề cập trong sáng chế này. Thuật ngữ “mảnh” được sử dụng ở đây để chỉ một phần của trình tự nucleotit mã hóa protein AHASL1 theo sáng chế. Một mảnh của trình tự nucleotit AHASL1 theo sáng chế này có thể mã hóa phần có hoạt tính sinh học của protein AHASL1, hoặc nó có thể là mảnh có thể được sử dụng như là một đoạn mồi lai tạo hoặc đoạn mồi PCR bằng cách sử dụng các phương pháp được đề cập dưới đây. Phần có hoạt tính sinh học của protein AHASL1 có thể được điều chế bằng cách phân lập một phần của một trong các trình tự nucleotit AHASL1 theo sáng chế, biểu hiện phần được mã hóa của protein AHASL1 này (ví dụ, bằng cách biểu hiện tái tổ hợp *in vitro*) và có hoạt tính của các mảnh được mã hóa của protein AHASL1. Các phân tử polynucleotit là các mảnh của trình tự nucleotit AHASL1 bao gồm ít nhất khoảng 15, 20, 50, 75, 100, 200, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1050, 1100, 1150, 1200, 1250, 1300, 1350, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, hoặc 1950 nucleotit, hoặc bằng với số nucleotit của trình tự nucleotit có độ dài đầy đủ được mô tả ở đây (ví dụ, 1961 và 1932 nucleotit nêu trong SEQ ID số: 1 và 3, một cách tương ứng) phụ thuộc vào mục đích sử dụng.

Mảnh trình tự nucleotit AHASL1 mã hóa phần có hoạt tính sinh học của protein AHASL1 theo sáng chế sẽ mã hóa ít nhất khoảng 15, 25, 30, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, hoặc 625 các axit amin liên tiếp, hoặc bằng với tổng số axit amin của protein AHASL1 có độ dài đầy đủ theo sáng chế (ví dụ, 644 axit amin nêu trong SEQ ID số: 2). Các mảnh trình tự nucleotit AHASL1 hữu hiệu như là

các đoạn nối lại tạo cho các đoạn nối PCR thường không mã hóa phần có hoạt tính sinh học của protein AHASL1.

Các phân tử polynucleotit là biến thể của các trình tự nucleotit được mô tả ở đây cũng được đề cập đến trong sáng chế này. Thuật ngữ “các biến thể” của các trình tự nucleotit AHASL1 theo sáng chế này bao gồm các trình tự mã hóa các protein AHASL1 được mô tả ở đây nhưng khác biệt theo cách bảo toàn do sự thoái hóa của mã di truyền. Các biến thể allen có nguồn gốc tự nhiên này có thể được xác định với việc sử dụng các kỹ thuật sinh học phân tử, như là phản ứng mạch polymeraza (PCR) và các kỹ thuật lai tạo được đề cập dưới đây. Các trình tự nucleotit biến thể cũng bao gồm các trình tự nucleotit có nguồn gốc nhân tạo đã được chế tạo, bằng cách sử dụng các đột biến gen định hướng vị trí nhưng vẫn mã hóa protein AHASL1 được mô tả trong sáng chế này như được thảo luận dưới đây. Thông thường, các biến thể trình tự nucleotit theo sáng chế này có độ trùng lặp ít nhất khoảng 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với trình tự nucleotit xác định được đề cập ở đây. Trình tự nucleotit AHASL1 biến thể sẽ mã hóa protein AHASL1, một cách tương ứng, bao gồm trình tự axit amin có độ trùng lặp ít nhất khoảng 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với trình tự axit amin của protein AHASL1 được mô tả ở đây.

Thêm vào đó, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể nhận thức được rằng những thay đổi có thể được gây ra bởi các đột biến trong các trình tự nucleotit theo sáng chế và bằng cách đó dẫn đến những thay đổi trong trình tự axit amin của các protein AHASL1 được mã hóa không làm thay đổi hoạt tính sinh học của các protein AHASL1. Do vậy, phân tử polynucleotit được phân lập mã hóa protein AHASL1 có trình tự khác với trình tự được nêu trong các SEQ ID số: 1 hoặc 3, một cách tương ứng, có thể được tạo ra bằng cách tạo một hoặc nhiều việc thế, thêm vào hoặc xóa bỏ nucleotit khỏi trình tự nucleotit tương ứng được bộc lộ ở đây, sao cho một hoặc nhiều sự thay thế, thêm hoặc xóa axit amin được đưa vào protein được mã hóa. Các đột biến có thể được tạo ra bởi các kỹ thuật tiêu chuẩn, như là đột biến gen định hướng vị trí và đột biến trung gian nhờ PCR. Các trình tự nucleotit biến thể này cũng được bao gồm trong sáng chế này.

Ví dụ, tốt hơn là, việc thế axit amin bảo thủ có thể được thực hiện ở một hoặc nhiều gốc axit amin dự đoán, tốt hơn là các gốc axit amin không thiết yếu. Thuật ngữ gốc axit amin “không thiết yếu” được dùng để chỉ gốc axit amin có thể được biến nạp từ trình tự kiểu đại của protein AHASL1 (ví dụ, trình tự nêu trong SEQ ID số: 2) mà không biến đổi hoạt tính sinh học, trong khi đó gốc axit amin “thiết yếu” là cần thiết đối với hoạt tính sinh học. Thuật ngữ “việc thế axit amin bảo toàn” nghĩa là việc thế, trong đó gốc axit amin được thay thế bởi một gốc axit amin có cùng mạch bên. Họ các gốc axit amin có cùng mạch bên đã được biết rõ trong tình trạng kỹ thuật. Các họ này bao gồm các axit amin với các mạch bên bazơ (ví dụ, lysin, arginin, histidin), mạch bên axit (ví dụ, axit aspartic, axit glutamic), các mạch bên phân cực không tích điện (ví dụ, alanin, valin, serin, threonin, tyrosin, xystein), các mạch bên không phân cực (ví dụ alanin, valin, leuxin, isoleuxin, prolin, phenylalanin, methionin, tryptophan), các mạch bên phân nhánh beta (ví dụ, threonin, valin, isoleuxin) và các mạch bên thơm (ví dụ, tyrosin, phenylalanin, tryptophan, histidin). Việc thế như vậy sẽ không được thực hiện đối với các gốc axit amin được bảo toàn hoặc đối với các gốc axit amin nằm trong mô-típ được bảo toàn.

Các protein theo sáng chế có thể được biến nạp theo nhiều cách khác nhau bao gồm việc thế, xóa bỏ, cắt ngắn và chèn thêm axit amin. Các phương pháp gây đột biến này đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật. Ví dụ, các biến thể trình tự axit amin của các protein AHASL1 có thể được điều chế bằng các đột biến trong ADN. Các phương pháp gây đột biến và biến đổi trình tự nucleotit đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật. Tham khảo, ví dụ, Kunkel (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488-492; Kunkel và các đồng tác giả (1987) *Methods in Enzymol.* 154:367-382; Patent Mỹ số 4873192; Walker và Gaastra, (1983) *Techniques in Molecular Biology* (MacMillan Publishing Company, New York) và các tài liệu tham khảo này được viện dẫn trong bản mô tả sáng chế. Tài liệu hướng dẫn đối với việc thế axit amin phù hợp không làm ảnh hưởng đến hoạt tính sinh học của protein có thể được tìm thấy trong tập sách của Dayhoff và các đồng tác giả (1978) *Atlas of Protein Sequence and Structure* (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D. C), được sử dụng ở đây làm tài liệu tham khảo. Việc thế bảo toàn, như là việc hoán đổi một axit amin với một axit amin khác có đặc tính tương tự, có thể được ưu tiên.

Theo một lựa chọn khác, các trình tự nucleotit AHASL1 biến thể có thể được sản xuất bằng cách tạo các đột biến một cách ngẫu nhiên trên tất cả hoặc một phần của trình tự mã hóa AHASL1, như là bằng các đột biến gen bão hoà, và các đột biến thu được có thể được sàng lọc hoạt tính AHAS để xác định các thể đột biến vẫn giữ được hoạt tính AHAS, bao gồm hoạt tính AHAS chịu thuốc diệt cỏ. Theo các đột biến gen, các protein được mã hóa có thể được biểu hiện tái tổ hợp, và các hoạt tính của protein có thể được xác định bằng các kỹ thuật thử nghiệm tiêu chuẩn.

Do đó, các trình tự nucleotit theo sáng chế này bao gồm các trình tự được mô tả ở đây cũng như các mảnh và các biến thể của nó. Các trình tự nucleotit AHASL1 theo sáng chế và các mảnh và các biến thể của nó có thể được sử dụng như các đoạn môi và/hoặc promoter để xác định và/hoặc tách dòng các đồng đẳng với AHASL ở các cây trồng khác. Các đoạn môi này có thể được sử dụng để phát hiện các trình tự gen hoặc trình tự phiên mã mã hóa các protein giống nhau hoặc trùng lặp.

Theo cách này, các phương pháp như là PCR, lai tạo, và tương tự có thể được sử dụng để phát hiện các trình tự có độ đồng nhất cơ bản với các trình tự theo sáng chế. Tham khảo, ví dụ, Sambrook và các đồng tác giả (1989) *Molecular Cloning: Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY) và Innis, và các đồng tác giả (1990) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Academic Press, NY). Các trình tự nucleotit AHASL được phân lập dựa trên sự đồng nhất chuỗi của chúng với các trình tự nucleotit AHASL1 như được đề cập đến ở đây hoặc với các mảnh và các biến thể của nó cũng được đề cập đến trong sáng chế này.

Theo một phương pháp lai tạo, tất cả hoặc một phần của trình tự nucleotit AHASL1 đã biết có thể được sử dụng để kiểm tra cADN hoặc thư viện gen. Các phương pháp xây dựng cADN hoặc thư viện gen như vậy đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật và đã được đề cập đến trong Sambrook và các đồng tác giả (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY). Các phân tử được gọi là các đoạn dò lai tạo có thể là các thành phần của ADN gen, thành phần của cADN, thành phần của ARN hoặc các oligonucleotit khác, và có thể được dán nhãn với một nhóm có thể dò tìm được như là P, hoặc bất kỳ dụng cụ đánh dấu phát hiện nào như là các hợp chất đồng vị phóng xạ hoặc các hợp chất huỳnh quang, một enzym hoặc

đồng nhân tố enzym. Các đoạn môi để lai tạo có thể được chế tạo bằng cách dán các oligonucleotit nhân tạo dựa trên các trình tự nucleotit AHASL1 đã biết được mô tả ở đây. Các đoạn môi thoái hóa được tạo lập trên cơ sở các nucleotit hoặc các gốc axit amin được bảo toàn trong trình tự nucleotit AHASL1 đã biết hoặc trình tự axit amin được mã hóa có thể được sử dụng thêm. Đoạn môi điển hình bao gồm một vùng trình tự nucleotit lai tạo trong các điều kiện nghiêm ngặt với ít nhất khoảng 12, tốt hơn là khoảng 25, tốt hơn nữa là khoảng 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1400, 1600, hoặc 1800 nucleotit liên tiếp của trình tự nucleotit AHASL1 theo sáng chế hoặc thành phần hoặc biến thể của nó. Việc tạo lập các đoạn môi để lai tạo đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật và được đề cập đến trong Sambrook và các đồng tác giả (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Tái bản lần thứ 2, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York), được sử dụng ở đây để tham khảo.

Ví dụ, toàn bộ trình tự AHASL1 được đề cập đến ở đây, hoặc một hoặc nhiều thành phần của nó, có thể được sử dụng như là một đoạn môi có khả năng lai tạo đặc hiệu với các trình tự AHASL1 và các ARN thông tin tương ứng. Các kỹ thuật lai tạo bao gồm sàng lọc lai của thư viện ADN được trải đĩa (kể cả các mảng hoặc khuôn lặc, ví dụ Sambrook và các đồng tác giả (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (tập 2, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York)).

Việc lai tạo các trình tự như vậy có thể được thực hiện trong các điều kiện nghiêm ngặt. Thuật ngữ “các điều kiện nghiêm ngặt” hoặc “các điều kiện lai nghiêm ngặt” được dùng để chỉ các điều kiện trong đó một đoạn môi sẽ lai với trình tự đích đến mức độ có thể dò được lớn hơn so với các trình tự khác (ví dụ lớn hơn ít nhất hai lần so với thông thường). Các điều kiện nghiêm ngặt phụ thuộc vào từng trình tự và có thể là khác nhau trong các tình huống khác nhau.

Điển hình là, các điều kiện nghiêm ngặt có thể là các điều kiện trong đó nồng độ muối ít hơn khoảng ion Na 1,5M, điển hình là nồng độ ion Na nằm trong khoảng từ 0,01 đến 1,0M (hoặc các muối khác) có độ pH từ 7 đến 8,3 và nhiệt độ ít nhất là khoảng 30°C cho các đoạn môi ngắn hơn (ví dụ, từ 10 đến 50 nucleotit) và ít nhất khoảng 60°C đối với các đoạn môi dài (ví dụ, lớn hơn 50 nucleotit). Các điều kiện nghiêm ngặt cũng có thể đạt được với việc thêm vào các chất làm mất tính ổn định như là formamit. Ví dụ về các điều

kiện nghiêm ngặt thấp bao gồm việc lai tạo với một dung dịch đệm chứa khoảng từ 30 đến 35% formamit, NaCl 1M, 1% SDS (sulfat dodexyl natri) ở nhiệt độ 37°C, và được rửa trong từ 1X đến 2X SSC (20X SSC = 3,0 M NaCl/0,3 M trinatri xitrat) trong khoảng từ 50 đến 55°C. Ví dụ về các điều kiện nghiêm ngặt vừa phải bao gồm việc lai tạo trong khoảng từ 40 đến 45% formamit, 1,0 M NaCl, 1% SDS ở nhiệt độ 37°C, và rửa trong khoảng từ 0,5X đến 1X SSC ở nhiệt độ từ 55 đến 60°C. Ví dụ về các điều kiện nghiêm ngặt cao bao gồm việc lai tạo trong 50% formamit, 1 M NaCl, 1% SDS ở 37°C, và rửa trong 0,1X SSC ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 60 đến 65°C. Tùy ý, các dung dịch đệm có thể bao gồm khoảng 0,1% đến khoảng 1% SDS. Thời gian lai tạo thường ít hơn 24 giờ, thường là từ 4 đến 12 giờ.

Độ đặc hiệu thường là chức năng của việc rửa sau lai tạo, các nhân tố quyết định là sức mạnh của ion và nhiệt độ của dung dịch rửa cuối cùng. Đối với các phép lai ADN-ADN, T_m có thể được ước lượng bằng phương trình của Meinkoth và Wahl (1984) Anal. Biochem. 138:267-284: $T_m = 81,5^{\circ}\text{C} + 16,6 (\log M) + 0,41 (\%GC) - 0,61 (\text{dạng } \%) - 500/L$; trong đó M là nồng độ phân tử gam của các cation hóa trị một, %GC là tỷ lệ phần trăm của các nucleotit xytosin và guanosin trong ADN, dạng % là tỷ lệ phần trăm của formadin trong dung dịch lai, và L là độ dài của phép lai trên các cặp bazơ. T_m là nhiệt độ (dưới sức mạnh ion và độ pH được xác định) tại đó 50% trình tự đích bổ sung lai với đoạn mồi khớp hoàn toàn. T_m được giảm khoảng 1°C cho mỗi 1% cặp không khớp; do vậy, T_m , các điều kiện lai và/hoặc điều kiện rửa có thể được điều chỉnh để lai với các trình tự có độ đồng nhất mong muốn. Ví dụ, nếu các trình tự có >90% độ đồng nhất, T_m có thể được giảm xuống 10°C. Thông thường, các điều kiện lai có thể được lựa chọn có nhiệt độ thấp hơn 5°C so với nhiệt độ nóng chảy (T_m) đối với một trình tự xác định và sự bổ sung của nó ở một độ mạnh nhất định của ion và độ pH. Tuy nhiên, một vài điều kiện nghiêm ngặt có thể tận dụng phép lai và/hoặc rửa ở nhiệt độ thấp hơn 1, 2, 3, hoặc 4°C so với nhiệt độ nóng chảy (T_m); các điều kiện nghiêm ngặt trung bình có thể tận dụng phép lai và/hoặc rửa ở nhiệt độ thấp hơn 6, 7, 8, 9, hoặc 10°C so với nhiệt độ nóng chảy (T_m); các điều kiện lai nghiêm ngặt thấp có thể tận dụng phép lai và/hoặc rửa ở nhiệt độ thấp hơn 11, 12, 13, 14, 15, hoặc 20°C so với nhiệt độ nóng chảy (T_m). Bằng cách sử dụng phương trình, phép lai và các chế phẩm rửa và T_m mong muốn, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực

kỹ thuật sẽ hiểu được rằng các biến thể về độ nghiêm ngặt của phép lai và/hoặc các dung dịch rửa đã được đề cập đến. Nếu mức độ mong muốn của các kết quả không khớp ở T_m nhỏ hơn 45°C (dung dịch nước) hoặc 32°C (dung dịch formamit), ưu tiên tăng nồng độ SSC sao cho nhiệt độ cao hơn có thể được sử dụng. Tài liệu hướng dẫn cụ thể hơn đối với các axit nucleic của phép lai có thể tham khảo thêm trong Tijssen (1993) *Laboratory Techniques Biochemistry and Molecular Biology — Hybridization with Nucleic Acid Probes*, Phần I, Chương 2 (Elsevier, New York); và Ausubel và các đồng tác giả (1995) *Current Protocols in Molecular Biology*, Chương 2 (Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York). Tham khảo Sambrook và các đồng tác giả (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (tái bản lần 2, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York).

Phải thừa nhận rằng các phân tử polynucleotit và các protein theo sáng chế này bao gồm các phân tử polynucleotit và các protein bao gồm một trình tự nucleotit hoặc axit amin đủ đồng nhất với trình tự nucleotit của các SEQ ID số: 1, 3, 4, và/hoặc 6, hoặc đồng nhất với trình tự axit amin của các SEQ ID số: 2 và/hoặc 5. Thuật ngữ “đủ đồng nhất” được sử dụng ở đây để chỉ trình tự nucleotit hoặc axit amin đầu tiên có số lượng hữu hiệu nucleotit hoặc gốc axit amin tương đồng hoặc trùng hợp (ví dụ, với một mạch đơn tương tự) với trình tự nucleotit hoặc axit amin thứ hai có chung miền cấu trúc và/hoặc chung hoạt tính chức năng. Ví dụ, các trình tự nucleotit hoặc axit amin có miền cấu trúc chung với độ đồng nhất ít nhất là khoảng 45%, 55%, hoặc 65%, tốt hơn là 75%, tốt hơn nữa là 85%, 95%, hoặc 98% như được xác định ở đây được coi là có độ đồng nhất hữu hiệu.

Để xác định tỷ lệ phần trăm trùng lặp giữa hai trình tự axit amin hoặc giữa hai trình tự axit nucleic, các trình tự được sắp hàng để được so sánh một cách tốt nhất. Tỷ lệ phần trăm trùng lặp giữa hai trình tự là hàm của số lượng vị trí giống nhau giữa các trình tự này (ví dụ, tỷ lệ phần trăm trùng lặp = số lượng các vị trí trùng lặp/tổng số lượng các vị trí (ví dụ các vị trí chồng lên nhau) x 100). Theo một phương án, hai trình tự có độ dài bằng nhau. Phần trăm trùng lặp giữa hai trình tự có thể được xác định bằng các kỹ thuật tương tự với các kỹ thuật như được mô tả dưới đây, cho phép hoặc không cho phép có các khoảng trống. Khi tính tỷ lệ phần trăm trùng lặp, chỉ đếm các cặp trùng lặp hoàn toàn.

Việc xác định tỷ lệ phần trăm trùng lặp giữa hai trình tự có thể được thực hiện bằng cách sử dụng một thuật toán. Một ví dụ không hạn chế, được ưu tiên về thuật toán được sử dụng để so sánh hai trình tự là thuật toán của Karlin và Altschul (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2264, được điều chỉnh theo Karlin và Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5877. Các thuật toán này được sử dụng trong các chương trình NBLAST và XBLAST của Altschul và các đồng tác giả (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403. Việc tìm kiếm nucleotit BLAST có thể được thực hiện bằng chương trình NBLAST, điểm = 100, độ dài của ký tự = 12, để thu được các trình tự nucleotit tương đồng với các phân tử polynucleotit theo sáng chế. Tìm kiếm protein trên BLAST có thể được thực hiện bằng chương trình XBLAST, điểm = 50, độ dài ký tự = 3, để tìm được các trình tự axit amin tương đồng với các phân tử protein theo sáng chế. Để tìm được các cặp không khớp nhằm mục đích so sánh, BLAST có các khoảng hở có thể được sử dụng như được mô tả trong Altschul và các đồng tác giả. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389. Theo một lựa chọn khác, PSI- Blast có thể được sử dụng để thực hiện việc tìm kiếm lặp lại giúp phát hiện mối quan hệ giữa các phân tử. Xem Altschul et al. (1991) nêu trên. Khi sử dụng các chương trình BLAST, BLAST khoảng trống, và PSI-Blast, các thông số mặc định của chương trình tương ứng (ví dụ, XBLAST và NBLAST) có thể được sử dụng. Xem <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Một ví dụ được ưu tiên khác là ví dụ không hạn chế của một thuật toán được sử dụng để so sánh các trình tự của Myers và Miller (1988) *CABIOS* 4:11-17. Thuật toán này được sử dụng trong chương trình ALIGN (phiên bản 2.0), là một phần của gói phần mềm sắp xếp trình tự GCG. Khi sử dụng chương trình ALIGN nhằm so sánh các trình tự axit amin, một bảng trọng lượng gốc PAM120, trừ độ dài khoảng hở 12, và trừ khoảng hở 4 có thể được sử dụng. Việc so sánh cũng có thể được tiến hành thủ công để kiểm tra nghiệm thu.

Trừ trường hợp được đề cập cụ thể, độ trùng lặp/tương tự của trình tự được cho ở đây đề cập đến giá trị thu được bằng cách sử dụng các trình tự có độ dài đầy đủ theo sáng chế và sử dụng so sánh nhiều trình tự theo thuật toán Clustal W (*Nucleic Acid Research*, 22(22):4673-4680, 1994) bằng cách sử dụng chương trình AlignX trong gói phần mềm Vector NTI Suite phiên bản 7 (InforMax, Inc., Bethesda, MD, USA) bằng cách sử dụng các thông số mặc định; hoặc các chương trình tương đương của nó. Thuật ngữ “chương

trình tương đương” được sử dụng để đề cập đến các chương trình so sánh được sử dụng cho hai trình tự cần so sánh, tạo ra bảng sắp hàng có các nucleotit hoặc các gốc axit amin giống nhau và phần trăm độ đồng nhất của trình tự khi so sánh với trình tự sắp xếp tương ứng được tạo bởi AlignX trong gói phần mềm Vector NTI Suite phiên bản 7.

Các trình tự nucleotit AHASL1 theo sáng chế này bao gồm cả các trình tự có nguồn gốc tự nhiên cũng như dạng đột biến, đặc biệt là các dạng đột biến mã hóa protein AHASL1 có hoạt tính AHAS chịu thuốc diệt cỏ. Tương tự, các protein theo sáng chế này cũng bao gồm cả các protein có nguồn gốc tự nhiên cũng như các biến thể và các dạng được biến nạp của nó. Các biến thể như vậy vẫn giữ được các hoạt tính AHAS mong muốn. Rõ ràng là, các đột biến được tạo ra trong các ADN mã hóa biến thể sẽ không đặt ở trình tự ngoài khung đọc và tốt hơn là không tạo ra các vùng bổ sung mà tạo ra cấu trúc mARN bậc hai. Tham khảo tài liệu công bố đơn châu Âu EP 75444.

Việc loại bỏ, chèn và thế các trình tự protein được đề cập đến ở đây không nhằm mục đích làm thay đổi hoàn toàn các đặc tính của protein. Tuy nhiên, khi gặp khó khăn trong việc dự đoán được hiệu quả chính xác của việc thế, xóa bỏ hoặc chèn này, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật sẽ chấp nhận việc đánh giá hiệu quả thông qua các chuỗi thí nghiệm sàng lọc. Qua đó, hoạt tính có thể được đánh giá bằng các thí nghiệm hoạt tính AHAS. Tham khảo, ví dụ, Singh và các đồng tác giả. (1988) Anal. Biochem. 171:173-179, được sử dụng ở đây để tham chiếu.

Các trình tự nucleotit và protein biến thể cũng bao gồm các trình tự và protein được tạo ra từ quá trình đột biến gen và tái tổ hợp gen như là chuyển đổi ADN. Với quy trình này, một hoặc nhiều AHASL mã hóa các trình tự có thể được thiết kế để tạo ra protein AHASL mới có các đặc tính mong muốn.

Theo cách này, thư viện các polynucleotit tái tổ hợp được tạo ra từ các trình tự polynucleotit liên quan bao gồm các vùng trình tự cơ bản có độ tương đồng trình tự và có thể tái tổ hợp đồng đẳng *in vitro* hoặc *in vivo*. Ví dụ, sử dụng phương án này, các mô-típ trình tự mã hóa miền mong muốn có thể được chuyển đổi giữa gen AHASL1 theo sáng chế và các gen AHASL khác đã biết để tạo nên một gen mới mã hóa protein với đặc tính mong muốn được cải thiện, như là K_m được tăng cao đối với trường hợp của enzym. Quy trình biến đổi ADN như vậy đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật. Tham khảo, ví dụ,

Stemmer (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:10747-10751; Stemmer (1994) *Nature* 370:389-391; Cramer và các đồng tác giả. (1997) *Nature Biotech.* 15:436-438; Moore và các đồng tác giả. (1997) *J. Mol. Biol.* 272:336-347; Zhang và các đồng tác giả. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:4504-4509; Cramer và các đồng tác giả (1998) *Nature* 391:288-291; và Patent Mỹ số 5605793 và 5837458.

Các trình tự nucleotit theo sáng chế có thể được sử dụng để phân lập các trình tự tương ứng từ các sinh vật khác, cụ thể là từ các cây trồng khác, đặc biệt là từ các loại cây hai lá mầm. Theo cách này, các phương pháp như PCR, lai tạo và tương tự có thể được sử dụng để xác định các trình tự như vậy dựa trên độ đồng nhất chuỗi của nó đối với các trình tự được đề cập đến ở đây. Các trình tự được phân lập dựa trên độ tương đồng trình tự của chúng đối với các trình tự AHASL1 được đề cập đến ở đây hoặc các thành phần của nó cũng được đề cập đến trong sáng chế này. Vì vậy, các trình tự được phân lập mã hóa protein AHASL và lai trong điều kiện nghiêm ngặt để tạo ra trình tự được bộc lộ ở đây, hoặc các thành phần của nó được sáng chế này đề cập đến. Đối với kỹ thuật PCR, các đoạn môi oligonucleotit có thể được tạo lập để sử dụng trong các phản ứng PCR để khuếch đại các trình tự ADN tương ứng từ cADN hoặc gen ADN được chiết xuất từ bất kỳ cây trồng nào mong muốn. Các phương pháp tạo lập đoạn môi PCR và tách dòng PCR đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật này và đã được bộc lộ trong Sambrook và các đồng tác giả (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York). Cũng có thể tham khảo trong Innis và các đồng tác giả, eds. (1990) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Academic Press, New York); Innis và Gelfand, eds. (1995) *PCR Strategies* (Academic Press, New York); và Innis và Gelfand, eds. (1999) *PCR Methods Manual* (Academic Press, New York). Các phương pháp PCR đã biết, bao gồm, nhưng không giới hạn, các phương pháp sử dụng các cặp đoạn môi, đoạn môi làm tổ, đoạn môi đơn, đoạn môi thoái hóa, đoạn môi gen xác định, đoạn môi có một phần không ăn khớp và tương tự.

Các trình tự polynucleotit AHASL1 theo sáng chế này được tạo ra trong các catxet biểu hiện để biểu hiện trong các cây trồng mong muốn. Catxet bao gồm các trình tự điều biến 3' và 5' liên kết có thể điều khiển được với một trình tự polynucleotit AHASL1 theo sáng chế. Thuật ngữ “liên kết có thể điều khiển được” được dùng để chỉ các liên kết chức

năng giữa promotor và trình tự thứ hai, trong đó trình tự promotor khởi đầu và trung gian việc phiên mã các trình tự ADN này tương ứng với trình tự thứ hai. Thông thường, liên kết có thể điều khiển được có nghĩa là các trình tự axit nucleic được liên kết liên tiếp với nhau và, nếu cần thiết có thể kết hợp với hai protein mã hóa vùng, liên tiếp và trong cùng một khung đọc. Catxet có thể bao gồm thêm ít nhất một gen bổ sung có thể cùng được biến nạp vào sinh vật. Như một sự lựa chọn khác, các gen bổ sung có thể được tạo ra trong nhiều catxet biểu hiện.

Catxet biểu hiện như vậy được tạo ra với nhiều vị trí giới hạn để chèn trình tự polynucleotit AHASL1 được đặt dưới sự điều hoà phiên mã của vùng điều hoà. Catxet biểu hiện có thể bao gồm thêm các gen đánh dấu chọn lọc được.

Catxet biểu hiện bao gồm phiên mã theo chiều 5'-3', vùng khởi đầu phiên mã và dịch mã (ví dụ, promotor, trình tự polynucleotit AHASL1 theo sáng chế và vùng kết thúc phiên mã và dịch mã (nghĩa là vùng kết thúc) có chức năng trong cây trồng. Promotor có thể là vốn có hoặc tương tự, hoặc ngoại lai hoặc dị hợp đối với tế bào chủ của cây trồng và/hoặc đối với trình tự polynucleotit AHASL1 theo sáng chế. Thêm vào đó, promotor có thể là gen có nguồn gốc tự nhiên hoặc theo cách khác là trình tự có nguồn gốc nhân tạo. Khi promotor “ngoại lai” hoặc “dị hợp” với tế bào chủ của cây trồng, có nghĩa là promotor không được tìm thấy trong cây trồng gốc hoặc là promotor có nguồn gốc tự nhiên để liên kết có thể điều khiển được với trình tự polynucleotit AHASL1 theo sáng chế. Như được sử dụng ở đây, gen khả năng bao gồm một trình tự mã hóa liên kết có thể điều khiển được với trình tự khởi đầu phiên mã dị hợp với trình tự mã hóa.

Nếu ưu tiên biểu hiện các polynucleotit AHASL1 theo sáng chế bằng cách sử dụng các promotor dị hợp, các trình tự promotor nguyên bản có thể được sử dụng. Các cấu trúc như vậy sẽ làm thay đổi mức độ biểu hiện của protein AHASL1 trong cây trồng hoặc trong tế bào thực vật. Do đó, kiểu hình của cây trồng hoặc tế bào thực vật được thay đổi.

Vùng kết thúc có thể là nguyên bản với vùng khởi đầu phiên mã, có thể là nguyên bản với các trình tự AHASL1 liên kết có thể điều khiển được mong muốn, có thể là nguyên bản với tế bào chủ của cây trồng hoặc có thể được sinh ra từ nguồn gốc khác (nghĩa là ngoại lai hoặc dị hợp với promotor, trình tự polynucleotit AHASL1 mong muốn, tế bào thực vật hoặc sự kết hợp bất kỳ). Các vùng kết thúc thuận tiện có trong Ti-plasmid

của các *A. tumefaciens*, như là các vùng kết thúc tổng hợp octopin synthaza và nopal synthaza. Tham khảo tài liệu Guerineau và các đồng tác giả (1991) *Mol. Gen. Genet.* 262:141-144; Proudfoot (1991) *Cell* 64:671-674; Sanfacon và các đồng tác giả (1991) *Genes Dev.* 5:141-149; Mogen và các đồng tác giả (1990) *Plant Cell* 2:1261-1272; Munroe và các đồng tác giả (1990) *Gene* 91:151-158; Ballas và các đồng tác giả (1989) *Nucleic Acids Res.* 17:7891-7903; và Joshi và các đồng tác giả (1987) *Nucleic Acid Res.* 15:9627-9639.

Nếu cần thiết, các gen có thể được tối ưu hóa để tăng cường sự biểu hiện trong cây trồng được biến nạp. Ví dụ, các gen có thể được tổng hợp bằng cách sử dụng các đơn vị mã của cây trồng được ưu tiên để cải thiện sự biểu hiện. Tham khảo, ví dụ, Campbell và Gowri (1990) *Plant Physiol.* 92:1-11 để có thể tìm hiểu về việc sử dụng đơn vị mã của vật chủ được ưu tiên. Các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật để tổng hợp các gen của cây trồng được ưu tiên. Tham khảo, ví dụ, patent Mỹ số 5380831 và 5436391, và Murray và các đồng tác giả (1989) *Nucleic Acids Res.* 17:477-498, được sử dụng ở đây để tham khảo.

Việc biến đổi trình tự bổ sung đã được biết là làm tăng cường sự biểu hiện gen ở tế bào chủ. Các biến đổi này bao gồm việc loại trừ các trình tự mã hóa các tín hiệu polyadenin nhiều, tín hiệu vị trí cắt intron-exon, trình tự lặp lại tương tự gen nhảy và các trình tự có đặc điểm đã được biết rõ khác mà có thể được loại bỏ ra khỏi việc biểu hiện gen. Lượng G-C của trình tự có thể được điều chỉnh đến mức trung bình ở tế bào chủ đã biết, như được tính toán bằng cách tham khảo các gen đã biết được biểu hiện trong tế bào chủ. Nếu có thể, trình tự được biến đổi để tránh các cấu trúc mARN bậc hai dạng kẹp tóc được dự đoán.

Các trình tự nucleotit tăng cường biểu hiện gen cũng có thể được sử dụng cho các vector biểu hiện ở cây trồng. Điều này bao gồm các intron của ngô *Adhl*, gen intron1 (Callis và các đồng tác giả *Genes and Development* 1:1183-1200, 1987), và các trình tự dẫn đầu, (W- sequence) từ virus thể khảm ở cây thuốc lá (Tobacco Mosaic virus-TMV), virus bệnh đốm vàng úa ở cây ngô và virus thể khảm ở cây cỏ linh lăng (Gallie và các đồng tác giả *Nucleic Acid Res.* 15: 8693-8711, 1987 và Skuzeski và các đồng tác giả. *Plant Mol. Biol.* 15:65-79, 1990). Intron đầu tiên từ locus *shrunken 1* ở cây ngô đã biểu

hiện cho thấy biểu hiện tăng lên ở cấu trúc gen thể khảm. Patent Mỹ số US 5424412 và 5593874 đề cập đến việc sử dụng các intron nhất định trong cấu trúc biểu hiện gen và Gallie và các đồng tác giả (Plant Physiol. 106:929-939, 1994) cũng đã chỉ ra rằng các intron là hữu ích cho việc điều hoà biểu hiện gen trên cơ sở đặc hiệu mô. Để tăng cường hơn nữa hoặc tối ưu hóa biểu hiện gen cấu trúc tiểu phần nhỏ AHAS, các vectơ biểu hiện ở cây trồng theo sáng chế cũng có thể bao gồm các trình tự ADN chứa các vùng gắn kết chất nền (matrix attachment region - MAR). Các tế bào thực vật được biến nạp các hệ thống biểu hiện được biến nạp này, sau đó, có thể có trạng thái biểu hiện quá mức hoặc biểu hiện liên ứng các trình tự nucleotit theo sáng chế.

Các catxet biểu hiện có thể bao gồm thêm các trình tự dẫn đầu 5' trong cấu trúc catxet biểu hiện. Các trình tự dẫn đầu như vậy có thể hoạt động để tăng cường việc dịch mã. Các trình tự dẫn đầu dịch mã đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật và bao gồm: trình tự dẫn đầu EMCV (vùng không mã hóa 5' Encephalomyocarditis) (Elroy-Stein và các đồng tác giả (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:6126-6130); trình tự dẫn đầu potyvirus, ví dụ, trình tự dẫn đầu TEV (Virus khảm axit ở cây thuốc lá) (Gallie và các đồng tác giả. (1995) Gene 165(2):233-238), trình tự dẫn đầu MDMV (Virus thể khảm lùn ở cây ngô) (Virology 154:9-20), và protein liên kết mạch nặng globin miễn dịch ở người (BiP) (Macejak và các đồng tác giả (1991) Nature 353:90-94); trình tự dẫn đầu không được phiên mã từ các mARN protein bao của virus thể khảm ở cây cỏ linh lăng (AMV RNA 4) (Jobling và các đồng tác giả (1987) Nature 325:622-625); trình tự dẫn đầu virus thể khảm ở cây thuốc lá (TMV) (Gallie và các đồng tác giả (1989) in Molecular Biology of RNA, ed. Cech (Liss, New York), pp. 237-256); và trình tự dẫn đầu virus bệnh đốm úa vàng ở cây ngô (MCMV) (Lommel và các đồng tác giả (1991) Virology 81:382-385). Tham khảo thêm, Della-Cioppa và các đồng tác giả. (1987) Plant Physiol. 84:965-968. Các phương pháp khác đã được biết đến là làm tăng cường dịch mã cũng có thể được sử dụng, ví dụ intron và tương tự.

Để tạo lập catxet biểu hiện, các thành phần ADN khác nhau có thể được làm biến đổi, sao cho tạo ra trình tự ADN theo hướng cần thiết và, nếu có thể, trong một khung đọc phù hợp. Sau cùng, các nhân tố tạo sự tương hợp hoặc các thành phần liên kết có thể được sử dụng để liên kết các thành phần ADN hoặc các biến đổi khác cũng có thể được sử dụng

để tạo ra các điểm không chế thuận lợi, loại bỏ các ADN gây nhiễu, xóa bỏ các vị trí giới hạn, hoặc tương tự. Để đạt được mục đích này, việc tạo đột biến gen, chỉnh sửa đoạn môi, giới hạn, biến tính, tái thay thế *in vitro*, ví dụ như chuyển tiếp và chuyển đổi có thể được sử dụng.

Nhiều promotor có thể được sử dụng trong việc thực hiện giải pháp của sáng chế. Các promotor có thể được lựa chọn dựa trên cơ sở kết quả mong muốn. Các axit nucleic có thể được kết hợp với promotor cấu tạo, promotor ái mô hoặc promotor khác để biểu hiện ở cây trồng.

Các promotor cấu tạo như vậy bao gồm, ví dụ, promotor lõi của promotor Rsyn7 và các promotor cấu tạo khác được đề cập đến trong các tài liệu sáng chế WO 99/43838 và Patent Mỹ số US 6072050; và promotor lõi CaMV 35S (Odell và các đồng tác giả (1985) *Nature* 313:810-812); actin lúa gạo (McElroy và các đồng tác giả (1990) *Plant Cell* 2:163-171); ubiquitin (Christensen và các đồng tác giả (1989) *Plant Mol. Biol.* 12:619-632 và Christensen và các đồng tác giả (1992) *Plant Mol. Biol.* 18:675-689); pEMU (Last và các đồng tác giả (1991) *Theor. Appl. Genet.* 81:581- 588); MAS (Velten và các đồng tác giả (1984) *EMBO J.* 3:2723-2730); promotor ALS (Patent Mỹ số US 5659026), và tương tự. Các promotor liên tiếp khác, bao gồm, ví dụ Patent Mỹ số 5608149; 5608144; 5604121; 5569597; 5466785; 5399680; 5268463; 5608142; và 6177611.

Các promotor ái mô có thể được tận dụng để nhắm đích sự biểu hiện AHASL1 được tăng cường trong mô tế bào thực vật cụ thể. Các promotor ái mô như vậy bao gồm, nhưng không giới hạn, promotor ái lá, promotor ái rễ, promotor ái hạt và promotor ái thân. Các promotor ái mô được đề cập đến trong Yamamoto và các đồng tác giả (1997) *Plant J.* 12(2):255-265; Kawamata và các đồng tác giả (1997) *Plant Cell Physiol.* 38(7):792-803; Hansen và các đồng tác giả (1997) *Mol. Gen. Genet.* 254(3):337-343; Russell và các đồng tác giả (1997) *Transgenic Res.* 6(2):157-168; Rinehart và các đồng tác giả (1996) *Plant Physiol.* 112(3):1331-1341; Van Camp và các đồng tác giả (1996) *Plant Physiol.* 112(2):525-535; Canevascini và các đồng tác giả (1996) *Plant Physiol.* 112(2):513-524; Yamamoto và các đồng tác giả (1994) *Plant Cell Physiol.* 35(5):773-778; Lam (1994) *Results Probl Cell Differ.* 20:181- 196; Orozco và các đồng tác giả (1993) *Plant Mol Biol.* 23(6): 1129-1138; Matsuoka và các đồng tác giả (1993) *Proc Natl. Acad. Sci USA*

90(20):9586-9590; và Guevara-Garcia và các đồng tác giả. (1993) *Plant J.* 4(3):495-505. Các promotor như vậy có thể được biến đổi, nếu cần thiết, để biểu hiện yếu.

Theo một phương án, các axit nucleic mong muốn được hướng lục lạp để biểu hiện. Theo cách này, khi axit nucleic không được chèn trực tiếp vào lục lạp, catxet biểu hiện sẽ bao gồm thêm một trình tự hướng đích lục lạp bao gồm một trình tự nucleotit mã hóa peptit chuyển lục lạp để hướng sản phẩm gen mong muốn đến lục lạp. Các peptit chuyển này đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật. Đối với các trình tự hướng đích lục lạp, thuật ngữ “liên kết có thể điều khiển được” có nghĩa là trình tự axit nucleic mã hóa peptit chuyển (nghĩa là trình tự hướng đích lục lạp) được liên kết với polynucleotit AHASL1 của sáng chế sao cho hai trình tự là liên tiếp và trong cùng một khung đọc. Tham khảo, ví dụ, Von Heijne và các đồng tác giả (1991) *Plant Mol. Biol. Rep.* 9:104-126; Clark và các đồng tác giả (1989) *J Biol. Chem.* 264:17544-17550; Della-Cioppa và các đồng tác giả (1987) *Plant Physiol.* 84:965-968; Romer và các đồng tác giả (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 196:1414-1421; và Shah đồng tác giả (1986) *Science* 233:478-481. Khi các protein AHASL1 theo sáng chế này bao gồm peptit chuyển lục lạp nguyên bản, bất kỳ peptit chuyển lục lạp đã biết đều có thể được kết nối với trình tự axit amin của protein AHASL1 trưởng thành theo sáng chế bằng cách liên kết có thể điều khiển được một trình tự đích lục lạp với đầu 5' của trình tự nucleotit mã hóa protein AHASL1 trưởng thành theo sáng chế.

Các trình tự đích lục lạp đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật và bao gồm lục lạp cấu trúc tiểu phần lớn loại nhỏ của ribuloso-1,5-bisphosphat carboxylaza (Rubisco) (de Castro Silva Filho và các đồng tác giả (1996) *Plant Mol. Biol.* 30:769-780; Schnell và các đồng tác giả (1991) *J Biol. Chem.* 266(5):3335-3342); 5-(enolpyruvyl)shikimat-3-phosphat synthaza (EPSPS) (Archer và các đồng tác giả (1990) *J Bioenerg. Biomemb.* 22(6):789-810); tryptophan synthaza (Zhao và các đồng tác giả (1995) *J Biol. Chem.* 270(11):6081-6087); plastoxyanin (Lawrence và các đồng tác giả (1997) *J. Biol. Chem.* 272(33):20357-20363); chorismat synthaza (Schmidt và các đồng tác giả (1993) *J Biol. Chem.* 268(36):27447-27457); và protein liên kết a/b chất diệp lục hấp thụ ánh sáng (LHBP) (Lamppa và các đồng tác giả (1988) *J Biol. Chem.* 263:14996-14999). Cũng xem Von Heijne và các đồng tác giả (1991) *Plant Mol. Biol. Rep.* 9:104-126; Clark và các

đồng tác giả (1989) J. Biol. Chem. 264:17544-17550; Della-Cioppa và các đồng tác giả (1987) Plant Physiol. 84:965-968; Romer và các đồng tác giả (1993) Biochem. Biophys. Res. Commun. 196:1414-1421; và Shah và các đồng tác giả (1986) Science 233:478-481.

Các phương pháp biến đổi lục lạp đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật. Tham khảo, ví dụ, Svab và các đồng tác giả (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:8526-8530; Svab và Maliga (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:913-917; Svab và Maliga (1993) EMBO J. 12:601-606. Các phương pháp này dựa trên việc vận chuyển bản súng hạt ADN chứa các phần tử đánh dấu lựa chọn được và hướng ADN đến hệ gen plastit thông qua việc tái tổ hợp đồng đẳng. Thêm vào đó, việc biến đổi plastit có thể được thực hiện bằng cách hoạt hóa biến đổi gen sinh plastit cầm bằng biểu hiện ái mô của ARN polymeraza hướng plastit và mã hóa nhân. Hệ thống này đã được đề cập đến trong McBride và các đồng tác giả (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:7301-7305.

Các axit nucleic mong muốn cũng có thể được hướng lục lạp để tối ưu hóa việc biểu hiện trong lục lạp để tạo ra những khác biệt trong codon sử dụng giữa nhân tế bào thực vật và cơ quan tử này. Theo cách này, các axit nucleic mong muốn có thể được tổng hợp bằng cách sử dụng các codon ái lục lạp. Tham khảo, ví dụ, Patent Mỹ số 5380831, được sử dụng ở đây để tham chiếu.

Như được trình bày ở đây, các trình tự nucleotit AHASL1 theo sáng chế có thể được sử dụng để tăng cường khả năng chống chịu với thuốc diệt cỏ của cây trồng có hệ gen chứa gen mã hóa protein AHASL1 chống chịu với thuốc diệt cỏ. Gen này có thể là gen nội sinh hoặc là gen biến nạp. Thêm vào đó, trong các phương án nhất định, các trình tự axit nucleic theo sáng chế này có thể được sắp xếp kết hợp với các trình tự polynucleotit mong muốn để tạo ra cây trồng với kiểu hình mong muốn. Ví dụ, các polynucleotit theo sáng chế này có thể được sắp xếp với các polynucleotit khác mã hóa các polypeptit có hoạt tính trừ dịch hại và/hoặc diệt côn trùng, như là, ví dụ, protein độc tính *Bacillus thuringiensis* (được mô tả trong các patent Mỹ số US. 5366892; 5747450; 5737514; 5723756; 5,593,881; và Geiser và các đồng tác giả (1986) Gene 48:109). Sự kết hợp được tạo ra cũng có thể bao gồm nhiều bản sao của polynucleotit bất kỳ trong số các polynucleotit mong muốn.

Phải thừa nhận rằng, với các trình tự nucleotit này, các cấu trúc đối nghĩa, bổ sung cho ít nhất một phần của ARN thông tin (mARN) sao cho các trình tự polynucleotit AHASL1 có thể được kiến tạo. Các nucleotit đối nghĩa được kiến tạo để lai tạo với mARN tương ứng. Việc biến đổi các trình tự đối nghĩa có thể được thực hiện với điều kiện các trình tự lai tạo và tương tác với sự biểu hiện của mARN tương ứng. Theo cách này, các cấu trúc đối nghĩa có độ trùng lặp chuỗi ít nhất là 70%, tốt hơn là 80%, tốt hơn nữa là 85% với các trình tự đối nghĩa tương ứng có thể được sử dụng. Thêm vào đó, các phần của các nucleotit đối nghĩa có thể được sử dụng để phá vỡ biểu hiện của gen đích. Thông thường, các trình tự bao gồm ít nhất 50 nucleotit, 100 nucleotit, 200 nucleotit, hoặc nhiều hơn có thể được sử dụng.

Các trình tự nucleotit theo sáng chế này cũng có thể được sử dụng trong việc định hướng có nghĩa để ngăn chặn việc biểu hiện của gen nội sinh của cây trồng. Các phương pháp ngăn chặn việc biểu hiện gen trong cây trồng bằng cách sử dụng các trình tự nucleotit trong việc định hướng có nghĩa đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật. Các phương pháp thông thường bao gồm việc biến nạp vào cây trồng với một cấu trúc ADN chứa một promotor điều chỉnh việc biểu hiện ở cây trồng được liên kết có thể điều khiển được với ít nhất một phần của trình tự nucleotit tương ứng với việc sao chép của gen nội sinh. Điển hình là, trình tự nucleotit này có độ trùng lặp chuỗi cơ bản với trình tự sao chép của gen nội sinh, tốt hơn là có độ trùng lặp chuỗi lớn hơn khoảng 65%, tốt hơn là có độ trùng lặp chuỗi lớn hơn khoảng 85%, tốt nhất là có độ trùng lặp chuỗi lớn hơn khoảng 95%. Tham khảo các Patent Mỹ số US 5283184 và 5034323; được sử dụng ở đây để tham chiếu.

Trong khi các polynucleotit chịu thuốc diệt cỏ theo sáng chế có thể được sử dụng như là các gen đánh dấu lựa chọn để biến nạp vào cây trồng, các catxet biểu hiện của sáng chế có thể bao gồm gen đánh dấu lựa chọn để lựa chọn các tế bào được biến nạp. Các gen đánh dấu lựa chọn, bao gồm các gen đánh dấu lựa chọn theo sáng chế này, được sử dụng để lựa chọn các tế bào hoặc mô đã được biến nạp. Các gen đánh dấu, bao gồm, nhưng không giới hạn đối với các gen mã hóa khả năng chống chịu thuốc kháng sinh, như là các gen mã hóa neomycin phosphotransferaza II (NEO) và hygromycin phosphotransferaza (HPT), cũng như các gen sinh khả năng chịu đựng các hợp chất diệt cỏ như là glufosinat

ammoni, bromoxynil, imidazolinon, và 2,4-diclophenoxyaxetat (2,4-D). Tham khảo, Yarranton (1992) *Curr. Opin. Biotech.* 3:506-511; Christopherson và các đồng tác giả (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:6314-6318; Yao và các đồng tác giả (1992) *Cell* 71:63-72; Reznikoff (1992) *Mol. Microbiol.* 6:2419-2422; Barkley và các đồng tác giả (1980) in *The Operon*, pp. 177- 220; Hu và các đồng tác giả (1987) *Cell* 48:555-566; Brown và các đồng tác giả (1987) *Cell* 49:603-612; Figge và các đồng tác giả (1988) *Cell* 52:713-722; Deuschle và các đồng tác giả (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:5400-5404; Fuerst và các đồng tác giả (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:2549-2553; Deuschle và các đồng tác giả (1990) *Science* 248:480-483; Gossen (1993) Ph.D. Thesis, University of Heidelberg; Reines và các đồng tác giả (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:1917-1921; Labow và các đồng tác giả (1990) *Mol. Cell. Biol.* 10:3343-3356; Zambretti và các đồng tác giả (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:3952-3956; Bairn và các đồng tác giả (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:5072-5076; Wyborski và các đồng tác giả (1991) *Nucleic Acids Res.* 19:4647-4653; Hillenand-Wissman (1989) *Topics Mol. Struct. Biol.* 10:143-162; Degenkolb và các đồng tác giả (1991) *Antimicrob. Agents Chemother.* 35:1591-1595; Kleinschmidt và các đồng tác giả (1988) *Biochemistry* 27:1094-1104; Bonin (1993) Ph.D. Thesis, University of Heidelberg; Gossen và các đồng tác giả (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:5547-5551; Oliva và các đồng tác giả (1992) *Antimicrob. Agents Chemother.* 36:913-919; Hlavka và các đồng tác giả (1985) *Handbook of Experimental Pharmacology*, chương 78 (Springer- Verlag, Berlin); Gill và các đồng tác giả (1988) *Nature* 334:721-724. Các tài liệu này được sử dụng ở đây để tham khảo.

Danh sách các gen đánh dấu lựa chọn trên đây không nhằm mục đích để giới hạn. Bất kỳ gen đánh dấu lựa chọn nào đều có thể được sử dụng theo sáng chế này. Các phân tử polynucleotit được phân lập bao gồm trình tự nucleotit mã hóa các protein AHASL1 theo sáng chế có thể được sử dụng trong các vector để biến nạp vào cây trồng sao cho cây trồng được tạo ra có khả năng chịu đựng tăng cường đối với thuốc diệt cỏ, đặc biệt là thuốc diệt cỏ imidazolinon. Các phân tử polynucleotit AHASL1 được phân lập theo sáng chế này có thể được sử dụng trong chỉ trong các vector hoặc kết hợp với trình tự nucleotit mã hóa cấu trúc siêu phân tử loại nhỏ của enzym AHAS (AHASS) trong việc tạo ra khả

năng chịu thuốc diệt cỏ ở cây trồng. Tham khảo patent Mỹ số US 6348643 được sử dụng ở đây để tham chiếu.

Sáng chế này cũng đề cập đến vector biểu hiện bao gồm một promoter điều chỉnh sự biểu hiện ở cây trồng được liên kết có thể điều khiển được với một phân tử polynucleotit được phân lập theo sáng chế. Phân tử polynucleotit được phân lập bao gồm một trình tự nucleotit mã hóa protein AHASL1, đặc biệt là protein AHASL1 bao gồm một trình tự amin được nêu trong SEQ ID số: 2, hoặc một mảnh chức năng hoặc biến thể của nó. Vector biểu hiện ở cây trồng theo sáng chế này không phụ thuộc vào một promoter cụ thể, chỉ là một promoter có khả năng điều chỉnh việc biểu hiện gen ở tế bào thực vật. Các promoter được ưu tiên là các promoter liên tiếp và các promoter ái mô.

Các vector biến nạp theo sáng chế này có thể được sử dụng để tạo ra các cây trồng được biến nạp với một gen mong muốn. Vector biến nạp bao gồm một gen đánh dấu lựa chọn theo sáng chế và một gen mong muốn cần được cấy ghép và biểu hiện điển hình trong cây trồng được biến nạp. gen đánh dấu lựa chọn như vậy bao gồm một polynucleotit AHASL1 chịu thuốc diệt cỏ theo sáng chế được liên kết có thể điều khiển được với một promoter điều chỉnh việc biểu hiện trong tế bào chủ. Để sử dụng ở cây trồng và tế bào thực vật, vector biến nạp bao gồm một gen đánh dấu lựa chọn chứa một polynucleotit AHASL1 chịu thuốc diệt cỏ theo sáng chế được liên kết có thể điều khiển được với một promoter điều chỉnh sự biểu hiện ở tế bào thực vật. Các gen mong muốn theo sáng chế này thay đổi phụ thuộc vào đầu ra mong muốn.

Ví dụ, các thay đổi khác nhau về kiểu hình mong muốn bao gồm việc biến đổi chế phẩm axit béo ở cây trồng, biến đổi thành phần của axit amin ở cây trồng, biến đổi cơ chế kháng lại bệnh thực vật và/hoặc côn trùng gây hại cho cây trồng và tương tự. Các kết quả này có thể đạt được bằng cách cho biểu hiện các sản phẩm tương đồng hoặc biểu hiện tăng cường các sản phẩm nội sinh ở cây trồng. Theo một sự lựa chọn khác, các kết quả này có thể đạt được bằng cách giảm mức biểu hiện của một hoặc nhiều sản phẩm nội sinh, cụ thể là các enzym hoặc các đồng nhân tố trong cây trồng. Điều này tạo ra sự thay đổi kiểu hình của cây trồng biến nạp.

Theo một phương án của sáng chế, các gen mong muốn chứa các gen chịu đựng côn trùng như là, ví dụ các gen protein độc tính *Bacillus thuringiensis* (các tài liệu Patent

Mỹ số US 5366892; 5747450; 5736514; 5723756; 5593881; và Geiser và các đồng tác giả (1986) Gene 48:109).

Các protein hoặc các polypeptit AHASL1 theo sáng chế có thể được lọc từ, ví dụ, các cây lúa và có thể được sử dụng trong các chế phẩm. Cũng vậy, phân tử polypeptit được phân lập mã hóa protein AHASL1 theo sáng chế có thể được sử dụng để biểu hiện protein AHASL1 theo sáng chế trong vi khuẩn như là E.Coli hoặc men. Protein AHASL1 được biểu hiện có thể được lọc từ phần chiết của E.Coli hoặc men bằng bất kỳ phương pháp nào đã được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này biết đến.

Sáng chế này cũng đề cập đến phương pháp tạo ra thực vật chuyển gen chịu được thuốc diệt cỏ, bao gồm việc biến nạp vào cây trồng với một vector biểu hiện ở cây trồng bao gồm một promoter điều chỉnh việc biểu hiện ở cây trồng được liên kết có thể điều khiển được với một phân tử polynucleotit được phân lập theo sáng chế. Phân tử polynucleotit được phân lập bao gồm một trình tự nucleotit mã hóa protein AHASL1 theo sáng chế, cụ thể là protein AHASL1 bao gồm: một trình tự amin được nêu trong SEQ ID số: 2, một trình tự axit amin được mã hóa bởi SEQ ID số: 1 hoặc 3, hoặc một mảnh chức năng và biến thể của các trình tự axit amin nêu trên. Sáng chế này cũng đề cập đến các cây lúa không được chuyển gen, thực vật chuyển gen được tạo ra bằng phương pháp theo sáng chế, và các thế hệ tiếp theo của nó, các cây trồng này biểu hiện khả năng chịu đựng tăng cường đối với thuốc diệt cỏ tương tác với enzyme AHAS, cụ thể là thuốc diệt cỏ imidazolinon và sulfonylurea. Các polynucleotit AHASL1 theo sáng chế, cụ thể là các polynucleotit mã hóa các protein AHASL1 khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ, được ứng dụng trong các phương pháp tăng cường khả năng chống chịu với thuốc diệt cỏ ở cây trồng. Theo một phương án của sáng chế, cây trồng chống chịu với thuốc diệt cỏ bao gồm một protein AHASL1 chịu thuốc diệt cỏ hoặc bảo hòa với thuốc diệt cỏ. Các cây trồng bảo hòa với thuốc diệt cỏ bao gồm cả các cây trồng được biến nạp với các trình tự nucleotit AHASL1 chống chịu với thuốc diệt cỏ và các cây trồng có bộ gen có chứa gen nội sinh mã hóa protein AHASL1 chống chịu với thuốc diệt cỏ. Các trình tự nucleotit mã hóa các protein AHASL1 chống chịu với thuốc diệt cỏ và các cây trồng chống chịu với thuốc diệt cỏ chứa một gen nội sinh mã hóa protein AHASL1 chống chịu với thuốc diệt cỏ bao gồm các polynucleotit và các cây trồng theo sáng chế này và các cây trồng đã được

người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này biết đến. Tham khảo, ví dụ, các patent Mỹ số US 5013659, 5731180, 5767361, 5545822, 5736629, 5773703, 5773704, 5952553 và 6274796; các tài liệu này đều được sử dụng ở đây để tham chiếu. Các phương pháp tăng cường khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ của cây trồng chống chịu với thuốc diệt cỏ bao gồm việc biến nạp vào cây trồng chống chịu với thuốc diệt cỏ với ít nhất một cấu trúc polynucleotit chứa một promotor điều chỉnh sự biểu hiện ở tế bào thực vật liên kết có thể điều khiển được với một polynucleotit AHAS11 chịu thuốc diệt cỏ theo sáng chế, đặc biệt là polynucleotit mã hóa protein AHASL1 chịu thuốc diệt cỏ được nêu trong SEQ ID số: 1 hoặc 3 các polynucleotit mã hóa trình tự axit amin được đặt ký hiệu là SEQ ID số: 2, và các mảnh và các biến thể của polynucleotit mã hóa các polypeptit chứa hoạt tính AHAS chịu thuốc diệt cỏ.

Nhiều vector biến nạp vào cây trồng và các phương pháp biến nạp vào cây trồng đã biết. Tham khảo, ví dụ, An, G. và các đồng tác giả (1986) *Plant Physiol.*, 81:301-305; Fry, J. và các đồng tác giả (1987) *Plant Cell Rep.* 6:321-325; Block, M. (1988) *Theor. Appl. Genet.* 6:767-774; Hinchey, và các đồng tác giả (1990) *Stadler. Genet. Symp.* 203:212-212; Cousins, và các đồng tác giả (1991) *Aust. J. Plant Physiol.* 18:481-494; Chee, P. P. và Slightom, J. L. (1992) *Gene.* 118:255-260; Christou, và các đồng tác giả (1992) *Trends. Biotechnol.* 10:239-246; D'Halluin, và các đồng tác giả. (1992) *Bio/Technol.* 10:309-314; Dhir, và các đồng tác giả (1992) *Plant Physiol.* 99:81-88; Casas và các đồng tác giả (1993) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 90:11212-11216; Christou, P. (1993) *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*; 29P:119-124; Davies, và các đồng tác giả (1993) *Plant Cell Rep.* 12:180-183; Dong, J. A. và McHughen, A. (1993) *Plant Sci.* 91:139-148; Franklin, C. I. và Trieu, T. N. (1993) *Plant. Physiol.* 102:167; Golovkin, và các đồng tác giả (1993) *Plant Sci.* 90:41-52; Guo Chin *Sci. Bull.* 38:2072-2078; Asano, và các đồng tác giả (1994) *Plant Cell Rep.* 13; Ayeres N. M. và Park, W. D. (1994) *Crit. Rev. Plant. Sci.* 13:219-239; Barcelo, và các đồng tác giả (1994) *Plant. J.* 5:583-592; Becker, và các đồng tác giả (1994) *Plant. J.* 5:299-307; Borkowska và các đồng tác giả (1994) *Acta. Physiol. Plant.* 16:225-230; Christou, P. (1994) *Agro. Food. Ind. Hi Tech.* 5: 17-27; Eapen và các đồng tác giả (1994) *Plant Cell Rep.* 13:582-586; Hartman, và các đồng tác giả (1994) *Bio-*

Technology 12: 919923; Ritala, và các đồng tác giả (1994) Plant. MoI. Biol. 24:317-325; và Wan, Y. C. và Lemaux, P. G. (1994) Plant Physiol. 104:3748.

Các phương pháp theo sáng chế này bao gồm việc cấy ghép cấu trúc polynucleotit vào cây trồng. Thuật ngữ “cấy ghép” được sử dụng ở đây nhằm để chỉ cấu trúc polynucleotit trong cây trồng ở dạng sao cho cấu trúc có thể thâm nhập vào bên trong tế bào của cây trồng. Các phương pháp theo sáng chế không phụ thuộc vào phương pháp cấy ghép cụ thể đối với cấu trúc polynucleotit vào cây trồng nào, chỉ là cấu trúc polynucleotit có thể thâm nhập được vào ít nhất một tế bào của cây trồng. Các phương pháp cấy ghép polynucleotit vào cây trồng đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật, bao gồm, nhưng không giới hạn, phương pháp biến nạp ổn định, phương pháp biến nạp tạm thời và các phương pháp trung gian bởi virus.

Thuật ngữ “biến nạp ổn định” được dùng để chỉ cấu trúc polynucleotit được đưa vào cây trồng, cài vào bộ gen của cây trồng và có thể di truyền lại cho cây trồng thuộc các thế hệ sau. Thuật ngữ “biến nạp tạm thời” dùng để chỉ cấu trúc polynucleotit được đưa vào cây trồng và không cài vào bộ gen của cây trồng.

Để biến nạp vào cây trồng và các tế bào thực vật, các trình tự nucleotit theo sáng chế được chèn vào bằng các phương pháp đã biết vào vector bất kỳ đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật mà phù hợp để biểu hiện các trình tự nucleotit trong cây trồng hoặc trong tế bào thực vật. Việc lựa chọn các vector phụ thuộc vào kỹ thuật biến nạp được ưu tiên và giống cây trồng đích cần được biến nạp. Theo một phương án của sáng chế, trình tự nucleotit AHASL1 được liên kết có thể điều khiển được với promoter của cây trồng đã được biết đến là có mức biểu hiện cao trong tế bào thực vật và cấu trúc này sau đó được cấy ghép vào cây trồng nhạy cảm với thuốc diệt cỏ imidazolin và cây trồng biến đổi được tái sinh sản. Cây trồng biến nạp chống chịu với một mức thuốc diệt cỏ imidazolinon có thể giết chết hoặc làm tổn thương một cách đáng kể đối với cây trồng không được biến nạp. Phương pháp này có thể được áp dụng trên bất kỳ giống cây trồng nào, tuy nhiên, thuận lợi nhất là áp dụng đối với cây trồng mùa vụ, đặc biệt là các loại cây trồng mùa vụ ngày sinh trưởng trong điều kiện chịu sự tác dụng của ít nhất một loại thuốc diệt cỏ, đặc biệt là thuốc diệt cỏ imidazolinon.

Hệ phương pháp để xây dựng catxet biểu hiện ở cây trồng và cấy ghép các axit nucleic bên ngoài vào trong cây trồng đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật và đã được các tài liệu trước đây mô tả. Ví dụ, ADN ngoài có thể được cấy ghép vào trong cây trồng bằng cách sử dụng vectơ plasmit sinh u bướu (Ti). Các phương pháp khác được sử dụng để cấy ghép ADN ngoài liên quan đến việc ứng dụng việc biến đổi chất diệt lục trung hoà PEG, thẩm thấu điện, kim vi chích và các kỹ thuật bắn phá siêu nhỏ để nhận ADN. Các phương pháp này đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật. (Từ Patent Mỹ số US 5405765 đến Vasil và các đồng tác giả; Bilang và các đồng tác giả (1991) *Gene* 100: 247-250; Scheid và các đồng tác giả, (1991) *Mol. Gen. Genet.*, 228: 104-112; Guerche và các đồng tác giả, (1987) *Plant Science* 52: 111-116; Neuhauser và các đồng tác giả, (1987) *Theor. Appl. Genet.* 75: 30-36; Klein và các đồng tác giả, (1987) *Nature* 327: 70-73; Howell và các đồng tác giả, (1980) *Science* 208:1265; Horsch và các đồng tác giả, (1985) *Science* 227: 1229-1231; DeBlock và các đồng tác giả, (1989) *Plant Physiology* 91: 694-701; *Methods for Plant Molecular Biology* (Weissbach và Weissbach, eds.) Academic Press, Inc. (1988) and *Methods in Plant Molecular Biology* (Schuler và Zielinski, eds.) Academic Press, Inc. (1989). Phương pháp biến nạp phụ thuộc vào tế bào thực vật cần được biến nạp, độ ổn định của các vectơ được sử dụng, mức biểu hiện của sản phẩm gen và các thông số khác. Các phương pháp phù hợp khác để cấy ghép trình tự nucleotit vào tế bào thực vật và cấy ghép tiếp theo vào hệ gen của cây trồng bao gồm việc vi chích như Crossway và các đồng tác giả (1986) *Biotechniques* 4:320-334, thẩm thấu điện như được mô tả bởi Riggs và các đồng tác giả (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:5602-5606, Việc biến đổi trung hoà vi khuẩn nông nghiệp như được mô tả bởi Townsend và các đồng tác giả, Patent Mỹ số 5563055, Zhao và các đồng tác giả, Patent Mỹ số US 5981840, chuyển hóa gen trực tiếp như được mô tả bởi Paszkowski và các đồng tác giả (1984) *EMBO J* 3:2717-2722, và thúc đẩy bắn phá hạt như được mô tả trong, ví dụ Sanford và các đồng tác giả, Patent Mỹ số US 4945050; Tomes và các đồng tác giả, Patent Mỹ số US 5879918; Tomes và các đồng tác giả, Patent Mỹ số 5886244; Bidney và các đồng tác giả, Patent Mỹ số US 5932782; Tomes và các đồng tác giả (1995) "Direct DNA Transfer into Intact Plant Cells via Microprojectile Bombardment," in *plant cell, tissue and organ culture: Fundamental Methods*, Gamborg và Phillips (Springer- Verlag, Berlin); McCabe

và các đồng tác giả (1988) *Biotechnology* 6:923-926); và biến nạp Lec1 (WO 00/28058). Cũng có thể tham khảo, Weissinger và các đồng tác giả (1988) *Ann. Rev. Genet.* 22:421-477; Sanford và các đồng tác giả (1987) *Particulate Science and Technology* 5:27-37 (cây hành); Christou và các đồng tác giả (1988) *Plant Physiol.* 87:671-674 (cây đậu tương); McCabe và các đồng tác giả (1988) *Bio/Technology* 6:923-926 (cây đậu tương); Finer và McMullen (1991) *In Vitro Cell Dev. Biol.* 27P:175-182 (cây đậu tương); Singh và các đồng tác giả (1998) *Theor. Appl. Genet.* 96:319-324 (cây đậu tương); Datta và các đồng tác giả (1990) *Biotechnology* 8:736-740 (cây lúa); Klein và các đồng tác giả (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:4305-4309 (cây ngô); Klein và các đồng tác giả (1988) *Biotechnology* 6:559-563 (cây ngô); Tomes, U.S. Patent No. 5,240,855; Buising và các đồng tác giả Patent Mỹ số 5322783 và 5324646; Tomes và các đồng tác giả (1995) "Direct DNA Transfer into Intact Plant Cells via Microprojectile Bombardment," in *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture: Fundamental Methods*, ed. Gamborg (Springer-Verlag, Berlin) (cây ngô); Klein và các đồng tác giả (1988) *Plant Physiol.* 91:440-444 (cây ngô); Fromm và các đồng tác giả (1990) *Biotechnology* 8:833-839 (cây ngô); Hooykaas-Van Slogteren và các đồng tác giả (1984) *Nature (London)* 311 :763-764; Bowen và các đồng tác giả Patent Mỹ số 5736369 (cây ngũ cốc); Bytebier và các đồng tác giả (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:5345-5349 (cây huệ tây); De Wet và các đồng tác giả (1985) in *The Experimental Manipulation of Ovule Tissues*, ed. Chapman và các đồng tác giả (Longman, New York), pp. 197-209 (phấn hoa); Kaeppeler và các đồng tác giả (1990) *Plant Cell Reports* 9:415-418 và Kaeppeler và các đồng tác giả (1992) *Theor. Appl. Genet.* 84:560-566 (biến nạp nhờ trung gian whisker); DHalluin và các đồng tác giả (1992) *Plant Cell* 4:1495-1505 (electroporation); Li và các đồng tác giả (1993) *Plant Cell Reports* 12:250- 255 và Christou và Ford (1995) *Annals of Botany* 75:407-413 (rice); Osjoda và các đồng tác giả (1996) *Nature Biotechnology* 14:745-750 (cây ngô thông qua *Agrobacterium tumefaciens*); các tài liệu này được sử dụng ở đây để tham chiếu.

Các polynucleotit theo sáng chế có thể được cấy ghép vào cây trồng bằng cách cho cây trồng tiếp xúc với axit nucleic của virus. Thông thường, các phương pháp như vậy kết hợp một cấu trúc polynucleotit theo sáng chế với một phân tử ARN hoặc ADN trong ống nghiệm. Cần phải thừa nhận rằng, protein AHASL1 theo sáng chế có thể được bắt đầu

tổng hợp như là một phần của polyprotein virus, sau đó có thể được xử lý bằng cách phân giải protein virus để sản xuất ra protein tái tổ hợp mong muốn. Hơn nữa, phải thừa nhận rằng các promoter theo sáng chế cũng bao gồm các promoter được sử dụng để sao chép bằng polymeraza ARN virus. Các phương pháp cấy ghép các cấu trúc polynucleotit vào trong cây trồng và biểu hiện một protein được mã hóa bên trong, liên quan đến phân tử ADN và ARN của virus đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật. Tham khảo, ví dụ, Patent Mỹ số 5889191, 5889190, 5866785, 5589367 và 5316931; được sử dụng ở đây để tham chiếu.

Các tế bào đã được biến nạp có thể sinh trưởng được trong cây trồng theo cách thông thường. Tham khảo, ví dụ, McCormick và các đồng tác giả (1986) *Plant Cell Reports* 5:81-84. Các cây trồng này sau đó có thể phát triển, được cho thụ phấn với cùng dòng đã được biến nạp hoặc với các dòng khác và con lai có biểu hiện tiếp theo của các đặc điểm kiểu hình mong muốn được xác định. Hai hay nhiều thế hệ có thể sinh trưởng để đảm bảo rằng việc biểu hiện đặc điểm kiểu hình mong muốn được duy trì ổn định và được di truyền và sau đó các hạt được thu hoạch để chắc chắn đã thu được đặc điểm kiểu hình mong muốn. Theo cách này, sáng chế đề cập đến các hạt được biến nạp (sau đây được gọi là “hạt biến đổi gen”) có cấu trúc polynucleotit theo sáng chế, ví dụ, catxet biểu hiện theo sáng chế, được kết hợp ổn định trong bộ gen của chúng.

Sáng chế này cũng có thể được sử dụng để biến đổi bất kỳ giống cây trồng nào, bao gồm, nhưng không hạn chế, cây một lá mầm và cây hai lá mầm. Ví dụ về các giống cây trồng mong muốn, bao gồm, nhưng không giới hạn, cây bắp hoặc cây ngô (*Zea mays*), giống cây cải *Brassica* sp. (ví dụ, cải dầu, cải bẹ trắng, cải bẹ xanh), đặc biệt là các giống cải được sử dụng để lấy tinh dầu, cỏ linh lăng (*Medicago sativa*), cây lúa (*Oryza sativa*), lúa mạch đen (*Secale cereale*), cây lúa miến (*Sorghum bicolor*, *Sorghum vulgare*), cây kê (ví dụ, cây kê ngọc trai (*Pennisetum glaucum*), kê proso (*Panicum miliaceum*), cây kê đuôi cáo (*Setaria italica*), cây kê ngón tay (*Eleusine coracana*), cây hoa hướng dương (*Helianthus annuus*), cây rum (*Carthamus tinctorius*), cây lúa mì (*Triticum aestivum*, *T. Turgidum* ssp. *durum*), cây đậu nành (*Glycine max*), cây thuốc lá (*Nicotiana tabacum*), cây khoai tây (*Solanum tuberosum*), cây lạc (*Arachis hypogaea*), cây bông (*Gossypium barbadense*, *Gossypium hirsutum*), cây khoai lang (*Ipomoea*

batatus), cây sắn (*Manihot esculenta*), cây cà phê (*Coffea* spp.), cây dừa (*Cocos nucifera*), cây dứa (*Ananas comosus*), cây thuộc họ cam quýt (*Citrus* spp.), cây ca cao (*Theobroma cacao*), cây chè (*Camellia sinensis*), cây chuối (*Musa* spp.), cây lê tàu (*Persea americana*), cây vả (*Ficus casica*), cây ổi (*Psidium guajava*), cây xoài (*Mangifera indica*), cây ôliu (*Olea europaea*), cây đu đủ (*Carica papaya*), cây đào lộn hột (*Anacardium occidentale*), mac-ca (*Macadamia integrifolia*), quả hạnh (*Prunus amygdalus*), củ cải đường (*Beta vulgaris*), cây mía đường (*Saccharum* spp.), cây yến mạch, cây lúa mạch, các loại rau, cây cảnh, và cây thuộc họ thông. Tốt hơn là, các cây trồng theo sáng chế này là các cây mùa vụ (ví dụ, hoa hướng dương, các loại cây cải, cây bông, củ cải đường, đậu tương, đậu phộng, cây cỏ linh lăng, cây rum, cây thuốc lá, cây ngô, cây lúa, cây lúa mì, lúa mạch đen, yến mạch, barley tritcale, cây lúa miến, cây kê, v.v.).

Các cây trồng chịu thuốc diệt cỏ theo sáng chế này có thể được ứng dụng trong các phương pháp phòng trừ cỏ dại. Do vậy, sáng chế này còn đề cập đến phương pháp phòng trừ cỏ dại ở các vùng lân cận cây trồng chịu thuốc diệt cỏ theo sáng chế. Phương pháp bao gồm việc phun một lượng hữu hiệu thuốc diệt cỏ lên cỏ dại và lên cây trồng chịu thuốc diệt cỏ, trong đó khả năng chịu đựng đối với ít nhất một loại thuốc diệt cỏ, cụ thể là thuốc diệt cỏ imidazolinon hoặc sulfonyleurea của cây trồng đã được tăng cường hơn so với các cây trồng kiểu dại, trong phương pháp phòng trừ cỏ dại này, cây trồng chịu thuốc diệt cỏ theo sáng chế được ưu tiên là các cây trồng theo mùa vụ, bao gồm, nhưng không giới hạn, cây lúa, cây hoa hướng dương, cây cỏ linh lăng, các giống cải, cây đậu tương, cây rum, cây lạc, cây thuốc lá, cây cà chua, cây khoai tây, cây lúa mì, cây ngô, cây lúa miến, cây lúa mạch đen, yến mạch, cây kê và cây lúa miến.

Nhờ có các loại cây trồng có khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ được tăng cường, đặc biệt là đối với các loại thuốc diệt cỏ imidazolinon và sulfonyleurea, nhiều loại hợp phần có thể được sử dụng để bảo vệ cây trồng khỏi sự tấn công của cỏ dại để thúc đẩy cây trồng phát triển và giảm sự cạnh tranh về nguồn dinh dưỡng. Thuốc diệt cỏ có thể được phun trước khi nảy mầm, sau khi nảy mầm, trước khi gieo trồng và khi gieo trồng để phòng trừ cỏ dại ở khu vực xung quanh các cây trồng như được mô tả ở đây hoặc thuốc diệt cỏ imidazolinon có thể được sử dụng bao gồm các chất phụ gia khác. Thuốc diệt cỏ

cũng có thể được sử dụng để xử lý hạt giống. Các chất phụ gia được tìm thấy trong hợp phần thuốc diệt cỏ imidazolinon hoặc sulfonyleurea chứa các thuốc diệt cỏ khác, thuốc tẩy, tá dược, chất làm phân tán, chất kết dính, chất làm ổn định hoặc tương tự. Hợp phần thuốc diệt cỏ có thể là hợp phần ướt hoặc khô và có thể chứa, nhưng không giới hạn, bột có thể chảy được, chất cô đặc nhũ hóa và thể cô đặc lỏng. Thuốc diệt cỏ và các hợp phần thuốc diệt cỏ có thể được sử dụng theo các phương pháp thông thường, ví dụ, bằng cách phun, tưới, phun bụi hoặc tương tự.

Sáng chế đề xuất các hạt giống không được chuyển gen và hạt giống được chuyển gen có khả năng chống chịu cao đối với ít nhất một thuốc diệt cỏ, đặc biệt là thuốc diệt cỏ ức chế AHAS, đặc biệt hơn nữa là thuốc diệt cỏ imidazolinon. Các hạt giống này bao gồm, ví dụ, các hạt lúa không được chuyển gen có các đặc tính chống chịu với thuốc diệt cỏ của cây lúa có số hiệu truy nhập là NCIMB 41262, và các hạt giống có chứa các phân tử axit nucleic theo sáng chế mã hóa protein IMI. Sáng chế này đề cập đến các phương pháp sản xuất các cây trồng chịu thuốc diệt cỏ, bằng con đường sinh sản hữu tính thông thường. Phương pháp bao gồm việc cho cây thứ nhất có khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ lai chéo với cây thứ hai không có khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ. Cây trồng thứ nhất có thể là cây trồng bất kỳ chịu thuốc diệt cỏ theo sáng chế, bao gồm, ví dụ, thực vật chuyển gen có chứa ít nhất một polynucleotit theo sáng chế mã hóa protein IMI chịu thuốc diệt cỏ và cây lúa không được chuyển gen chứa các đặc tính chống chịu với thuốc diệt cỏ của cây lúa có mã số truy nhập NCIMB là NCDVIB 41262. Cây trồng thứ hai có thể là cây trồng bất kỳ có khả năng tạo ra các cây trồng thuộc thế hệ sau có thể tồn tại độc lập (nghĩa là các hạt) khi được lai chéo với cây trồng thứ nhất. Điển hình là, nhưng không nhất thiết cây trồng thứ nhất và cây trồng thứ hai phải cùng thuộc một giống. Các phương pháp theo sáng chế có thể bao gồm thêm một hoặc nhiều thế hệ của các cây trồng sinh ra sau khi lai chéo lần đầu với một cây trồng thuộc cùng dòng hoặc kiểu di truyền của cả cây trồng thứ nhất và cây trồng thứ hai. Theo một sự lựa chọn khác, thế hệ cây con sau lần lai chéo thứ nhất hoặc của bất kỳ lần lai chéo bổ sung nào đều có thể lai chéo với cây trồng thứ ba thuộc một dòng khác hoặc kiểu di truyền khác so với cây trồng thứ nhất và cây trồng thứ hai. Các phương pháp theo sáng chế cũng có thể liên quan đến việc lựa chọn cây trồng có các đặc tính chống chịu với thuốc diệt cỏ của cây trồng thứ nhất.

Sáng chế này cũng đề cập đến phương pháp tăng cường khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ của cây trồng, đặc biệt là cây lúa có khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ, thông qua phương pháp sinh sản hữu tính. Các phương pháp bao gồm cho cây trồng thứ nhất có khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ lai chéo với cây trồng thứ hai có thể có hoặc không có khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ hoặc có thể chịu được loại thuốc diệt cỏ hoặc các loại thuốc diệt cỏ khác so với cây trồng thứ nhất. Cây trồng thứ nhất có thể là cây trồng chịu thuốc diệt cỏ bất kỳ theo sáng chế này, bao gồm, ví dụ, thực vật chuyển gen bao gồm ít nhất một trong các axit nucleic IMI theo sáng chế mã hóa protein DVII và các cây lúa không được chuyển gen có chứa các đặc tính bảo hòa với thuốc diệt cỏ của cây lúa có số truy nhập NCIMB là NCIMB 41262. Cây trồng thứ hai có thể là cây trồng bất kỳ có thể sản xuất được các cây con có khả năng có thể tồn tại độc lập (nghĩa là các hạt) khi được lai chéo với cây trồng thứ nhất. Điển hình là, nhưng không nhất thiết, cây trồng thứ nhất và cây trồng thứ hai phải thuộc cùng một giống. Cây trồng thuộc hệ sau được sản xuất bằng phương pháp theo sáng chế này có khả năng chịu đựng tăng cường hơn đối với thuốc diệt cỏ khi so sánh với cây trồng thứ nhất hoặc cây trồng thứ hai hoặc cả hai. Khi cây trồng thứ nhất và cây trồng thứ hai chịu được các thuốc diệt cỏ khác nhau, thế hệ cây con lai sẽ có cả hai đặc tính chịu thuốc diệt cỏ của cả cây trồng thứ nhất và cây trồng thứ hai. Phương pháp của sáng chế cũng liên quan đến một hoặc nhiều thế hệ cây con lai sau lần lai thứ nhất với cây trồng cùng dòng hoặc cùng kiểu di truyền của cả cây trồng thứ nhất hoặc cây trồng thứ hai. Theo một sự lựa chọn khác, cây con sau lần lai chéo thứ nhất hoặc bất kỳ lần lai chéo bổ sung nào đều có thể lai tạo với cây trồng thứ ba thuộc dòng khác hoặc kiểu di truyền khác so với cây trồng thứ nhất và cây trồng thứ hai. Các phương pháp theo sáng chế này còn liên quan đến việc lựa chọn các cây trồng có chứa đặc tính chống chịu với thuốc diệt cỏ của cây trồng thứ nhất hoặc của cả cây trồng thứ nhất và cây trồng thứ hai. Các cây trồng theo sáng chế này có thể là cây chuyển gen hoặc cây không được chuyển gen. Ví dụ về cây lúa không được chuyển gen có khả năng chịu đựng tăng cường đối với imidazolinon là cây lúa (IMINTA 16) có mã số truy nhập NCIMB là NCDVIB 41262; hoặc một dẫn xuất đột biến, tái tổ hợp hoặc đã được biến nạp gen của cây trồng có mã số truy nhập NCDVIB là NCDVIB 41262; hoặc bất kỳ cây trồng thuộc hệ tiếp theo nào của cây trồng có mã số truy nhập NCDVIB là NCDVIB 41262; hoặc cây trồng thuộc

thể hệ tiếp theo của bất kỳ loại nào trong số các cây trồng này; hoặc cây trồng có chứa đặc tính chống chịu với thuốc diệt cỏ có mã số truy nhập NCDVIB là NCDVIB 41262.

Sáng chế này cũng đề cập đến các cây trồng, bộ phận của cây trồng, mô thực vật, tế bào thực vật, hạt giống và các tế bào chủ không phải của người được biến nạp với ít nhất một phân tử polynucleotit, catxet biểu hiện hoặc vector biến nạp theo sáng chế. Các cây trồng, bộ phận cây trồng, mô thực vật, tế bào thực vật, hạt giống hoặc các tế bào chủ không phải của người được biến nạp này đều có khả năng chống chịu hoặc chịu đựng tăng cường đối với ít nhất một loại thuốc diệt cỏ ở một mức độ mà sẽ giết chết hoặc ức chế sự sinh trưởng của các cây trồng, bộ phận cây trồng, mô thực vật, tế bào thực vật, hạt giống chưa được biến nạp một cách tương ứng. Tốt hơn là, các cây trồng, bộ phận cây trồng, mô thực vật, tế bào thực vật, hạt giống theo sáng chế này thuộc giống *Arabidopsis thaliana* và các cây trồng theo mùa vụ. Sáng chế này đề cập đến các phương pháp liên quan đến việc sử dụng ít nhất một loại thuốc diệt cỏ ức chế AHAS từ nhóm bao gồm thuốc diệt cỏ imidazolinon, thuốc diệt cỏ sulfonylurea, thuốc diệt cỏ triazolopyrimidin, thuốc diệt cỏ pyrimidinyloxybenzoat, thuốc diệt cỏ sulfonylamino-carbonyl triazolinon, và các hỗn hợp của chúng. Trong các phương pháp này, thuốc diệt cỏ ức chế AHAS có thể được sử dụng theo bất kỳ phương pháp nào đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật, bao gồm, nhưng không hạn chế đối với việc xử lý hạt giống, xử lý đất trồng và xử lý lá.

Trước khi sử dụng, thuốc diệt cỏ ức chế AHAS có thể được chuyển thành các dạng hợp phần thông thường, ví dụ các dung dịch, nhũ tương, huyền phù, bụi, bột, bột nhão và các hạt. Hình thức sử dụng phụ thuộc vào mục đích sử dụng cụ thể, trong mỗi trường hợp, cần phải đảm bảo phân bố đều các hợp chất theo sáng chế.

Các hợp phần được điều chế theo các cách đã biết (tham khảo, ví dụ, tài liệu sáng chế US 3060084, EP-A 707 445 (hoặc các thể cô đặc lỏng), Browning, "Agglomeration", Chemical Engineering, Dec. 4, 1967, 147-48, Perry's Chemical Engineer's Handbook, tập 4., McGraw-Hill, New York, 1963, các trang từ 8-57 và tương tự. WO 91/13546, US 4172714, US 4144050, US 3920442, US 5180587, US 5232701, US 5208030, GB 2095558, US 3299566, Klingman, Weed Control as a Science, John Wiley and Sons, Inc., New York, 1961, Hance và các đồng tác giả, Weed Control Handbook, tập 8, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1989 và Mollet, H., Grubemann, A., Formulation

technology, Wiley VCH Verlag GmbH, Weinheim (Germany), 2001, 2. D. A. Knowles, Chemistry and Technology of Agrochemical Formulations, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1998 (ISBN 0-7514-0443-8), ví dụ bằng cách pha loãng các hợp chất hoạt tính bằng các chất phụ gia phù hợp đối với các hợp phần hóa nông như là dung môi và/hoặc các chất mang, nếu muốn chất nhũ hóa, chất hoạt động bề mặt, chất bảo quản, chất chống tạo bọt, chất chống đông, đối với các hợp phần xử lý hạt giống, tùy ý, có thể còn có chất tạo màu và/hoặc chất kết dính và/hoặc chất tạo gel.

Ví dụ về các dung môi phù hợp là nước, dung môi thơm (ví dụ các sản phẩm Solvesso, xylen), paraffin (ví dụ chiết dầu khoáng), rượu (ví dụ rượu metanol, butanol, pentanol, benzyl), keton (ví dụ cyclohexanon, gamma-butyrolacton), pyrrolidon (NMP, NOP), axetat (glycol diacetat), glycol, dimetylamit của axit béo, axit béo và các este của axit béo. Theo nguyên tắc, hỗn hợp dung môi cũng có thể sử dụng được.

Ví dụ về các chất mang phù hợp là chất khoáng tự nhiên trong đất (ví dụ, cao lanh, đất sét, đá talc, đá phấn) và chất khoáng tổng hợp trong đất (như là silic dioxit phân tán cao, silicat).

Các chất nhũ hóa phù hợp là các chất nhũ hóa không ion và chất nhũ hóa có chứa anion (ví dụ ete của rượu béo polyoxyetylen, alkylsulfonat và arylsulfonat).

Ví dụ về chất phân tán là phần nước thải chứa lignin-sulfit và metylxenuloza.

Các chất hoạt động bề mặt phù hợp là kim loại kiềm, kim loại kiềm thổ và các muối amoni của axit lignosulfonic, axit naphtalensulfonic, axit phenolsulfonic, axit dibutylnaphtalensulfonic, alkylarylsulfonat, alkyl sulfat, alkylsulfonat, các sulfat của rượu béo, các axit béo và các ete glycol của rượu béo được sulfat hóa, hơn nữa các thể cô đặc của naphtalen được sulfat hóa và các dẫn xuất naphtalen với formaldehyt, thể cô đặc của naphtalen hoặc axit naphtalensulfonic với phenol và formaldehyt, ete của polyoxyetylen octylphenol, isooctylphenol được etoxy hóa, octylphenol, nonylphenol, các ete của alkylphenol polyglycol, các ete của tributylphenyl polyglycol, các ete của tristearylphenyl polyglycol, rượu alkylaryl polyete, rượu và thể cô đặc oxit etylen rượu béo, dầu thầu dầu được etoxy hóa, ete của polyoxyetylen alkyl, polyoxypropylene được etoxy hóa, axetal ete của rượu lauryl, este sorbitol, nước thải lignosulfit và metylxenuloza. Các chất phù hợp để điều chế dung dịch phun trực tiếp, nhũ tương, bột nhão hoặc thể phân tán trong

dầu là chiết dầu khoáng ở nhiệt độ sôi từ trung bình đến cao, như là dầu diesel hoặc dầu lửa, ngoài ra còn dầu than hắc ín, dầu có nguồn gốc thực vật hoặc động vật, hydro cacbon béo, vòng và thơm, ví dụ như toluen, xylen, parafin, tetrahydronaphtalen, naphtalen được alkyl hóa hoặc các dẫn xuất của chúng, metanol, etanol, propanol, butanol, xyclohexanol, xyclohexanon, isophoron, hoặc dung môi phân cực cao, ví dụ dimetyl sulfoxit, N-metylpyrolidon hoặc nước.

Ngoài ra còn các chất chống đông như glyxerin, etylen glycol, propylen glycol và các thuốc diệt khuẩn cũng có thể được cho thêm vào hợp phần.

Các chất chống tạo bọt như là các chất chống tạo bọt có thành phần là silicon hoặc magie stearat. Các chất bảo quản phù hợp ví dụ như là diclorophen và enzyllalkoholhemiformal.

Các hợp phần xử lý hạt giống cũng có thể chứa thêm chất kết dính và tùy ý có thể thêm chất tạo màu.

Các chất kết dính có thể được cho thêm vào để làm tăng độ dính của nguyên liệu hoạt tính trên hạt giống sau khi xử lý. Các chất kết dính phù hợp là các chất hoạt động bề mặt EO/PO copolyme khối nhưng cũng có thể là rượu polyvinyl, polyvinylpyrolidon, polyacrylat, polymetacrylat, polybuten, polyisobutylen, polystyren, polyetylenamin, polyetylenamit, polyetylenimin (Lupasol®, Polymin®), polyete, polyuretan, polyvinylaxetat, tyloza và các copolyme được phát sinh từ các polyme này. Tùy ý, các chất tạo màu cũng có thể có mặt trong hợp phần. Các chất tạo màu hoặc thuốc nhuộm phù hợp cho các hợp phần xử lý hạt giống là thuốc nhuộm đỏ Rhodamin B, C.I. 112, dung môi đỏ C.I. 1, thuốc nhuộm màu xanh dương 15:4, thuốc nhuộm màu xanh dương 15:3, thuốc nhuộm màu xanh dương 15:2, thuốc nhuộm màu xanh dương 15:1, thuốc nhuộm màu xanh dương 80, thuốc nhuộm màu vàng 1, thuốc nhuộm màu vàng 13, thuốc nhuộm màu đỏ 112, thuốc nhuộm màu đỏ 48:2, thuốc nhuộm màu đỏ 48:1, thuốc nhuộm màu đỏ 57:1, thuốc nhuộm màu đỏ 53:1, thuốc nhuộm màu cam 43, thuốc nhuộm màu cam 34, thuốc nhuộm màu cam 5, thuốc nhuộm màu xanh lá cây 36, thuốc nhuộm màu xanh lá cây 7, thuốc nhuộm màu trắng 6, thuốc nhuộm màu nâu 25, tím bazơ 10, tím bazơ 49, axit đỏ 51, axit đỏ 52, axit đỏ 14, axit xanh 9, axit vàng 23, đỏ bazơ 10, đỏ bazơ 108.

Ví dụ về chất tạo gel phù hợp là carrageen (Satiagel®).

Bột, vật liệu dễ rắc, các sản phẩm có thể phun bụi được điều chế bằng cách trộn hoặc nghiền mịn các chất hoạt tính với chất mang rắn.

Cát hạt, ví dụ các hạt được bao, các hạt được thấm hoặc các hạt tương đương có thể được điều chế bằng cách kết dính các hợp chất hoạt tính với các chất mang rắn. Ví dụ về các chất mang rắn là đất khoáng như silica gel, silicat, đá talc, cao lanh, đất sét tảo, đá vôi, vôi, đá phấn, thân cây, hoàng thổ, đất sét, dolomit, đất có nhiều tảo cát, canxi sulfat, magie sulfat, magie oxit, nguyên liệu đất tổng hợp, phân bón như là, ví dụ, amoni sulfat, amoni photphat, amoni nitrat, urê, và các sản phẩm có nguồn gốc thực vật, như là bột ngũ cốc, bột vỏ cây, bột gỗ và bột vỏ hạch, bột xenluloza và các chất mang rắn khác.

Thông thường, hợp phần chứa từ 0,01 đến 95% trọng lượng, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,1 đến 90% trọng lượng chất diệt cỏ ức chế AHAS. Trong trường hợp này, các chất diệt cỏ ức chế AHAS được sử dụng với độ tinh khiết nằm trong khoảng từ 90% đến 100% trọng lượng, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 95% đến 100% trọng lượng (theo phổ NMR). Để xử lý hạt giống, các hợp phần tương ứng có thể được pha loãng từ 2 đến 10 lần đến nồng độ trong chế phẩm đã sẵn sàng để sử dụng là nằm trong khoảng từ 0,01 đến 6% trọng lượng chất hoạt tính, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,1 đến 40% trọng lượng. Thuốc diệt cỏ ức chế AHAS có thể được sử dụng dưới dạng các hợp phần của chúng hoặc dạng sử dụng được điều chế từ đó, ví dụ ở dạng dung dịch phun trực tiếp, bột, huyền phù hoặc thể phân tán, nhũ tương, dầu phân tán, bột nhão, sản phẩm có thể rắc bụi, nguyên liệu để phân tán hoặc hạt bằng cách phun, tán nhỏ, phun bụi, phân tán hoặc tưới. Các dạng sử dụng phụ thuộc hoàn toàn vào mục đích sử dụng; điều này để đảm bảo phân tán đồng đều nhất đến mức có thể thuốc diệt cỏ ức chế AHAS theo mỗi trường hợp theo mỗi sáng chế.

Các hình thức sử dụng dạng lỏng có thể được điều chế từ nhũ tương cô đặc, bột nhão hoặc bột có thể thấm ướt (bột có thể phun được, dầu phân tán) bằng cách cho thêm nước. Để điều chế nhũ tương, bột nhão hoặc thể phân tán dầu, các chất, hoặc được pha trong dầu hoặc trong dung môi có thể được đồng nhất bằng thiết bị làm ẩm, chất làm kết dính, thể phân tán hoặc chất nhũ hóa và, nếu phù hợp, dung môi hoặc dầu và thể cô đặc như vậy là phù hợp để pha với nước.

Nồng độ chất hoạt tính trong các hợp phần đã sẵn sàng để sử dụng có thể được thay đổi trong một khoảng rất rộng. Thông thường, nồng độ chất hoạt tính nằm trong khoảng từ 0,0001 đến 10%, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,01 đến 1% trọng lượng.

Thuốc diệt cỏ ức chế AHAS cũng có thể được sử dụng thành công trong quy trình dung lượng cực thấp (ULV), cũng có thể phun các hợp phần chứa trên 95% trọng lượng hợp chất hoạt tính, hoặc thậm chí phun hợp chất hoạt tính mà không có chất phụ gia.

Sau đây là các ví dụ về các hợp phần:

1. Các sản phẩm để pha loãng với nước để phun lên lá. Để xử lý hạt giống, các sản phẩm này có thể phun lên hạt khi pha loãng hoặc không pha loãng.

A) Thể cô đặc có thể hoà tan trong nước (SL, LS)

Mười phần trọng lượng thuốc diệt cỏ ức chế AHAS được hoà tan với 90 phần trọng lượng nước hoặc dung môi hoà tan trong nước. Theo một sự lựa chọn khác, chất làm ướt hoặc các phụ gia khác có thể được cho thêm vào. Thuốc diệt cỏ ức chế AHAS được pha cho đến khi hoà tan với nước, bằng cách đó thu được hỗn hợp có nồng độ 10% trọng lượng thuốc diệt cỏ ức chế AHAS.

B) Thể cô đặc có thể phân tán được (DC)

Hai mươi phần trọng lượng thuốc diệt cỏ ức chế AHAS được hoà tan với 70 phần trọng lượng xyclohexanon thêm với 10 phần trọng lượng chất làm phân tán, ví dụ như polyvinylpyrrolidon. Pha với nước, bằng cách đó thu được hợp phần chứa 20% trọng lượng thuốc diệt cỏ ức chế AHAS.

C) Thể cô đặc có thể nhũ hóa (EC)

Mười lăm phần trọng lượng thuốc diệt cỏ ức chế AHAS được pha với 7 phần trọng lượng xylen thêm canxi dodexylbenzenesulfonat và dầu thầu dầu được etoxy hóa (trong mỗi trường hợp là 5 phần trọng lượng). Pha với nước tạo ra một nhũ tương, bằng cách đó thu được một hợp phần chứa 15% trọng lượng thuốc diệt cỏ ức chế AHAS.

D) Nhũ tương (EW, EO, ES)

Hai mươi phần trọng lượng thuốc diệt cỏ ức chế AHAS được hoà tan với 35 phần trọng lượng xylen cộng với canxi dodexylbenzenesulfonat và dầu thầu dầu etoxy hóa (trong mỗi trường hợp là 5 phần trọng lượng). Hỗn hợp này được cho vào 30 phần trọng lượng nước bằng máy tạo nhũ (ví dụ Ultraturrax) và sau đó được đưa vào một nhũ tương

đồng nhất. Pha với nước thu được một nhũ tương, bằng cách đó thu được hợp phần chứa 25% trọng lượng thuốc diệt cỏ ức chế AHAS.

E) Huyền phù (SC, OD, FS)

Trong một máy nghiền hạt khuấy, 20 phần trọng lượng thuốc diệt cỏ ức chế AHAS được tán nhỏ và thêm mười phần trọng lượng chất phân tán, chất làm ướt và 70 phần trọng lượng nước hoặc dung môi hữu cơ, thu được một huyền phù diệt cỏ ức chế AHAS mịn. Pha với nước tạo ra một nhũ tương ổn định của thuốc diệt cỏ ức chế AHAS, bằng cách đó thu được một hợp phần chứa 20% trọng lượng thuốc diệt cỏ ức chế AHAS.

F) Hạt phân tán trong nước và hạt hoà tan trong nước (WG, SG)

Năm mươi phần trọng lượng thuốc diệt cỏ ức chế AHAS được nghiền mịn, thêm vào 50 phần trọng lượng chất phân tán và chất làm ướt và được tạo thành các hạt phân tán trong nước hoặc hoà tan trong nước bằng các thiết bị kỹ thuật (ví dụ đùn, phun tháp, nền hóa lỏng). Hoà tan với nước thu được một chất phân tán ổn định hoặc dung dịch thuốc diệt cỏ ức chế AHAS, bằng cách đó thu được hợp phần chứa 50% trọng lượng thuốc diệt cỏ ức chế AHAS.

G) Bột phân tán trong nước và bột hoà tan trong nước (WP, SP, SS, WS).

Hai mươi lăm phần trọng lượng thuốc diệt cỏ ức chế AHAS được nghiền mịn trong một máy nghiền roto tĩnh, thêm vào 25 phần trọng lượng chất phân tán, chất làm ướt và silica gel. Pha với nước thu được một chất phân tán ổn định và huyền phù ổn định hoặc dung dịch thuốc diệt cỏ ức chế AHAS, bằng cách đó thu được hợp phần chứa 75% trọng lượng thuốc diệt cỏ ức chế AHAS.

I) Hợp phần gel (GF)

Trong một máy nghiền hạt khuấy, 20 phần trọng lượng thuốc diệt cỏ ức chế AHAS được nghiền nhỏ, thêm 10 phần trọng lượng chất phân tán, một phần trọng lượng chất làm ướt, chất tạo gel và 70 phần trọng lượng nước hoặc dung môi hữu cơ thu được một huyền phù thuốc diệt cỏ ức chế AHAS mịn. Pha với nước thu được một huyền phù ổn định của thuốc diệt cỏ ức chế AHAS, bằng cách đó thu được một hợp phần chứa 20% trọng lượng thuốc diệt cỏ ức chế AHAS. Hợp phần gel này ổn định để xử lý hạt giống.

2. Các sản phẩm được sử dụng không pha dùng để xử lý lá cây. Để xử lý hạt giống, các sản phẩm này có thể được áp dụng lên các hạt được pha loãng.

A) Các bột phun bụi được (DP, DS)

Năm phần trọng lượng thuốc diệt cỏ ức chế AHAS được nghiền mịn và được trộn kỹ với 95 phần trọng lượng cao lanh được chia đều. Qua đó, thu được một sản phẩm có thể phun bụi được chứa 5% trọng lượng thuốc diệt cỏ ức chế AHAS.

B) Các hạt (GR, FG, GG, MG)

Một phần hai trọng lượng thuốc diệt cỏ ức chế AHAS được nghiền mịn và kết hợp với 95,5 phần trọng lượng chất mang, bằng cách đó thu được một hợp phần chứa 0,5% thuốc diệt cỏ ức chế AHAS. Các phương pháp hiện tại là đun, phun khô hoặc nền hóa lỏng. Qua đó, có thể thu được các hạt dùng ngay không cần pha loãng để phun trên lá.

Các hợp phần xử lý hạt giống thông thường bao gồm ví dụ thể cô đặc FS có thể chảy được, dung dịch LS, bột để xử lý khô DS, bột phân tán được trong nước để xử lý bùn WS, bột có thể hoà tan trong nước SS và nhũ tương ES và EC và hợp phần gel GF. Các hợp phần này có thể phun lên hạt giống pha loãng hoặc không được pha loãng. Việc phun lên hạt có thể được tiến hành trước khi gieo, hoặc có thể phun lên trực tiếp lên hạt giống.

Theo một phương án được ưu tiên, hợp phần FS được sử dụng để xử lý hạt giống. Điển hình là, hợp phần FS có thể bao gồm từ 1-800 g/l thành phần hoạt tính, 1-200 g/l chất hoạt động bề mặt, 0 đến 200 g/l chất chống đông, 0 đến 400 g/l chất kết dính, 0 đến 200 g/l thuốc nhuộm và đến 1 lít dung môi, tốt hơn là nước.

Sáng chế này đề cập đến các hạt giống không được chuyển gen và các hạt giống được chuyển gen của cây trồng chịu thuốc diệt cỏ theo sáng chế. Các hạt giống này bao gồm, ví dụ, các hạt giống không được chuyển gen có chứa các đặc tính chống chịu với thuốc diệt cỏ của cây trồng có số truy nhập NCBVIB là NCIMB 41262, và các hạt giống được chuyển gen có chứa phân tử polynucleotit theo sáng chế mã hóa protein IMI.

Để xử lý hạt giống, các hạt giống của cây trồng chịu thuốc diệt cỏ theo sáng chế này được xử lý bằng thuốc diệt cỏ, tốt hơn là các thuốc diệt cỏ được chọn từ nhóm bao gồm thuốc diệt cỏ ức chế AHAS như là amidosulfuron, azimsulfuron, bensulfuron, clorimuron, clorsulfuron, xinosulfuron, xyclosulfamuron, etametsulfuron, etoxysulfuron, flazasulfuron, flupyrsulfuron, foramsulfuron, halosulfuron, imazosulfuron, iodosulfuron, mesosulfuron, metsulfuron, nicosulfuron, oxasulfuron, primisulfuron, prosulfuron,

pyrazosulfuron, rimsulfuron, sulfometuron, sulfosulfuron, thifensulfuron, triasulfuron, tribenuron, trifloxysulfuron, triflusulfuron, tritosulfuron, imazametabenz, imazamox, imazapic, imazapyr, imazaquin, imazethapyr, cloransulam, diclosulam, florasulam, flumetsulam, metosulam, penoxsulam, bispyribac, pyriminobac, propoxycarbazon, flucarbazon, pyribenzoxim, pyriftalit, pyrithiobac, và các hỗn hợp của chúng hoặc với một hợp phần có chứa thuốc diệt cỏ ức chế AHAS.

Thuật ngữ xử lý hạt giống bao gồm tất cả các kỹ thuật xử lý hạt giống phù hợp đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật, như là bao hạt, bọc hạt, phun bụi lên hạt, ngâm hạt và vê hạt. Theo một phương án của sáng chế này, sáng chế này đề cập đến phương pháp xử lý đất trồng bằng cách sử dụng, cụ thể là lỗ gieo hạt: bằng hợp phần hạt có chứa thuốc diệt cỏ ức chế AHAS như chế phẩm/hợp phần (ví dụ, hợp phần hạt, theo lựa chọn gồm một hoặc nhiều chất mang chấp nhận trong nông nghiệp rắn hoặc lỏng, và/hoặc theo lựa chọn gồm một hoặc nhiều chất hoạt động bề mặt chấp nhận trong nông nghiệp). Các kỹ thuật này rất thuận tiện khi sử dụng, ví dụ, đối với nền đất gieo hạt cho ngũ cốc, ngô, bông và hoa hướng dương.

Sáng chế này cũng đề cập đến các hạt được bao với hoặc chứa hợp phần xử lý hạt giống bao gồm ít nhất một thuốc diệt cỏ ức chế AHAS từ nhóm bao gồm amidosulfuron, azimsulfuron, bensulfuron, clorimuron, clorsulfuron, xinosulfuron, xyclosulfamuron, ethametsulfuron, etoxysulfuron, flazasulfuron, flupyrsulfuron, foramsulfuron, halosulfuron, imazosulfuron, iodosulfuron, mesosulfuron, metsulfuron, nicosulfuron, oxasulfuron, primisulfuron, prosulfuron, pyrazosulfuron, rimsulfuron, sulfometuron, sulfosulfuron, thifensulfuron, triasulfuron, tribenuron, trifloxysulfuron, triflusulfuron, tritosulfuron, imazamethabenz, imazamox, imazapic, imazapyr, imazaquin, imazethapyr, cloransulam, diclosulam, florasulam, flumetsulam, metosulam, penoxsulam, bispyribac, pyriminobac, propoxycarbazon, flucarbazon, pyribenzoxim, pyriftalit và pyrithiobac. Thuật ngữ hạt giống bao gồm các hạt giống và cây non của tất cả các loại nhưng không hạn chế đối với hạt thực, mảnh hạt, chồi, thân củ, củ, quả, hạt cứng, cành giâm, cắt chồi non và tương tự và các vật liệu trong phương án ưu tiên là hạt thực.

Thuật ngữ “được bao với và/hoặc bao gồm” thường biểu thị các thành phần hoạt tính cho hầu hết các phần trên bề mặt của sản phẩm được nhân giống tại thời điểm sử

dụng, mặc dù phần lớn hơn hoặc ít hơn của thành phần có thể thấm qua sản phẩm được nhân giống, tùy thuộc vào phương pháp sử dụng. Khi sản phẩm nhân giống được trồng, nó có thể hấp thụ thành phần hoạt tính.

Việc phun xử lý hạt giống bằng thuốc diệt cỏ ức chế AHAS hoặc bằng hợp phần chứa thuốc diệt cỏ ức chế AHAS được thực hiện bằng cách phun, phun bụi lên hạt trước khi trồng cây và trước khi cây nảy mầm.

Khi xử lý hạt giống, các hợp phần tương ứng được phun lên hạt giống với một lượng thuốc diệt cỏ ức chế AHAS hoặc một lượng hợp phần chứa thuốc diệt cỏ ức chế AHAS hữu hiệu. Ở đây, mức độ sử dụng thường nằm trong khoảng từ 0,1g đến 10kg a.i (hoặc hỗn hợp a.i hoặc hợp phần) trên 100kg hạt giống, tốt hơn là từ 1kg đến 5kg trên 100kg hạt giống, đặc biệt là nằm trong khoảng từ 1g đến 2,5kg trên 100kg hạt giống. Đối với một số loại cây ngắn ngày như là cây rau diếp, liều lượng sử dụng có thể là cao hơn.

Sáng chế này đề cập đến phương pháp phòng trừ các loại rau không mong muốn hoặc phòng trừ cỏ dại bằng cách phun lên hạt giống của cây trồng chịu thuốc diệt cỏ theo sáng chế này trước khi gieo hạt và/hoặc sau khi hạt nảy mầm với một lượng thuốc diệt cỏ ức chế AHAS. Phương pháp này còn bao gồm việc gieo hạt giống, ví dụ, lên đất trồng ở một vùng hoặc trong các lọ trồng cây trong nhà kính. Phương pháp này có thể ứng dụng để diệt trừ các loại rau không mong muốn hoặc diệt trừ cỏ dại trong các vùng lân cận trung gian của hạt giống.

Việc phòng trừ các loại rau không mong muốn được hiểu là việc diệt các loại cỏ dại và/hoặc kìm hãm hoặc ức chế quá trình sinh trưởng bình thường của cỏ dại. Cỏ dại, theo nghĩa rộng nhất, được hiểu là tất cả các loài thực vật mọc ở những nơi mà chúng không được mong muốn.

Cỏ dại theo sáng chế này bao gồm, ví dụ, các loại cỏ dại hai lá mầm và một lá mầm. Cỏ dại hai lá mầm bao gồm, nhưng không hạn chế, các loại cỏ dại thuộc giống: Sinapis, Lepidium, Galium, Stellaria, Matricaria, Anthemis, Galinsoga, Chenopodium, Urtica, Senecio, Amaranthus, Portulaca, Xanthium, Convolvulus, Ipomoea, Polygonum, Sesbania, Ambrosia, Cirsium, Carduus, Sonchus, Solanum, Rorippa, Rotala, Lindernia, Lamium, Veronica, Abutilon, Emex, Datura, Viola, Galeopsis, Papaver, Centaurea, Trifolium, Ranunculus, và Taraxacum. Cỏ dại một lá mầm bao gồm, nhưng không hạn chế,

các loại cỏ dại thuộc các giống: 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.

Thêm vào đó, cỏ dại theo sáng chế này có thể bao gồm, ví dụ, các cây trồng theo mùa vụ mọc ở những nơi mà chúng không được mong muốn, Ví dụ, ngô mọc hoang ở những nơi trồng đậu tương là chủ yếu có thể được coi là cỏ dại nếu như cây ngô không được mong muốn ở những nơi trồng đậu tương.

Đơn vị từ “một” dùng để chỉ một hoặc nhiều (ví dụ, ít nhất là một) vị ngữ của đối tượng được chỉ. Ví dụ, “một nhân tố” nghĩa là một hoặc nhiều nhân tố. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “bao gồm” hoặc các biến thể của nó như “gồm” hoặc “chứa” được hiểu là ám chỉ sự bao hàm nhân tố, đơn vị hoặc bước hoặc nhóm các nhân tố, các đơn vị hoặc các bước được nêu nhưng không loại trừ bất kỳ nhân tố, đơn vị hoặc bước, hoặc nhóm các nhân tố, các đơn vị hoặc các bước khác.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ sau đây dùng để minh họa nhưng không nhằm mục đích hạn chế phạm vi bộc lộ của sáng chế.

Ví dụ 1: Việc sản xuất dòng cây lúa chống chịu thuốc diệt cỏ imidazolinon:

AHASL là nhân mã hóa enzym và gen của nó, trong các giống khác, đã được sắp xếp trong dạng hoang dại hoặc các dạng khác biểu thị phần đột biến làm phát sinh khả năng chịu được các thuốc diệt cỏ sulfonylurea và imidazolinon. Để sản xuất các cây lúa với enzym AHAS chịu thuốc diệt cỏ, các hạt giống lúa gạo được xử lý bằng các đột biến gen hóa học nhằm để tạo ra các thay đổi nhỏ trong phần hoạt tính tương tác với thuốc diệt cỏ nhằm để chống lại sự ức chế. Các giống lúa gạo hàng đầu và các dòng lúa gạo ưu tú được lựa chọn để tạo ra các đột biến mới có khả năng chịu được hầu hết các imidazolinon hoạt tính trong sinh chất phôi tốt. Sức ép lựa chọn phụ thuộc vào khả năng chống chịu của cây trồng ở giai đoạn bốn lá đối với hai trong số hầu hết các thuốc diệt cỏ imidazolinon được phun cùng lúc đối với vài thế hệ cho đến khi thu được dòng đồng hợp tử có khả năng chịu đựng tăng cường. Các dòng lúa gạo chịu thuốc diệt cỏ imidazolinon được sản xuất như được mô tả dưới đây:

Vào vụ cuối mùa xuân của mùa sinh trưởng số 1, hai mẫu hạt giống (mỗi mẫu 600g) của cây lúa dòng IRGA 417 được xử lý bằng dung dịch lỏng 0,001 M natri azit ở độ pH 3 (đệm phosphat 0,067M). Việc xử lý này được thực hiện bằng cách ngâm mỗi mẫu hạt giống vào hai lít natri azit, khuấy ổn định trong vòng 18 giờ, ở nhiệt độ trong phòng. Sau khi xử lý, các hạt giống được giữ qua trong thùng nước và, sau đó, chúng được quạt khô một phần trên các tờ giấy thấm để hút hơi ẩm từ bề mặt hạt giống. Sau đó, các hạt đã được xử lý được gieo trực tiếp trong khu vực vườn ươm ở Concepcion del Uruguay, E.R., Argentina.

Các hạt giống đã được xử lý (M_1) và các hạt giống đối chứng chưa được xử lý của cây lúa giống IRGA 417 được gieo trồng trong khu vực vườn ươm với mật độ 50 cây trên một mét vuông. Các cây trồng sau đó được sinh trưởng trong điều kiện ngập nước cho đến khi trưởng thành (độ ẩm của hạt lúa là 26%) và các khối được thu hoạch. Các hạt (M_2) của cây trồng được thu gom lại và được sấy khô trong má sấy đối lưu trong vòng 14 giờ ở nhiệt độ 45°C. Chúng được bảo quản trong thùng kín cho đến vụ mùa tiếp theo.

Vào vụ cuối xuân của mùa gieo trồng số 2, các hạt giống M_2 được trồng bằng máy gieo hạt thí nghiệm ở trên các khu vực rộng lớn với mức độ là 50 kg/ha trong khu vực vườn ươm ở Concepcion del Uruguay, E.R., Argentina. Một khu vực 3ha được thiết lập với số lượng cây xấp xỉ 6×10^6 cây M_2 . IRGA 417 (loại hoang dại) cũng đã được trồng để làm đối chứng. Toàn bộ khu vực này có sức ép lựa chọn với một hỗn hợp của hai loại thuốc diệt cỏ imidazolinon. Ba đợt phun tách biệt đã được thực hiện với máy phun thương mại theo các hướng khác nhau để tránh các khoảng trống và thu được việc xử lý 3X. Một lượng tổng 222 L/ha được phun ở 50 psi, bằng Teejets 8002 vòi trong mỗi lần phun. Mức độ xử lý IX là một hỗn hợp của Arsenal® (Imazapir 75 cc a.i/ha) và Cadre® (Imazapic 24.85 cc a.i/ha) trong một dung dịch nước với chất hoạt động bề mặt không ion (Citowett) ở mức 0,25%. Việc phun được thực hiện trên cây lúa ở giai đoạn 4 lá. Trong 7 ngày sau khi xử lý không có mưa.

Việc quan sát được thực hiện thường xuyên để kiểm tra toàn bộ khu vực được xử lý bằng thuốc trừ sâu. 90 ngày sau khi xử lý bằng thuốc trừ sâu, các cá thể kiểm tra được đánh dấu và được chuyển vào trồng trong nhà kính để nhân giống vô tính và để sản xuất hạt giống. Tổng số 10 cá thể cây trồng được để sinh trưởng và hạt giống được thu hoạch và

được sấy khô ở trong lò hấp trong vòng 7 ngày ở nhiệt độ 50°C. Đúng như dự đoán, không cây trồng đối chứng nào (IRGA 417) sống sót được sau khi xử lý bằng thuốc diệt cỏ.

Các hạt giống (M₃) từ các cây trồng được lựa chọn M₂ được trồng ở trong bình đặt trong điều kiện nhà kính ở Concepcion del Uruguay, E.R., Argentina trong suốt mùa đông ngay sau mùa gieo trồng thứ hai. Việc xử lý 2X được thực hiện bằng loại bình phun đeo lưng được chia thành hai lần phun ở mức IX của Arsenal® (Imazapir 75 cc a.i/ha) và Cadre® (Imazapic 24.85 cc a.i/ha) trong dung dịch nước với chất hoạt động bề mặt không ion (Citowet) ở mức 0,25%.

Các chồi rễ từ những cây trồng chống chịu với thuốc diệt cỏ (ví dụ, cây trồng sống sót sau khi phun thuốc diệt cỏ) được để sinh trưởng cho đến khi trưởng thành (độ ẩm của hạt là 26%) và được thu hoạch bằng tay. Các hạt giống thu hoạch được (M₄) để tự do không xử lý trong vòng 7 ngày ở nhiệt độ 50°C và được chuẩn bị cho mùa gieo trồng tiếp theo. Các hạt từ hai loại cây trồng chịu thuốc diệt cỏ được bảo quản riêng biệt. Các hạt được chuẩn bị cho việc gieo trồng bên ngoài vào cuối mùa gieo trồng ở Concepcion del Uruguay, E.R., Argentina. Vào mùa hè của mùa gieo trồng số 3, các hạt giống M₄ của cây trồng chống chịu với thuốc diệt cỏ M₃ được nêu trong IMINTA 16 được gieo trồng với mật độ 50 kg/ha. Việc xử lý 2X của thuốc diệt cỏ imidazolion được thực hiện trên cây lúa ở giai đoạn từ bốn đến năm lá với hai lần phun ở mức IX của Arsenal® (Imazapir 75 cc a.i/ha) và Cadre® (Imazapic 24.85 cc a.i/ha) trong dung dịch nước với chất hoạt động bề mặt không ion (Citowet) ở mức 0,25%. Không có triệu chứng nhiễm độc nào được phát hiện ở các cây trồng thuộc dòng IMINTA 16. Không một loại cây trồng có khác biệt gen kiểu đại (nghĩa là không chống chịu với thuốc diệt cỏ) được quan sát và các cây đồng hợp tử cao trong nông nghiệp và dòng chịu thuốc diệt cỏ được sản xuất. Các cá thể cây trồng IMINTA 6 được chuyển sang trồng trong nhà kính để sản xuất hạt giống và các hạt giống (M₅) được thu hoạch chậm hơn một năm.

Ví dụ: Các dòng cây lúa chống chịu thuốc diệt cỏ imidazolion với một đột biến ở gen AHASL1.

Gen ADN được phân lập riêng biệt từ các lá của các cây trồng sinh trưởng trong nhà kính của các cây dòng IMINTA 16 được mô tả trong Ví dụ 1 trên đây và gen

AHASL1 được khuếch đại bằng phương pháp phản ứng mạch polymeraza (PCR) sử dụng các đoạn mồi như được mô tả dưới đây. Sản phẩm thu được của việc khuếch đại PCR có thể được sắp xếp bằng các phương pháp thông thường.

Các đoạn mồi được sử dụng để PCR và giải trình tự được thể hiện trên Bảng 1. Các đoạn mồi được lựa chọn thủ công thông qua việc khảo sát các trình tự của cây lúa đã được công bố rộng rãi đối với *Oryza sativa* 'Kinmaze', *Oryza sativa japonica* và *Oryza sativa indica*. Các đoạn mồi được lòng xấp xỉ là cứ mỗi 400-500bp dọc theo xấp xỉ 2000bp của gen AHAS. Một vài đoạn mồi được thiết kế cho mỗi đoạn có độ dài 500bp để tối đa hóa khả năng thành công của việc khuếch đại. Không một trọng lượng nào được đặt ra đối với các vùng bảo thủ khi lựa chọn các đoạn mồi. Các trình tự mồi được kiểm tra cho các cấu trúc kẹp tóc và các dime thông qua trang web www.rnature.com/oligonucleotide.html. Do không có intron nào xuất hiện trong gen AHASL1, toàn bộ gen thể hiện trình tự mã hóa và do đó được bảo toàn. Các đoạn mồi được thiết kế để có lượng GC gần bằng 50% và tương đương với nhiệt độ nóng chảy, xấp xỉ từ 54-58°C. Các đoạn mồi được liệt kê trong Bảng 1 phản ánh vị trí bazơ bắt đầu chính xác theo các trình tự nucleotit AHASL1 đã được công bố đối với cây lúa (ví dụ, số hiệu truy nhập GenBank là AB049822). U1 36851 đề cập đến vùng nằm ngược dòng của codon khởi đầu trong gen AHAS và được thiết kế từ dòng BAC (OSJNBa0053B21), số hiệu truy nhập là AL731599.

Bảng 1

Các đoạn mồi để khuếch đại PCR và giải trình tự ADN của gen AHASL1 ở giống lúa IMINTA 16.

Tên đoạn mồi	Trình tự từ 5' đến 3'	Nhiệt độ nóng chảy (°C)	Lượng GC (%)
Cặp 1			
U136851	GACATATGGGGCCCACTGT (SEQ ID số: 4)	58,8	58
L789	GTAGATTCATCGAGGTGTC (SEQ ID số: 5)	54,5	47,4
Cặp 2			
U642*	GTCCTTGATGTGGAGGACAT (SEQ ID số: 6)	57,3	50
L1369	CATATTGCGGGTGGGATCTCT (SEQ ID số: 7)	57,3	50

Cặp 3			
U1229	GGGCTTGAATGCTCTGCTAC (SEQ ID số: 8)	59,4	55
L1742	CGGGTTGCCCAAGTATGTAT (SEQ ID số: 9)	57,3	50
Cặp 4			
U1633	ACCTCCCTGTGAAGGTGATG (SEQ ID số: 10)	59,4	55
L2155*	AGGATTACCATGCCAAGCAC (SEQ ID số: 11)	57,3	50
Các đoạn mồi PCR và các đoạn mồi giải trình tự khác			
U037	CACCACCCACCATGGCTA (SEQ ID số: 12)	58,2	61,1
U114	GTAAGAACCACCAGCGAC (SEQ ID số: 13)	56	55,6
U1109	GTGGATAAGGCTGACCTGT (SEQ ID số: 14)	56,7	52,6
U1166	GGGAAAATTGAGGCTTTTGCA (SEQ ID số: 15)	55,9	42,9
L1299	CTCATTGTGCCATGCACTAA (SEQ ID số: 16)	55,3	45
U1721	GCATACATACTTGGGAAC (SEQ ID số: 17)	54	47
L2054	CATACCACTCTTTATGGGTC (SEQ ID số: 18)	52	45

*U642 và L2155 cũng được sử dụng như là một cặp PCR.

Khi ADN hệ gen được khuếch đại PCR từ các cây con của giống lúa IMINTA 16 được kiểm tra, sự thay đổi ở một bazơ đơn (ví dụ, việc biến đổi từ C đến T) đã được phát hiện ở vùng mã hóa của gen tạo ra việc thế axit amin ở protein AHASL1 ở vị trí axit amin 179 từ Ala trong dòng kiểu dại thành Val trong dòng IMINTA 16. Vị trí của việc thế này tương ứng với vị trí 205 ở protein AHASL của giống cây cải xoong *Arabidopsis thaliana* (xem bảng 2 dưới đây). Việc thế Ala205Val ở protein AHASL1 ở giống cây trồng *Arabidopsis thaliana* đã được biết là giúp cây trồng biểu hiện protein này để chống chịu với các thuốc diệt cỏ imidazolon.

Ví dụ 3: Các protein AHASL1 chịu thuốc diệt cỏ ở cây lúa

Sáng chế này đề cập đến cả hai trình tự nucleotit và axit amin của các polypeptit AHASL1 chịu thuốc diệt cỏ ở cây lúa. Cây trồng chứa các polypeptit AHASL1 chịu thuốc diệt cỏ đã được xác định từ trước, và một số lượng vùng bảo thủ của các polypeptit AHASL1 là các điểm thế axit amin sinh ra khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ như đã được mô tả. Tham khảo, Devine và Eberlein (1997) "Physiological, biochemical and

molecular aspects of herbicide resistance based on altered target sites". trong: Herbicide Activity: Toxicology, Biochemistry and Molecular Biology, Roe và các đồng tác giả. (eds.), pp. 159-185, IOS Press, Amsterdam; và Devine và Shukla, (2000) Crop Protection 19:881-889.

Việc sử dụng các phân tử polynucleotit AHASL1 theo sáng chế và các phương pháp đã được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật biết đến, một khi có thể sản xuất các phân tử polynucleotit mã hóa các polypeptit AHASL1 chịu thuốc diệt cỏ có một, hai, ba hoặc nhiều việc thế axit amin ở các điểm được xác định trong các vùng bảo thủ. Bảng 2 thể hiện các vùng được bảo quản của các protein AHASL1, việc thế axit amin đã được biết đến là sinh ra khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ trong các vùng bảo thủ này và các axit amin tương ứng trong protein AHASL1 ở cây lúa được nêu trong SEQ ID số: 2.

Bảng 2

Việc thế axit amin ở trong các vùng bảo thủ của các polypeptit AHASL đã được biết đến là sinh ra khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ và các vị trí tương đương của chúng ở các polypeptit AHASL1 của cây lúa.

Vùng bảo thủ ¹	Đột biến ²	Tham khảo	Vị trí axit amin ở cây lúa
VFAUPGG <u>A</u> SMEIHQALTRS ³	Ala ₁₂₂ thành Thr	Bernasconi và các đồng tác giả ⁴	Ala ₉₆
AITGQV <u>P</u> RRMIGT ³	Pro ₁₉₇ thành Ala	Boutsalis và các đồng tác giả ⁵	Pro ₁₇₁ ¹²
	Pro ₁₉₇ thành Thr	Guttieri và các đồng tác giả ⁶	
	Pro ₁₉₇ thành His	Guttieri và các đồng tác giả ⁷	
	Pro ₁₉₇ thành Leu	Guttieri và các đồng tác giả ⁶	
	Pro ₁₉₇ thành Arg	Guttieri và các đồng tác giả ⁶	

	Pro ₁₉₇ thành Ile	Guttieri và các đồng tác giả ⁶	
	Pro ₁₉₇ thành Gln	Guttieri và các đồng tác giả ⁶	
	Pro ₁₉₇ thành Ser	Guttieri và các đồng tác giả ⁶	
<u>A</u> FQETP ³	Ala ₂₀₅ thành Asp	Hartnett và các đồng tác giả ⁸	Ala ₁₇₉
	Ala ₂₀₅ thành Val ¹¹	Simpson ⁹	
Q <u>W</u> ED ³	Trp ₅₇₄ thành Leu	Bruniard ¹⁰	Trp ₅₄₈
		Boutsalis và các đồng tác giả	
IP <u>S</u> GG ³	Ser ₆₅₃ thành Asn	Chang & Duggleby ¹²	Ser ₆₂₇
	Ser ₆₅₃ thành Thr	Lee và các đồng	
	Ser ₆₅₃ thành Phe	tác giả ¹³	

Các vùng bảo thủ từ Devine và Eberlein (1997) "Physiological, biochemical and molecular aspects of herbicide resistance based on altered target sites". Trong: Herbicide Activity: Toxicology, Biochemistry and Molecular Biology, Roe và các đồng tác giả (eds.), pp. 159-185, IOS Press, Amsterdam và Devine và Shukla, (2000) Crop Protection 19:881-889.

²Các axit amin tương ứng với trình tự axit amin của polypeptit AHASL ở giống cây *Arabidopsis thaliana* AHASL.

³Protein AHASL1 theo sáng chế (SEQ ID số: 2) có cùng vùng bảo thủ.

⁴Bernasconi và các đồng tác giả (1995) J Biol. Chem. 270(29):17381-17385.

⁵Boutsalis và các đồng tác giả (1999) Pestic. Sci. 55:507-516.

⁶Guttieri và các đồng tác giả (1995) Weed Sci. 43:143-178.

⁷Guttieri và các đồng tác giả (1992) Weed Sci. 40:670-678.

⁸Hartnett và các đồng tác giả (1990) "Herbicide-resistant plants carrying mutated acetolactate synthase genes," hi: Managing Resistance to Agrochemicals: Fundamental Research to Practical Strategies, Green và các đồng tác giả (eds.), American Chemical Soc. Symp., Series No. 421, Washington, DC, USA

⁹Simpson (1998) Down to Earth 53(1):26-35.

¹⁰Bruniard (2001) Inheritance of imidazolinone resistance, characterization of cross-resistance pattern, and identification of molecular markers in sunflower (*Helianthus annuus* L.). Ph.D. Thesis, North Dakota State University, Fargo, ND, USA, pp 1-78.

¹¹Sáng chế này đề cập đến trình tự axit amin của protein AHASL1 chịu thuốc diệt cỏ ở cây lúa được thế từ Ala₁₇₉ thành Val (SEQ ID số: 2) và trình tự polynucleotit mã hóa AHASL1 (SEQ ID số: 1 và 3).

¹²Chang và Duggleby (1998) Biochem J. 333:765-777. ¹³Lee và các đồng tác giả (1999) FEBS Lett. 452:341-345.

Tất cả các tài liệu công bố và đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền sáng chế được đề cập đến trong bản mô tả này đã được bộc lộ đến mức những người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật có thể hiểu được và sáng chế này viện dẫn đến. Các tài liệu công bố đơn và các đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền sáng chế của Australia cũng đã được sử dụng để tham khảo và có mức độ bộc lộ tương tự và mỗi một tài liệu công bố đơn và đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền sáng chế đã được đề cập đến ở đây để tham khảo.

Mặc dù sáng chế đã được mô tả cụ thể bằng các minh họa và ví dụ nhằm mục đích làm rõ hơn, nhưng vẫn có thể có những sửa đổi nhất định nhưng vẫn thuộc phạm vi yêu cầu bảo hộ kèm theo sáng chế này.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Polynucleotit mã hoá tiểu phần lớn của axetohydroxyaxit synthaza (AHASL1) được phân lập từ cây lúa bao gồm trình tự nucleotit mã hóa protein AHASL1 chống chịu thuốc diệt cỏ imidazolinon, protein AHASL1 chống chịu thuốc diệt cỏ imidazolinon này bao gồm valin ở vị trí axit amin 179 của SEQ ID số: 2 hoặc vị trí tương đương, hoặc trình tự bổ sung đầy đủ của nó.
2. Polynucleotit được phân lập theo điểm 1, trong đó protein AHASL1 chịu thuốc diệt cỏ imidazolinon bao gồm trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID số: 2.
3. Polynucleotit được phân lập theo điểm 1 hoặc 2, trong đó trình tự nucleotit này được nêu trong SEQ ID số: 1 hoặc 3.
4. Polynucleotit được phân lập theo điểm 1, trong đó protein AHASL1 chịu thuốc diệt cỏ imidazolinon còn bao gồm:
 - (i) threonin ở vị trí axit amin 96 hoặc vị trí tương đương, mỗi vị trí này tương ứng với trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID số: 2;
 - (ii) alanin, threonin, histidin, leuxin, arginin, isoleuxin, glutamin, hoặc serin ở vị trí axit amin 171 hoặc vị trí tương đương, mỗi vị trí này tương ứng với trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID số: 2;
 - (iii) leuxin ở vị trí axit amin 548 hoặc vị trí tương đương, mỗi vị trí này tương ứng với trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID số: 2; hoặc
 - (iv) asparagin, threonin, hoặc phenylalanin ở vị trí axit amin 627 hoặc vị trí tương đương, mỗi vị trí này tương ứng với trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID số: 2.

5. Catxet biểu hiện chứa một promotor liên kết có thể điều khiển được với polynucleotit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4.
6. Catxet biểu hiện theo điểm 5, trong đó promotor này có khả năng điều khiển biểu hiện gen ở vi khuẩn, tế bào nấm, tế bào động vật hoặc tế bào thực vật.
7. Tế bào chủ không phải của người được biến nạp catxet biểu hiện theo điểm 5 hoặc điểm 6.
8. Tế bào chủ theo điểm 7, trong đó tế bào chủ này được chọn từ nhóm bao gồm vi khuẩn, tế bào nấm, tế bào động vật và tế bào thực vật.
9. Vector biến nạp chứa gen quan tâm và gen đánh dấu có thể chọn lọc được, gen đánh dấu có thể chọn lọc được này bao gồm promotor liên kết có thể điều khiển được với polynucleotit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4.
10. Vector biến nạp theo điểm 9, trong đó promotor này có thể biểu hiện được ở tế bào thực vật.
11. Vector biến nạp theo điểm 9 hoặc 10, trong đó promotor này là promotor cấu tạo.
12. Vector biến nạp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 9 đến 11, trong đó gen đánh dấu có thể chọn lọc được còn bao gồm trình tự hướng đích lục lạp liên kết có thể điều khiển được.
13. Vector biến nạp theo điểm 9, trong đó promotor này có thể biểu hiện được ở vi khuẩn hoặc nấm men.
14. Tế bào chủ không phải của người chứa vector biến nạp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 9 đến 13.

15. Tế bào thực vật được biến nạp bao gồm ổn định cấu trúc polynucleotit trong bộ gen của nó mà bao gồm polynucleotit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4 liên kết có thể điều khiển được với promotor điều khiển biểu hiện ở tế bào thực vật này, trong đó tế bào thực vật này có khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ imidazolinon được tăng cường so với tế bào thực vật không được biến nạp.

16. Tế bào thực vật được biến nạp theo điểm 15, trong đó promotor này được chọn từ nhóm bao gồm promotor cấu tạo và promotor ái mô.

17. Tế bào thực vật được biến nạp theo điểm 15 hoặc 16, trong đó cấu trúc polynucleotit này còn bao gồm trình tự hướng đích lục lạp liên kết có thể điều khiển được.

18. Tế bào thực vật được biến nạp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 15 đến 17, trong đó thuốc diệt cỏ imidazolinon được chọn từ nhóm bao gồm: axit 2-(4-isopropyl-4-metyl-5-oxo-2-imidazolin-2-yl)-nicotinic, axit 2-(4-isopropyl-4-metyl-5-oxo-2-imidazolin-2-yl)-3-quinolincarboxylic, axit 5-etyl-2-(4-isopropyl-4-metyl-5-oxo-2-imidazolin-2-yl)-nicotinic, axit 2-(4-isopropyl-4-metyl-5-oxo-2-imidazolin-2-yl)-5-(metoxymetyl)-nicotinic, axit 2-(4-isopropyl-4-metyl-5-oxo-2-imidazolin-2-yl)-5-metylnicotinic, hỗn hợp gồm metyl 6-(4-isopropyl-4-metyl-5-oxo-2-imidazolin-2-yl)-m-toluat và metyl 2-(4-isopropyl-4-metyl-5-oxo-2-imidazolin-2-yl)-p-toluat, và các tổ hợp của chúng.

19. Cây trồng chứa tế bào thực vật theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 15 đến 18, trong đó cây trồng này có khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ imidazolinon được tăng cường so với giống kiểu dại của cây trồng này.

20. Cây trồng theo điểm 19, trong đó cây trồng này là cây hai lá mầm hoặc cây một lá mầm.

21. Cây trồng theo điểm 20, trong đó cây trồng hai lá mầm này được chọn từ nhóm bao gồm cây hoa hướng dương, cây đậu tương, cây bông, cây thuộc loài *Brassica* spp., cây thuốc lá, cây khoai tây, cây củ cải đường, cây cỏ linh lăng, cây rum và cây lạc.

22. Cây trồng theo điểm 20, trong đó cây một lá mầm này được chọn từ nhóm bao gồm cây lúa mì, cây lúa, cây ngô, cây lúa mạch, cây lúa mạch đen, cây yến mạch, cây lúa mạch đen lai, cây kê và cây lúa miến.

23. Hạt giống của cây trồng theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 15 đến 22, hạt giống này bao gồm polynucleotit *AHASL1*.

24. Hạt giống theo điểm 23, trong đó hạt giống này được xử lý thuốc diệt cỏ imidazolinon, hoặc hỗn hợp thuốc diệt cỏ imidazolinon, thuốc diệt cỏ sulfonylure, và/hoặc thuốc diệt cỏ triazolopyrimidin.

25. Hạt giống theo điểm 24, trong đó thuốc diệt cỏ imidazolinon được chọn từ nhóm bao gồm: axit 2-(4-isopropyl-4-metyl-5-oxo-2-imidazolin-2-yl)-nicotinic, axit 2-(4-isopropyl-4-metyl-5-oxo-2-imidazolin-2-yl)-3-quinolincarboxylic, axit 5-etyl-2-(4-isopropyl-4-metyl-5-oxo-2-imidazolin-2-yl)-nicotinic, axit 2-(4-isopropyl-4-metyl-5-oxo-2-imidazolin-2-yl)-5-(metoxymetyl)-nicotinic, axit 2-(4-isopropyl-4-metyl-5-oxo-2-imidazolin-2-yl)-5-metylnicotinic, hỗn hợp gồm metyl 6-(4-isopropyl-4-metyl-5-oxo-2-imidazolin-2-yl)-m-toluat và metyl 2-(4-isopropyl-4-metyl-5-oxo-2-imidazolin-2-yl)-p-toluat, và các tổ hợp của chúng.

26. Hạt giống theo điểm 24, trong đó thuốc diệt cỏ sulfonylure được chọn từ nhóm bao gồm: closulfuron, metsulfuron metyl, sulfometuron metyl, cloimuron etyl, thifensulfuron metyl, tribenuron metyl, bensulfuron metyl, nicosulfuron, etametsulfuron metyl, rimsulfuron, triflusulfuron metyl, triasulfuron, primisulfuron metyl, xinosulfuron, amidosulfuron, flazasulfuron, imazosulfuron, pyrazosulfuron etyl, halosulfuron, và hỗn hợp của chúng.

27. Phương pháp kiểm soát cỏ dại trên cánh đồng bao gồm bước:

- (a) trồng trên cánh đồng cây trồng theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 19 đến 22; và
- (b) cho cây trồng và cỏ dại trên cánh đồng tiếp xúc với lượng hữu hiệu thuốc diệt cỏ imidazolinon, hoặc hỗn hợp thuốc diệt cỏ imidazolinon, thuốc diệt cỏ sulfonylure, và/hoặc thuốc diệt cỏ triazolopyrimidin, mà cây trồng này chịu được và sẽ ức chế sự phát triển của giống cây trồng kiểu dại không được biến nạp của cây trồng này, nhờ đó kiểm soát được cỏ dại.

28. Phương pháp theo điểm 27, trong đó cây trồng này được phun thuốc diệt cỏ imidazolinon được chọn từ nhóm bao gồm: axit 2-(4-isopropyl-4-metyl-5-oxo-2-imidazolin-2-yl)-nicotinic, axit 2-(4-isopropyl-4-metyl-5-oxo-2-imidazolin-2-yl)-3-quinolincarboxylic, axit 5-etyl-2-(4-isopropyl-4-metyl-5-oxo-2-imidazolin-2-yl)-nicotinic, axit 2-(4-isopropyl-4-metyl-5-oxo-2-imidazolin-2-yl)-5-(metoxymetyl)-nicotinic, axit 2-(4-isopropyl-4-metyl-5-oxo-2-imidazolin-2-yl)-5-metylnicotinic, hỗn hợp gồm metyl 6-(4-isopropyl-4-metyl-5-oxo-2-imidazolin-2-yl)-m-toluat và metyl 2-(4-isopropyl-4-metyl-5-oxo-2-imidazolin-2-yl)-p-toluat, và các tổ hợp của chúng.

29. Phương pháp theo điểm 27, trong đó cây trồng này được phun thuốc diệt cỏ sulfonylure được chọn từ nhóm bao gồm: closulfuron, metsulfuron metyl, sulfometuron metyl, clorimuron etyl, thifensulfuron metyl, tribenuron metyl, bensulfuron metyl, nicosulfuron, ethametsulfuron metyl, rimsulfuron, triflusulfuron metyl, triasulfuron, primisulfuron metyl, cinosulfuron, amidosulfuron, fluzasulfuron, imazosulfuron, pyrazosulfuron etyl, halosulfuron, và hỗn hợp của chúng.

30. Phương pháp sản xuất cây trồng chịu thuốc diệt cỏ bao gồm bước:

- (a) biến nạp vào tế bào thực vật cấu trúc polynucleotit chứa polynucleotit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4 được liên kết có thể điều khiển được với promotor điều khiển sự biểu hiện của tế bào thực vật này; và

(b) tạo ra cây trồng từ tế bào thực vật nêu trên, trong đó cây trồng này có khả năng chịu đựng đối với thuốc diệt cỏ imidazolinon được tăng cường so với giống kiểu dại không được biến nạp của cây trồng này.

31. Phương pháp theo điểm 30, trong đó promotor được chọn từ nhóm bao gồm promotor cấu tạo và promotor ái mô.

32. Phương pháp theo điểm 30 hoặc điểm 31, trong đó cấu trúc polynucleotit này còn bao gồm trình tự hướng đích lục lập liên kết có thể điều khiển được.

33. Phương pháp theo điểm 30, trong đó thuốc diệt cỏ imidazolinon được chọn từ nhóm bao gồm: axit 2-(4-isopropyl-4-metyl-5-oxo-2-imidazolin-2-yl)-nicotinic, axit 2-(4-isopropyl-4-metyl-5-oxo-2-imidazolin-2-yl)-3-quinolincarboxylic, axit 5-etyl-2-(4-isopropyl-4-metyl-5-oxo-2-imidazolin-2-yl)-nicotinic, axit 2-(4-isopropyl-4-metyl-5-oxo-2-imidazolin-2-yl)-5-(metoxymetyl)-nicotinic, axit 2-(4-isopropyl-4-metyl-5-oxo-2-imidazolin-2-yl)-5-metylnicotinic, hỗn hợp của metyl 6-(4-isopropyl-4-metyl-5-oxo-2-imidazolin-2-yl)-m-toluat và metyl 2-(4-isopropyl-4-metyl-5-oxo-2-imidazolin-2-yl)-p-toluat, và các tổ hợp của chúng.

34. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 30 đến 33, trong đó cây trồng này là cây hai lá mầm hoặc cây một lá mầm.

35. Phương pháp theo điểm 34, trong đó cây hai lá mầm được chọn từ nhóm bao gồm cây hoa hướng dương, cây đậu nành, cây thuộc loài *Brassica* spp., cây thuốc lá, cây khoai tây, cây củ cải đường, cây cỏ linh lăng, cây rum và cây lạc.

36. Phương pháp theo điểm 34, trong đó cây một lá mầm được chọn từ nhóm bao gồm cây lúa mỳ, cây lúa, cây ngô, cây lúa mạch, cây lúa mạch đen, cây yến mạch, cây lúa mạch đen lai, cây kê và cây lúa miến.

37. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 30 đến 36, trong đó tế bào thực vật có khả năng chống chịu ít nhất một loại thuốc diệt cỏ, trước bước biến nạp nêu trên.

38. Phương pháp chọn lọc tế bào thực vật được biến nạp bao gồm bước:

- (a) biến nạp vector biến nạp thực vật vào tế bào thực vật;
 - (b) cho tế bào thực vật được biến nạp tiếp xúc trực tiếp với ít nhất một loại thuốc diệt cỏ với nồng độ làm ức chế sự sinh trưởng của tế bào thực vật không được biến nạp; và
 - (c) phát hiện tế bào thực vật được biến nạp qua khả năng sinh trưởng của nó khi có mặt của ít nhất một loại thuốc diệt cỏ nêu trên;
- trong đó vector biến nạp thực vật bao gồm gen đánh dấu có thể chọn lọc được chứa promoter và polynucleotit liên kết có thể điều khiển được, promoter này điều khiển sự biểu hiện ở tế bào thực vật, và polynucleotit này là polynucleotit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4.

39. Phương pháp theo điểm 38, trong đó ít nhất một loại thuốc diệt cỏ đã nêu là thuốc diệt cỏ imidazolinon, thuốc diệt cỏ sulfonylure, thuốc diệt cỏ triazolopyrimidin, thuốc diệt cỏ pyrimidinyloxybenzoat, và thuốc diệt cỏ sulfonylamino- carbonyltriazolinon, hoặc hỗn hợp của chúng.

40. Phương pháp theo điểm 38 hoặc điểm 39, trong đó vector biến nạp thực vật này còn bao gồm ít nhất một gen quan tâm.

41. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 38 đến 40, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước tái tạo cây trồng từ tế bào thực vật được biến nạp nêu trên.

42. Polypeptit được phân lập được mã hóa bởi trình tự nucleotit của polynucleotit *AHASL1* theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4.

43. Polypeptit được phân lập theo điểm 42, trong đó polypeptit này chứa trình tự axit

amin như được nêu trong SEQ ID số: 2.

44. Phương pháp diệt trừ các loại thực vật không mong muốn bao gồm bước cho hạt giống theo điểm 23 tiếp xúc với thuốc diệt cỏ ức chế AHAS trước khi gieo trồng và/hoặc sau khi hạt nảy mầm.

45. Phương pháp theo điểm 44, trong đó thuốc diệt cỏ ức chế AHAS là thuốc diệt cỏ imidazolinon, thuốc diệt cỏ sulfonylure, thuốc diệt cỏ triazolopyrimidin, thuốc diệt cỏ pyrimidinyloxybenzoat, thuốc diệt cỏ sulfonylamino-carbonyltriazolinon, hoặc hỗn hợp của chúng.

46. Cây lúa bao gồm polynucleotit tiểu phần lớn axetohydroxyaxit synthaza 1 (AHASL1) không tái tổ hợp mã hoá protein AHASL1 chống chịu thuốc diệt cỏ, protein AHASL1 chống chịu thuốc diệt cỏ này bao gồm việc thay thế valin ở vị trí axit amin 179 của SEQ ID số: 2, trong đó cây lúa này có khả năng chống chịu đối với ít nhất một loại thuốc diệt cỏ được tăng cường so với cây lúa kiểu dại, và trong đó việc thay thế ở vị trí axit amin tương ứng với vị trí 179 của SEQ ID số: 2 này là kết quả của việc xử lý hạt giống bằng natri azit.

47. Cây lúa theo điểm 46, trong đó việc xử lý hạt giống đã nêu là với dung dịch nước natri azit 0,001M ở pH 3.

48. Cây lúa theo điểm 46 hoặc 47, trong đó protein AHASL1 chống chịu thuốc diệt cỏ nêu trên chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID số: 2.

49. Cây lúa theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 46 đến 48, trong đó polynucleotit AHASL1 chứa trình tự nucleotit được nêu trong SEQ ID số: 1 hoặc 3.

50. Cây lúa theo điểm 46 hoặc 47, trong đó protein AHASL1 chống chịu thuốc diệt cỏ này còn bao gồm việc thay thế axit amin được chọn từ nhóm gồm:

- (a) thay thế bằng threonin ở vị trí axit amin 96 hoặc vị trí tương đương;
- (b) thay thế bằng alanin, threonin, histidin, leuxin, arginin, isoleucin, glutamin, hoặc serin ở vị trí axit amin 171 hoặc vị trí tương đương;
- (c) thay thế bằng leuxin ở vị trí axit amin 548 hoặc vị trí tương đương, và
- (d) thay thế bằng asparagin, threonin, hoặc phenylalanin ở vị trí axit amin 627 hoặc vị trí tương đương.

51. Cây lúa theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 46 đến 50, trong đó cây lúa này là:

- (a) thể hệ tiếp theo của cây trồng thuộc dòng IMINTA 16, mẫu hạt giống điển hình của dòng này được nộp lưu với số truy nhập NCIMB là NCIMB 41262;
- (b) thể đột biến, tái tổ hợp hoặc được cải biến di truyền của cây trồng của dòng IMINTA 16; hoặc
- (c) thể hệ tiếp theo của cây trồng bất kỳ trong số các cây trồng (a) hoặc (b).

52. Cây lúa theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 46 đến 51, trong đó cây lúa này có khả năng chịu đựng với ít nhất một loại thuốc diệt cỏ được chọn từ nhóm bao gồm thuốc diệt cỏ imidazolinon, thuốc diệt cỏ sulfonyleurea, thuốc diệt cỏ triazolopirimidin, thuốc diệt cỏ pyrimidinyloxybenzoat, và thuốc diệt cỏ sulfonlamino-cacbonyltriazolinon được tăng cường.

53. Cây lúa theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 46 đến 52, trong đó protein AHASL1 chịu thuốc diệt cỏ làm tăng sức chịu đựng của cây trồng lên 75 cm³ a.i./ha đối với imazapyr và 24,85cm³ a.i./ha đối với imazapic.

54. Polynucleotit được phân lập từ cây lúa theo điểm 46 bao gồm trình tự nucleotit của cây lúa, trong đó trình tự này là trình tự được chọn từ nhóm bao gồm:

- (a) trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID số: 1 hoặc 3;
- (b) trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID số: 2;
- (c) trình tự nucleotit mã hóa protein biến thể bao gồm hoạt tính AHAS chịu thuốc diệt cỏ, protein biến thể này còn bao gồm trình tự axit amin SEQ ID số: 2 với ít

nhất một sự thay thế axit amin được chọn từ (i) alanin ở vị trí axit amin 96 hoặc vị trí tương đương được thay thế bằng threonin, (ii) prolin ở vị trí axit amin 171 hoặc vị trí tương đương được thay thế bằng alanin, threonin, histidin, leucin, arginin, isoleucin, glutamin, hoặc serin, (iii) tryptophan ở vị trí axit amin 548 hoặc vị trí tương đương được thay thế bởi asparagin, threonin, hoặc phenylalanin;

(d) mảnh trình tự nucleotit của trình tự nucleotit bất kỳ được chọn từ nhóm gồm (a) đến (c), trong đó mảnh này mã hóa polypeptit, bao gồm thay thế bởi valin ở vị trí axit amin 179 hoặc vị trí tương đương và hoạt tính AHAS chịu thuốc diệt cỏ; hoặc

(e) trình tự nucleotit bổ sung đầy đủ với ít nhất một trình tự nucleotit được chọn từ các trình tự nucleotit nêu trong mục từ (a) đến (d).

55. Tế bào chủ không phải của người được biến nạp polynucleotit theo điểm 54.

56. Cây trồng được biến nạp polynucleotit theo điểm 54, trong đó tính chống chịu của cây trồng này với ít nhất một loại thuốc diệt cỏ được gia tăng khi so sánh với cây trồng không được biến nạp.

57. Cây trồng theo điểm 56, trong đó thuốc diệt cỏ này là thuốc diệt cỏ imidazolinon.

58. Cây trồng theo điểm 56, trong đó cây trồng này được chọn từ cây hướng dương, đậu tương, bông, cây thuộc họ cải, thuốc lá, khoai tây, củ cải đường, cỏ linh lăng, cây rum, đậu phộng, cây lúa mì, lúa gạo, ngô, lúa mạch, lúa mạch đen, yến mạch, cây lai lúa mì và lúa mạch đen, kê, và cây lúa miến.

59. Phương pháp chọn lọc tế bào thực vật được biến nạp bao gồm các bước:

biến nạp vectơ bao gồm polynucleotit theo điểm 54 vào tế bào thực vật;

cho tế bào thực vật được biến nạp này tiếp xúc với ít nhất một thuốc diệt cỏ ở nồng độ ức chế sự tăng trưởng của tế bào thực vật không biến nạp; và

xác định tế bào thực vật được biến nạp này bởi khả năng tăng trưởng của nó khi có mặt thuốc diệt cỏ.

60. Phương pháp theo điểm 59, trong đó vecto này bao gồm thêm ít nhất một gen mong muốn.

61. Phương pháp trồng cây trồng theo một trong số các điểm từ 46-53 và 56-58, hoặc cây trồng thuộc dòng IMINTA 16, mẫu hạt giống điển hình của dòng này được nộp lưu với mã số truy nhập NCIMB số NCIMB41262, còn bao gồm bước dùng lượng có hiệu quả thuốc diệt cỏ imidazolinon, thuốc diệt cỏ sulfonyleurea, thuốc diệt cỏ triazolopyrimidin, thuốc diệt cỏ pyrimidinyloxybenzoat, thuốc diệt cỏ sulfonlamino-cacbonyltriazolinon, hoặc hỗn hợp của chúng lên cây trồng và vùng lân cận với cây trồng.

62. Phương pháp theo điểm 61, trong đó thuốc diệt cỏ imidazolinon được chọn từ: imazethapyr, imazapic, imazamox, imazaquin, imazethabenz, và hỗn hợp của chúng.

63. Phương pháp theo điểm 61, trong đó thuốc diệt cỏ sulfonyleurea được chọn từ: closulfuron, metsulfuron metyl, sulfometuron metyl, clorimuron etyl, thifensulfuron metyl, tribenuron metyl, bensulfuron metyl, nicosulfuron, etanmetsulfuron metyl, rimsulfuron, triflurosulfuron metyl, triasulfuron, primisulfuron metyl, cinosulfuron, amidosulfuron, fluzasulfuron, imazosulfuron, pyrazosulfuron etyl, halosulfuron, và hỗn hợp của chúng.

64. Polypeptit được phân lập mà được mã hóa bởi polynucleotit theo điểm 54.

65. Hạt giống của cây trồng theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 46-53 và 56-58, trong đó hạt giống này bao gồm polynucleotit AHASL1 theo điểm 1.

66. Hạt giống theo điểm 65, trong đó hạt giống này được xử lý với thuốc diệt cỏ ức chế AHAS.

67. Hạt giống theo điểm 66, trong đó thuốc diệt cỏ ức chế AHAS này là thuốc diệt cỏ

imidazolinon, thuốc diệt cỏ sulfonylurea, thuốc diệt cỏ triazolopyrimidin, thuốc diệt cỏ pyrimidinyloxy-benzoat, thuốc diệt cỏ sulfonylamino-cacbonyltriazolinon, hoặc hỗn hợp của chúng.

68. Phương pháp xử lý hạt giống bao gồm bước cho hạt giống theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 65-67 trước khi gieo hạt và/hoặc sau khi chuẩn bị nảy mầm tiếp xúc với thuốc diệt cỏ ức chế AHAS.

1/14

Fig. 1

	501				650
SEQ ID số :1					
OsAHASL1.1					
OsAHASL1.2					
OsAHASL1.4		CCCAA	CCCAGAAACC	CTCGCCGCCG	CCGCCCGCCG
OsAHASL1.6				CTCGCCGCCG	CCGCCCGCCG
ZmAHASL1	CCCCTCCGT	GCCAGGTGCC	ACCCTCCCCA	AGCCCTCGCG	CCGCCCTCCGA
ZmAHASL2	CCCCTCCGT	GTC.CGTGGC	ACCCACCCCA	AACCCTCGCG	CCGCCCTCCGA
OsAHASL2				ATGGCTGCCG	CCGCCCGCCG
AtAHASL	ATGGCGGCCG	CAACAACAAC	AACAACAACA	TCTTCTTCGA	TCTCTTCTC
	651				700
SEQ ID số :1	CCCAC	CATGGCTACG	ACCGCCGCCG	CC..GCGGCC	GCCACCTTGT
OsAHASL1.1	CCCAC	CATGGCTACG	ACCGCCGCCG	CC..GCGGCC	GCCACCTTGT
OsAHASL1.2		.ATGGCTACG	ACCGCCGCCG	CC..GCGGCC	GCCACCTTGT
OsAHASL1.4	CACCACCCAC	CATGGCTACG	ACCGCCGCCG	CC..GCGGCC	GCCGCCCTGT
OsAHASL1.6	CACCACCCAC	CATGGCTACG	ACCGCCGCCG	CC..GCGGCC	GCCGCCCTGT
ZmAHASL1	GACAGCCGCC	CGCAACCATG	GCCACCGCCG	CC..ACCGCC	GCCGCCCGCC
ZmAHASL2	GACAGCCG.C	CGCAACCATG	GCCACCGCCG	CC..GCCGCC	TCTACCGCCG
OsAHASL2	CGCCTCACTC	TCCGTCTCCG	AC.GCCGCCG	CTAAGCTGCC	CAAACCGGGA
AtAHASL	CACCAAAC.C	ATCTCCTTCC	TCCTCCAAAT	CACCATTACC	AATCTCCAGA
	701				750
SEQ ID số :1	CCGCCGCCGC	GACGGCCAAG	ACCGGCCGTA	AGAACCACCA	GCGACACCAC
OsAHASL1.1	CCGCCGCCGC	GACGGCCAAG	ACCGGCCGTA	AGAACCACCA	GCGACACCAC
OsAHASL1.2	CCGCCGCCGC	GACGGCCAAG	ACCGGCCGTA	AGAACCACCA	GCGACACCAC
OsAHASL1.4	CCGCCGCCGC	GACGGCCAAG	ACCGGCCGTA	AGAACCACCA	GCGACACCAC
OsAHASL1.6	CCGCCGCCGC	GACGGCCAAG	ACCGGCCGTA	AGAACCACCA	GCGACACCAC
ZmAHASL1	TCACCGGCCG	CACTACCGCT	ACGCCCAAGT	CGAGGCGCCG	AGCCCAACAC
ZmAHASL2	TCCTGGGCGC	CACTACCGCT	GCGCCCAAGG	CGAGGCGCCG	GGCGCAOCTC
OsAHASL2	GGGCAAGTGC	AACGGCGACG	CGACAGGGAT	CCTCCACGCG	TGGATGCTGC
AtAHASL	TTCTCCCTCC	CATTCTCCCT	AAACCCCAAC	AAATCATCCT	CCTCCTCCCG
	751				800
SEQ ID số :1	GTCTT.TCCC	GCTCGAGGCC	GG.GTGGGGG	CGGCGGCGGT	CAGGTGCTCG
OsAHASL1.1	GTCTT.TCCC	GCTCGAGGCC	GG.GTGGGGG	CGGCGGCGGT	CAGGTGCTCG
OsAHASL1.2	GTCTT.TCCC	GCTCGAGGCC	GG.GTGGGGG	CGGCGGCGGT	CAGGTGCTCG
OsAHASL1.4	GTCTT.TCCC	GCTCGAGGCC	GG.GTGGGGG	CGGCGGCGGT	CAGGTGCTCG
OsAHASL1.6	GTCTT.TCCC	GCTCGAGGCC	GG.GTGGGGG	CGGCGGCGGT	CAGGTGCTCG
ZmAHASL1	TTGGC....C	ACCGGCGCGG	CC.CTC...G	CCGCGCCCAT	CAGGTGCTCA
ZmAHASL2	CTGGC....C	ACCGGCGCGG	CC.CTC...G	CCGCGCCCAT	CAGGTGCTCA
OsAHASL2	CGCCT...GC	ACCGGCGACA	GC.CGCCGTC	CCACGCGCGA	GAGGTGCTCG
AtAHASL	CCGCCGCGGT	ATCAATCCCA	GCTCTCCCTC	CTCCATCTCC	GCCGTGCTCA

2/14

Fig. 1 (Tiếp theo)

	851				900
SEQ ID số :1		.GCTCCGGCC	GTGGGGGCCG	GCCGAGCCCC	GCAAGGGCGC
OsAHASL1.1		.GCTCCGGCC	GTGGGGGCCG	GCCGAGCCCC	GCAAGGGCGC
OsAHASL1.2		.GCTCCGGCC	GTGGGGGCCG	GCCGAGCCCC	GCAAGGGCGC
OsAHASL1.4		.GCTCCGGCC	GTGGGGGCCG	GCCGAGCCCC	GCAAGGGCGC
OsAHASL1.6		.GCTCCGGCC	GTGGGGGCCG	GCCGAGCCCC	GCAAGGGCGC
ZmAHASL1		.GCTACGTCC	GTGGGGCCCC	AACGAGCCCC	GCAAGGGCTC
ZmAHASL2		.GCTCCGGCC	GTGGGGCCCC	ACCGATCCCC	GCAAGGGCGC
OsAHASL2	GTGCGCGCGC	CGGTCCGGAC	GCGGGCGCCC	ATGGGGCAGC	GGAAGGGCGC
AtAHASL	CCCGAAACAT	TCATCTCCCG	ATTGCGTCCA	GATCAACCCC	GCAAGGGCGC
	901				950
SEQ ID số :1	GGACATCCTC	GTGGAGGCGC	TGGAGCGGTG	CGGCGTCAGC	GACGTGTTCC
OsAHASL1.1	GGACATCCTC	GTGGAGGCGC	TGGAGCGGTG	CGGCGTCAGC	GACGTGTTCC
OsAHASL1.2	GGACATCCTC	GTGGAGGCGC	TGGAGCGGTG	CGGCGTCAGC	GACGTGTTCC
OsAHASL1.4	GGACATCCTC	GTGGAGGCGC	TGGAGCGGTG	CGGCGTCAGC	GACGTGTTCC
OsAHASL1.6	GGACATCCTC	GTGGAGGCGC	TGGAGCGGTG	CGGCGTCAGC	GACGTGTTCC
ZmAHASL1	CGACATCCTC	GTGGAGGCGC	TGGAGCGGTG	CGGCGTCAGC	GACGTGTTCC
ZmAHASL2	CGACATCCTC	GTGGAGGCGC	TGGAGCGGTG	CGGCGTCAGC	GACGTGTTCC
OsAHASL2	GGACATCCTC	GTGGAGGCGC	TGGAGCGGTG	CGGCGTCAGC	GACGTGTTCC
AtAHASL	TGATATCCTC	GTCGAAGCTT	TAGAACGTCA	AGGCGTAGAA	ACCGTATTCG
	951				1000
SEQ ID số :1	CCTACCCGGG	CGGCGCGTCC	ATGGAGATCC	ACCAGGCGCT	GACGCGCTCC
OsAHASL1.1	CCTACCCGGG	CGGCGCGTCC	ATGGAGATCC	ACCAGGCGCT	GACGCGCTCC
OsAHASL1.2	CCTACCCGGG	CGGCGCGTCC	ATGGAGATCC	ACCAGGCGCT	GACGCGCTCC
OsAHASL1.4	CCTACCCGGG	CGGCGCGTCC	ATGGAGATCC	ACCAGGCGCT	GACGCGCTCC
OsAHASL1.6	CCTACCCGGG	CGGCGCGTCC	ATGGAGATCC	ACCAGGCGCT	GACGCGCTCC
ZmAHASL1	CCTACCCGGG	CGGCGCGTCC	ATGGAGATCC	ACCAGGCGCT	GACGCGCTCC
ZmAHASL2	CCTACCCGGG	CGGCGCGTCC	ATGGAGATCC	ACCAGGCGCT	GACGCGCTCC
OsAHASL2	AGTACCCGGG	CGGCGCGTCC	ATGGAGATCC	ACCAGGCGCT	GACGCGCTCC
AtAHASL	CTTACCCCTG	AGGTGCATCA	ATGGAGATTC	ACCAAGCCTT	ARCCCGCTCT
	1001				1050
SEQ ID số :1	CCGGTCATCA	CCAACCACTT	CTTCCGCCAC	GAGCAGGGCG	AGGCGTTCCG
OsAHASL1.1	CCGGTCATCA	CCAACCACTT	CTTCCGCCAC	GAGCAGGGCG	AGGCGTTCCG
OsAHASL1.2	CCGGTCATCA	CCAACCACTT	CTTCCGCCAC	GAGCAGGGCG	AGGCGTTCCG
OsAHASL1.4	CCGGTCATCA	CCAACCACTT	CTTCCGCCAC	GAGCAGGGCG	AGGCGTTCCG
OsAHASL1.6	CCGGTCATCA	CCAACCACTT	CTTCCGCCAC	GAGCAGGGCG	AGGCGTTCCG
ZmAHASL1	CCCGTCATCG	CCAACCACTT	CTTCCGCCAC	GAACAAGGGG	AGGCCTTTCG
ZmAHASL2	CCCGTCATCG	CCAACCACTT	CTTCCGCCAC	GAACAAGGGG	AGGCCTTTCG
OsAHASL2	CCCGTGATCC	GCAACCACTT	GCTCCGCCAC	GAGCAGGGGG	AGGCCTTTCG
AtAHASL	TCCTCAATCC	GTAACGTCTT	TCCTCGTCAC	GAACAAGGAG	GTGTATTTCG

3/14

Fig. 1 (Tiếp theo)

	1051				1100
SEQ ID số:1	GGCGTCCGGG	TACGCGCGCG	CGTCCGGGCC	CGTCGGGGTC	TGCGTCGCCA
OsAHASL1.1	GGCGTCCGGG	TACGCGCGCG	CGTCCGGGCC	CGTCGGGGTC	TGCGTCGCCA
OsAHASL1.2	GGCGTCCGGG	TACGCGCGCG	CGTCCGGGCC	CGTCGGGGTC	TGCGTCGCCA
OsAHASL1.4	GGCGTCCGGG	TACGCGCGCG	CGTCCGGGCC	CGTCGGGGTC	TGCGTCGCCA
OsAHASL1.6	GGCGTCCGGG	TACGCGCGCG	CGTCCGGGCC	CGTCGGGGTC	TGCGTCGCCA
ZmAHASL1	CGCCTCCGCG	TACGCGCGCT	CCTCGGGCCG	CGTTGGCGTC	TGCATCGCCA
ZmAHASL2	GGCCTCCGGC	TACGCGCGCT	CCTCGGGCCG	CGTCGGCGTC	TGCATCGCCA
OsAHASL2	GGCGTCCGGG	TACGCGCGCT	CGTCGGGGCG	GCCGGGCGTC	TGCGTCGCCA
AtAHASL	AGCAGAAGGA	TACGCTCGAT	CCTCAGGTAA	ACCAGGTATC	TGTATAGCCA
	1101				1150
SEQ ID số:1	CCTCCGGGCC	CGGGGCAACC	AACCTCGTGT	CCGCGCTCGC	CGACCGCGCTG
OsAHASL1.1	CCTCCGGGCC	CGGGGCAACC	AACCTCGTGT	CCGCGCTCGC	CGACCGCGCTG
OsAHASL1.2	CCTCCGGGCC	CGGGGCAACC	AACCTCGTGT	CCGCGCTCGC	CGACCGCGCTG
OsAHASL1.4	CCTCCGGGCC	CGGGGCAACC	AACCTCGTGT	CCGCGCTCGC	CGACCGCGCTG
OsAHASL1.6	CCTCCGGGCC	CGGGGCAACC	AACCTCGTGT	CCGCGCTCGC	CGACCGCGCTG
ZmAHASL1	CCTCCGGGCC	CGGGGCCACC	AACCTAGTCT	CTGCGCTCGC	AGACCGCGTTG
ZmAHASL2	CCTCCGGGCC	CGGGGCCACC	AACCTTGTCT	CCGCGCTCGC	CGACCGCGCTG
OsAHASL2	CCTCCGGGCC	GGGGGCCACC	AACCTCGTGT	CCGCGCTCGC	CGACCGCCAC
AtAHASL	CTTCAGGTCC	CGGAGCTACA	AATCTCGTTA	GCGGATTAGC	CGATGCGTTG
	1151				1200
SEQ ID số:1	CTCGACTCCG	TCCCGATGGT	CGCCATCACG	GGCCAGGTCC	CCCGCCGCGAT
OsAHASL1.1	CTCGACTCCG	TCCCGATGGT	CGCCATCACG	GGCCAGGTCC	CCCGCCGCGAT
OsAHASL1.2	CTCGACTCCG	TCCCGATGGT	CGCCATCACG	GGCCAGGTCC	CCCGCCGCGAT
OsAHASL1.4	CTCGACTCCG	TCCCGATGGT	CGCCATCACG	GGCCAGGTCC	CCCGCCGCGAT
OsAHASL1.6	CTCGACTCCG	TCCCGATGGT	CGCCATCACG	GGCCAGGTCC	CCCGCCGCGAT
ZmAHASL1	CTCGACTCCG	TCCCGATGGT	CGCCATCACG	GGACAGGTGC	CGCGACGCGAT
ZmAHASL2	CTCGATTCCG	TCCCGATGGT	CGCCATCACG	GGACAGGTGC	CGCGACGCGAT
OsAHASL2	CTCGACTCCG	TCCCGCTCGT	CGCCATCACG	GGCCAGGCCG	CGCGCCGCGAT
AtAHASL	TTAGATAGTG	TTCTCTTTGT	AGCAATCACA	GGACAAGTCC	CTCGTCGTAT
	1201				1250
SEQ ID số:1	GATCGGCACC	GACGCCTTCC	AGGAGACGCC	CATAGTCGAG	GTCACCCGCT
OsAHASL1.1	GATCGGCACC	GACGCCTTCC	AGGAGACGCC	CATAGTCGAG	GTCACCCGCT
OsAHASL1.2	GATCGGCACC	GACGCCTTCC	AGGAGACGCC	CATAGTCGAG	GTCACCCGCT
OsAHASL1.4	GATCGGCACC	GACGCCTTCC	AGGAGACGCC	CATAGTCGAG	GTCACCCGCT
OsAHASL1.6	GATCGGCACC	GACGCCTTCC	AGGAGACGCC	CATAGTCGAG	GTCACCCGCT
ZmAHASL1	GATTGGCACC	GACGCCTTTC	AGGAGACGCC	CATCGTCGAG	GTCACCCGCT
ZmAHASL2	GATTGGCACC	GACGCCTTCC	AGGAGACGCC	CATCGTCGAG	GTCACCCGCT
OsAHASL2	GATCGGCACC	GACGCCTTCC	AGGAGACGCC	CATCGTCGAG	TTACCCGCTT
AtAHASL	GATTGGTACA	GATGCCTTTC	AAGAGACTCC	GATTGTTGAG	GTAACCGGTT

4/14

Fig. 1 (Tiếp theo)

	1251				1300
SEQ ID số :1	CCATCACCAA	GCACAATTAC	CTTGTCCTTG	ATGTGGAGGA	CATCCCCCGC
OsAHASL1.1	CCATCACCAA	GCACAATTAC	CTTGTCCTTG	ATGTGGAGGA	CATCCCCCGC
OsAHASL1.2	CCATCACCAA	GCACAATTAC	CTTGTCCTTG	ATGTGGAGGA	CATCCCCCGC
OsAHASL1.4	CCATCACCAA	GCACAATTAC	CTTGTCCTTG	ATGTGGAGGA	CATCCCCCGC
OsAHASL1.6	CCATCACCAA	GCACAATTAC	CTTGTCCTTG	ATGTGGAGGA	CATCCCCCGC
ZmAHASL1	CCATCACCAA	GCACAATTAC	CTTGTCCTTG	ATGTGGAGGA	CATCCCCCGC
ZmAHASL2	CCATCACCAA	GCACAATTAC	CTTGTCCTTG	ATGTGGAGGA	CATCCCCCGC
OsAHASL2	CCATCACCAA	GCACAATTAC	CTTGTCCTTG	ATGTGGAGGA	CATCCCCCGC
AtAHASL	CGATTACGAA	GCATAACTAT	CTTGTCCTTG	ATGTGGAGGA	CATCCCCCGC
	1301				1350
SEQ ID số :1	GTCATACAGG	AAGCCTTCTT	CCTCGCGTCC	TCGGGCCGTC	CTGGCCCCGT
OsAHASL1.1	GTCATACAGG	AAGCCTTCTT	CCTCGCGTCC	TCGGGCCGTC	CTGGCCCCGT
OsAHASL1.2	GTCATACAGG	AAGCCTTCTT	CCTCGCGTCC	TCGGGCCGTC	CTGGCCCCGT
OsAHASL1.4	GTCATACAGG	AAGCCTTCTT	CCTCGCGTCC	TCGGGCCGTC	CTGGCCCCGT
OsAHASL1.6	GTCATACAGG	AAGCCTTCTT	CCTCGCGTCC	TCGGGCCGTC	CTGGCCCCGT
ZmAHASL1	GTCATACAGG	AAGCCTTCTT	CCTCGCGTCC	TCGGGCCGTC	CTGGCCCCGT
ZmAHASL2	GTCATACAGG	AAGCCTTCTT	CCTCGCGTCC	TCGGGCCGTC	CTGGCCCCGT
OsAHASL2	GTCATACAGG	AAGCCTTCTT	CCTCGCGTCC	TCGGGCCGTC	CTGGCCCCGT
AtAHASL	ATTATTGAGG	AAGCCTTCTT	TTTAGCTACT	TCTGGTAGAC	CTGGACCTGT
	1351				1400
SEQ ID số :1	GCTGGTCGAC	ATCCCCAAGG	ACATCCAGCA	GCAGATGGCT	GTGCCAGTCT
OsAHASL1.1	GCTGGTCGAC	ATCCCCAAGG	ACATCCAGCA	GCAGATGGCT	GTGCCAGTCT
OsAHASL1.2	GCTGGTCGAC	ATCCCCAAGG	ACATCCAGCA	GCAGATGGCT	GTGCCAGTCT
OsAHASL1.4	GCTGGTCGAC	ATCCCCAAGG	ACATCCAGCA	GCAGATGGCT	GTGCCAGTCT
OsAHASL1.6	GCTGGTCGAC	ATCCCCAAGG	ACATCCAGCA	GCAGATGGCT	GTGCCAGTCT
ZmAHASL1	GCTGGTCGAC	ATCCCCAAGG	ACATCCAGCA	GCAGATGGCT	GTGCCAGTCT
ZmAHASL2	GCTGGTCGAC	ATCCCCAAGG	ACATCCAGCA	GCAGATGGCT	GTGCCAGTCT
OsAHASL2	GCTGGTCGAC	ATCCCCAAGG	ACATCCAGCA	GCAGATGGCT	GTGCCAGTCT
AtAHASL	TTTGGTTGAT	GTTCCCTAAG	ATATTCAACA	ACAGCTTGCG	ATTCCCTAAT
	1401				1450
SEQ ID số :1	GGGACACCTC	GATGAATCTA	CCGGGGTACA	TTGCACGCCT	GCCCAAGCCA
OsAHASL1.1	GGGACACCTC	GATGAATCTA	CCGGGGTACA	TTGCACGCCT	GCCCAAGCCA
OsAHASL1.2	GGGACACCTC	GATGAATCTA	CCGGGGTACA	TTGCACGCCT	GCCCAAGCCA
OsAHASL1.4	GGGACACCTC	GATGAATCTA	CCGGGGTACA	TTGCACGCCT	GCCCAAGCCA
OsAHASL1.6	GGGACACCTC	GATGAATCTA	CCGGGGTACA	TTGCACGCCT	GCCCAAGCCA
ZmAHASL1	GGGACACCTC	GATGAATCTA	CCGGGGTACA	TTGCACGCCT	GCCCAAGCCA
ZmAHASL2	GGGACACCTC	GATGAATCTA	CCGGGGTACA	TTGCACGCCT	GCCCAAGCCA
OsAHASL2	GGGACACCTC	GATGAATCTA	CCGGGGTACA	TTGCACGCCT	GCCCAAGCCA
AtAHASL	GGGAACAGGC	TATGAGATTA	CCTGGTTATA	TGTCTAGGAT	GCCTAAACCT

5/14

Fig. 1 (Tiếp theo)

	1451		1500
SEQ ID số :1	CCCGCGACAG	AATTGCTTGA	GCAGGTCTTG
OsAHASL1.1	CCCGCGACAG	AATTGCTTGA	GCAGGTCTTG
OsAHASL1.2	CCCGCGACAG	AATTGCTTGA	GCAGGTCTTG
OsAHASL1.4	CCCGCGACAG	AATTGCTTGA	GCAGGTCTTG
OsAHASL1.6	CCCGCGACAG	AATTGCTTGA	GCAGGTCTTG
ZmAHASL1	CCCGCGACTG	AATTTCTTGA	GCAGGTGCTG
ZmAHASL2	CCTGCGACTG	AGTTGCTTGA	GCAGGTGCTG
OsAHASL2	CCGCCCGCCA	ACCTGCTCGA	CGAAGTCATC
AtAHASL	CCGGAAGATT	CTCATTTGGA	GCAGATTGTT
	1501		1550
SEQ ID số :1	GCGCCCCGATT	CTCTATGTCG	GTGGTGGCTG
OsAHASL1.1	GCGCCCCGATT	CTCTATGTCG	GTGGTGGCTG
OsAHASL1.2	GCGCCCCGATT	CTCTATGTCG	GTGGTGGCTG
OsAHASL1.4	GCGCCCCGATT	CTCTATGTCG	GTGGTGGCTG
OsAHASL1.6	GCGCCCCGATT	CTCTATGTCG	GTGGTGGCTG
ZmAHASL1	GCGCCCTGTT	CTTTATGTTG	GCGGTGGCTG
ZmAHASL2	GCGCCCTGTT	CTTTATGTTG	GCGGTGGCTG
OsAHASL2	GAGGCCCGTC	CTCTACGTCG	GCGGCGGGTG
AtAHASL	GAAGCCTGTG	TTGTATGTTG	GTGGTGGTTG
	1551		1600
SEQ ID số :1	TGCGCCGGTT	TGTTGAGCTG	ACCGGCATCC
OsAHASL1.1	TGCGCCGGTT	TGTTGAGCTG	ACCGGCATCC
OsAHASL1.2	TGCGCCGGTT	TGTTGAGCTG	ACCGGCATCC
OsAHASL1.4	TGCGCTGGTT	TGTTGAGCTG	ACTGGTATCC
OsAHASL1.6	TGCGCTGGTT	TGTTGAGCTG	ACTGGTATCC
ZmAHASL1	TGTGCCGCTT	TGTGGAGTTG	ACTGGAATCC
ZmAHASL2	TGCGACGCTT	TGTGGAGCTG	ACTGGAATCC
OsAHASL2	TGCGGCGCTT	CGTGGAGCTG	ACGGGCATCC
AtAHASL	TGGGTAGGTT	TGTTGAGCTT	ACGGGGATCC
	1601		1650
SEQ ID số :1	GGCCTCGGCA	ATTTCCCCAG	TGATGATCCG
OsAHASL1.1	GGCCTCGGCA	ATTTCCCCAG	TGATGATCCG
OsAHASL1.2	GGCCTCGGCA	ATTTCCCCAG	TGATGATCCG
OsAHASL1.4	GGCCTCGGCA	ATTTCCCCAG	TGACGACCCG
OsAHASL1.6	GGCCTCGGCA	ATTTCCCCAG	TGACGACCCG
ZmAHASL1	GGCCTTGGCA	ACTTCCCCAG	CGACGACCCA
ZmAHASL2	GGCCTCGGCA	ACTTCCCCAG	CGACGACCCA
OsAHASL2	GGCATCGGGA	ACTTCCCCAG	CGACGACCCG
AtAHASL	GGGCTGGGAT	CTTATCCTTG	TGATGATGAG

6/14

Fig. 1 (Tiếp theo)

	1651				1700
SEQ ID số:1	GATGCATGGC	ACGGTGTACG	CAAATTATGC	GGTGGATAAG	GCTGACCTGT
OsAHASL1.1	GATGCATGGC	ACGGTGTACG	CAAATTATGC	GGTGGATAAG	GCTGACCTGT
OsAHASL1.2	GATGCATGGC	ACGGTGTACG	CAAATTATGC	GGTGGATAAG	GCTGACCTGT
OsAHASL1.4	GATGCATGGC	ACGGTGTACG	CAAATTATGC	CGTGGATAAG	GCTGACCTGT
OsAHASL1.6	GATGCATGGC	ACGGTGTACG	CAAATTATGC	CGTGGATAAG	GCTGACCTGT
ZmAHASL1	TATGCATGGC	ACAGTGTATG	CAAATTATGC	AGTGGATAAG	GCCGATCTGT
ZmAHASL2	TATGCATGGC	ACGGTGTATG	CAAATTATGC	AGTGGATAAG	GCCGATCTGT
OsAHASL2	GATGCATGGC	ACTGTGTACG	CCAACTACGC	CGTCGACAAC	GCCGACCTCC
AtAHASL	AATGCATGGG	ACGGTGTATG	CGAATTACGC	TGTGGAGCAT	AGTGATTTGT
	1701				1750
SEQ ID số:1	TGCTTGCAAT	TGGCGTGCGG	TTTGATGATC	GTGTGACAGG	GAAAATTGAG
OsAHASL1.1	TGCTTGCAAT	TGGCGTGCGG	TTTGATGATC	GTGTGACAGG	GAAAATTGAG
OsAHASL1.2	TGCTTGCAAT	TGGCGTGCGG	TTTGATGATC	GTGTGACAGG	GAAAATTGAG
OsAHASL1.4	TGCTTGCGTT	TGGTGTGCGG	TTTGATGATC	GTGTGACAGG	GAAAATTGAG
OsAHASL1.6	TGCTTGCGTT	TGGTGTGCGG	TTTGATGATC	GTGTGACAGG	GAAAATTGAG
ZmAHASL1	TGCTTGCAAT	TGGTGTGCGG	TTTGATGATC	GTGTGACAGG	GAAAATTGAG
ZmAHASL2	TGCTTGCACT	TGGTGTGCGG	TTTGATGATC	GTGTGACAGG	GAAGATTGAG
OsAHASL2	TCCTCGCGCT	CGGCGTGCGC	TTCCGACGACC	GCGTCACCGG	CAAAGTCGAG
AtAHASL	TGTTGGCGTT	TGGGCTGAGG	TTTGATGATC	GCGTCACCGG	TAAGCTTCAG
	1751				1800
SEQ ID số:1	GCTTTTGCAA	GCAGGGCCAA	GATTGTGCAC	ATTGACATTG	ATCCAGCGGA
OsAHASL1.1	GCTTTTGCAA	GCAGGGCCAA	GATTGTGCAC	ATTGACATTG	ATCCAGCGGA
OsAHASL1.2	GCTTTTGCAA	GCAGGGCCAA	GATTGTGCAC	ATTGACATTG	ATCCAGCGGA
OsAHASL1.4	GCTTTTGCAA	GCAGGGCCAA	GATTGTGCAC	ATTGACATTG	ATCCAGCAGA
OsAHASL1.6	GCTTTTGCAA	GCAGGGCCAA	GATTGTGCAC	ATTGACATTG	ATCCAGCAGA
ZmAHASL1	GCTTTTGCAAG	GCAGAGCTAA	GATTGTGCAC	ATTGATATTG	ATCCTGCTGA
ZmAHASL2	GCTTTTGCAA	GCAGGGCTAA	GATTGTGCAC	GTTGATATTG	ATCCGGCTGA
OsAHASL2	GCGTTCGCGA	GCAGGGCCAA	GATCGTGCAC	GTCGACATCG	ACCCGTCGGA
AtAHASL	GCTTTTGCTA	GTAGGGCTAA	GATTGTTTCA	ATTGATATTG	ACTCTGCTGA
	1801				1850
SEQ ID số:1	GATTGGAAAG	AACAAGCAAC	CACATGTGTC	AATTTGCGCA	GATGTTAAGC
OsAHASL1.1	GATTGGAAAG	AACAAGCAAC	CACATGTGTC	AATTTGCGCA	GATGTTAAGC
OsAHASL1.2	GATTGGAAAG	AACAAGCAAC	CACATGTGTC	AATTTGCGCA	GATGTTAAGC
OsAHASL1.4	GATTGGAAAG	AACAAGCAAC	CACATGTGTC	AATTTGCGCA	GATGTTAAGC
OsAHASL1.6	GATTGGAAAG	AACAAGCAAC	CACATGTGTC	AATTTGCGCA	GATGTTAAGC
ZmAHASL1	GATTGGCAAG	AACAAGCAGC	CACATGTGTC	CATCTGTGCA	GATGTTAAGC
ZmAHASL2	GATTGGCAAG	AACAAGCAGC	CACATGTGTC	CATCTGTGCA	GATGTTAAGC
OsAHASL2	GCTCGGGAAG	AACAAGCAGC	CGCACGTCTC	CATCTGCGCC	GACGTCRAGC
AtAHASL	GATTGGGAAG	AATAAGACTC	CTCATGTGTC	TGTGTGTGGT	GATGTCRAGC

7/14

Fig. 1 (Tiếp theo)

	1851				1900
SEQ ID số:1	TTGCTTTACA	GGGCTTGAAT	GCTCTGCTAG	ACCA...GAG	CACAACAAAG
OsAHASL1.1	TTGCTTTACA	GGGCTTGAAT	GCTCTGCTAG	ACCA...GAG	CACAACAAAG
OsAHASL1.2	TTGCTTTACA	GGGCTTGAAT	GCTCTGCTAG	ACCA...GAG	CACAACAAAG
OsAHASL1.4	TTGCTTTACA	GGGCTTGAAT	GCTCTGCTAC	AACA...GAG	CACAACAAAG
OsAHASL1.6	TTGCTTTACA	GGGCTTGAAT	GCTCTGCTAC	AACA...GAG	CACAACAAAG
ZmAHASL1	TTGCTTTGCA	GGGCATGAAT	ACTCTTCTTG	AAGG...AAG	CACATCAAAG
ZmAHASL2	TTGCTTTGCA	GGGCATGAAT	GCTCTTCTTG	AAGG...AAG	CACATCAAAG
OsAHASL2	TCGCCCTGCA	GGGCATGAAC	GCGATGCTTG	AAGAACAGAG	CGCCGCCGCC
AtAHASL	TGGCTTTGCA	AGGCATGAAT	AAGCTTCTTG	AGAA...CCGAG	CTGAGGAGC.
	1901				1950
SEQ ID số:1	ACAAGTT...	..CTG.ATTT	TAGTGCCTGG	CACAATGAGT	TGGACCAGCA
OsAHASL1.1	ACAAGTT...	..CTG.ATTT	TAGTGCCTGG	CACAATGAGT	TGGACCAGCA
OsAHASL1.2	ACAAGTT...	..CTG.ATTT	TAGTGCCTGG	CACAATGAGT	TGGACCAGCA
OsAHASL1.4	ACAAGTT...	..CTG.ATTT	TAGTGCCTGG	CACAATGAGT	TGGACCAGCA
OsAHASL1.6	ACAAGTT...	..CTG.ATTT	TAGTGCCTGG	CACAATGAGT	TGGACCAGCA
ZmAHASL1	AAGAGCT...	..TTG.ACCT	CGGCTCATGG	CATGATGAAT	TGGATCAGCA
ZmAHASL2	AAGAGCT...	..TTG.ACCT	TGGCTCATGG	AACGATGAGT	TGGATCAGCA
OsAHASL2	GCGCGCAAGA	ACCTCGATTT	CAGCGCGTGG	CGCTCGGAGC	TGGAGAAGAA
AtAHASL	TTAAGCT...	...TG.ATTT	TGGAGTTTGG	AGGAATGAGT	TGAACGTACA
	1951				2000
SEQ ID số:1	GAAGAGGGAG	TTTCCTCTGG	GGTACAAGAC	TTTTGGTGAA	GAGATCCCAC
OsAHASL1.1	GAAGAGGGAG	TTTCCTCTGG	GGTACAAGAC	TTTTGGTGAA	GAGATCCCAC
OsAHASL1.2	GAAGAGGGAG	TTTCCTCTGG	GGTACAAGAC	TTTTGGTGAA	GAGATCCCAC
OsAHASL1.4	GAAGAGGGAG	TTTCCTCTGG	GGTACAAAAC	TTTTGGTGAA	GAGATCCCAC
OsAHASL1.6	GAAGAGGGAG	TTTCCTCTGG	GGTACAAAAC	TTTTGGTGAA	GAGATCCCAC
ZmAHASL1	AAAGAGGGAG	TTTCCCCCTG	GATATAAAAT	CTTCAATGAG	GAAATCCAGC
ZmAHASL2	GAAGAGGGAA	TTCCCCCTTG	GGTATAAAAC	ATCTAATGAG	GAGATCCAGC
OsAHASL2	GAAGGTCGAG	TTCCCCACTG	GCTACAGAAC	GTTCCGCCGAG	GAGATCCCGC
AtAHASL	GAAACAGAAG	TTTCCGTTGA	GCTTTAAGAC	GTTTGGGGAA	GCTATTCCCTC
	2001				2050
SEQ ID số:1	CGCAATATGC	TATTCAGGTG	CTGGATGAGC	TGACGAAAGG	GGAGGCAATC
OsAHASL1.1	CGCAATATGC	TATTCAGGTG	CTGGATGAGC	TGACGAAAGG	GGAGGCAATC
OsAHASL1.2	CGCAATATGC	TATTCAGGTG	CTGGATGAGC	TGACGAAAGG	GGAGGCAATC
OsAHASL1.4	CGCAATATGC	CATTCAGGTG	CTGGATGAGC	TGACGAAAGG	TGAGGCAATC
OsAHASL1.6	CGCAATATGC	CATTCAGGTG	CTGGATGAGC	TGACGAAAGG	TGAGGCAATC
ZmAHASL1	CACAATATGC	TATTCAGGTT	CTTGATGAGT	TGACGAAAGG	GGAGGCCATC
ZmAHASL2	CACAATATGC	TATTCAGGTT	CTTGATGAGC	TGACGAAAGG	CGAGGCCATC
OsAHASL2	CGCAATATGC	CATTCAGGTG	CTCGACGAGG	TCACCAACGG	GGAGGCCATC
AtAHASL	CACAGTATGC	GATTAAGGTC	CTTGATGAGT	TGACTGATGG	AAAAGCCATA

8/14

Fig. 1 (Tiếp theo)

	2051				2100
SEQ ID số :1	ATCGCTACTG	GTGTTGGACA	GCACCAGATG	TGGGCGGCAC	AATATTACAC
OsAHASL1.1	ATCGCTACTG	GTGTTGGACA	GCACCAGATG	TGGGCGGCAC	AATATTACAC
OsAHASL1.2	ATCGCTACTG	GTGTTGGACA	GCACCAGATG	TGGGCGGCAC	AATATTACAC
OsAHASL1.4	ATCGCTACTG	GTGTTGGGCA	GCACCAGATG	TGGGCGGCAC	AATATTACAC
OsAHASL1.6	ATCGCTACTG	GTGTTGGGCA	GCACCAGATG	TGGGCGGCAC	AATATTACAC
ZmAHASL1	ATTGCCACAG	GTGTTGGGCA	GCACCAGATG	TGGGCGGCAC	AGTATTACAC
ZmAHASL2	ATCGGCACAG	GTGTTGGGCA	GCACCAGATG	TGGGCGGCAC	AGTACTACAC
OsAHASL2	GTCCGCCAGG	GCGTCGGGCA	GCACCAGATG	TGGGCGGCAC	AGCACTACAC
AtAHASL	ATAAGTACTG	GTGTCGGGCA	ACATCAAATG	TGGGCGGCAC	AGTTCTACAA
	2101				2150
SEQ ID số :1	CTACAAGCGG	CCACGGCAGT	GGCTGTCTTC	GGCTGGTCTG	GGCGCAATGG
OsAHASL1.1	CTACAAGCGG	CCACGGCAGT	GGCTGTCTTC	GGCTGGTCTG	GGCGCAATGG
OsAHASL1.2	CTACAAGCGG	CCACGGCAGT	GGCTGTCTTC	GGCTGGTCTG	GGCGCAATGG
OsAHASL1.4	CTACAAGCGG	CCACGGCAGT	GGCTGTCTTC	GGCTGGTCTG	GGCGCAATGG
OsAHASL1.6	CTACAAGCGG	CCACGGCAGT	GGCTGTCTTC	GGCTGGTCTG	GGCGCAATGG
ZmAHASL1	TTACAAGCGG	CCAAGGCAGT	GGCTGTCTTC	AGCTGGTCTT	GGGGCTATGG
ZmAHASL2	TTACAAGCGG	CCAAGGCAGT	GGTTGTCTTC	AGCTGGTCTT	GGGGCTATGG
OsAHASL2	CTACAGGAGG	CCCAGGCAGT	GGCTCTCGTC	CGCCGGGCTG	GGGGCTATGG
AtAHASL	TTACAAGCAAG	CCAAGGCAGT	GGCTATCATC	AGGAGGCCTT	GGAGCTATGG
	2151				2200
SEQ ID số :1	GATTTGGGCT	GCCTGCTGCA	GCTGGTGCTT	CTGTGGCTAA	CCCAGGTGTC
OsAHASL1.1	GATTTGGGCT	GCCTGCTGCA	GCTGGTGCTT	CTGTGGCTAA	CCCAGGTGTC
OsAHASL1.2	GATTTGGGCT	GCCTGCTGCA	GCTGGTGCTT	CTGTGGCTAA	CCCAGGTGTC
OsAHASL1.4	GATTTGGGCT	GCCTGCTGCA	GCTGGTGCTT	CTGTGGCTAA	CCCAGGTGTC
OsAHASL1.6	GATTTGGGCT	GCCTGCTGCA	GCTGGTGCTT	CTGTGGCTAA	CCCAGGTGTC
ZmAHASL1	GATTTGGTTT	GCCGGCTGCT	GCTGGTGCTG	CTGTGGCCAA	CCCAGGTGTC
ZmAHASL2	GATTTGGTTT	GCCGGCTGCT	GCTGGTGCTT	CTGTGGCCAA	CCCAGGTGTT
OsAHASL2	GCTTCGGCCT	GCCTGCCBCC	GCGGGCGCCG	CGGTGGCCAA	CCCGGGCGCC
AtAHASL	GTTTGGGACT	TCCTGCTGCC	ATTGGAGCGT	CTGTTGCTAA	CCCTGATGCA
	2201				2250
SEQ ID số :1	ACAGTTGTTG	ATATTGATGG	GGATGGTAGC	TTCTTCATGA	ACATTCAGGA
OsAHASL1.1	ACAGTTGTTG	ATATTGATGG	GGATGGTAGC	TTCTTCATGA	ACATTCAGGA
OsAHASL1.2	ACAGTTGTTG	ATATTGATGG	GGATGGTAGC	TTCTTCATGA	ACATTCAGGA
OsAHASL1.4	ACAGTTGTTG	ATATTGATGG	GGATGGTAGC	TTCTTCATGA	ACATTCAGGA
OsAHASL1.6	ACAGTTGTTG	ATATTGATGG	GGATGGTAGC	TTCTTCATGA	ACATTCAGGA
ZmAHASL1	ACTGTTGTTG	ACATCGACGG	AGATGGTAGC	TTCTTCATGA	ACATTCAGGA
ZmAHASL2	ACTGTTGTTG	ACATCGACGG	AGATGGTAGC	TTCTTCATGA	ACATTCAGGA
OsAHASL2	ACCGTGGTCC	ACATCGACGG	CGACGGCAGC	CTCCTGATGA	ACATTCAGGA
AtAHASL	ATAGTTGTGC	ATATTGACGG	AGATGGAAGC	TTTATAATGA	ATGTGCAAGA

9/14

Fig. 1 (Tiếp theo)

	2251				2300
SEQ ID số:1	GTTGGCATTG	ATCCGCATTG	AGAACCCTCCC	GGTGAAGGTG	ATGGTGTTGA
OsAHASL1.1	GTTGGCATTG	ATCCGCATTG	AGAACCCTCCC	GGTGAAGGTG	ATGGTGTTGA
OsAHASL1.2	GTTGGCATTG	ATCCGCATTG	AGAACCCTCCC	GGTGAAGGTG	ATGGTGTTGA
OsAHASL1.4	GCTGGCATTG	ATCCGCATTG	AGAACCCTCCC	TGTGAAGGTG	ATGGTGTTGA
OsAHASL1.6	GCTGGCATTG	ATCCGCATTG	AGAACCCTCCC	TGTGAAGGTG	ATGGTGTTGA
ZmAHASL1	GCTAGCTATG	ATCCGTATTG	AGAACCCTCCC	AGTCAAGGTC	TTTGTGCTAA
ZmAHASL2	GCTAGCTATG	ATCCGAATTG	AGAACCCTCCC	GGTGAAGGTC	TTTGTGCTAA
OsAHASL2	GCTCGCCATG	GTCCGCGTGG	AGGACCTGCC	GGTGAAGGTG	ATGGTGCTGA
AtAHASL	GCTGGCCACA	ATCCGTGTAG	AGCAACTTCC	AGTGAAGATA	CTCTTATTAA
	2301				2350
SEQ ID số:1	ACAACCAACA	TTTGGGTATG	GTTGTGCAAT	GGGAGGATAG	GTTTTACAAG
OsAHASL1.1	ACAACCAACA	TTTGGGTATG	GTTGTGCAAT	GGGAGGATAG	GTTTTACAAG
OsAHASL1.2	ACAACCAACA	TTTGGGTATG	GTTGTGCAAT	GGGAGGATAG	GTTTTACAAG
OsAHASL1.4	ACAACCAACA	TTTGGGTATG	GTTGTGCAAT	GGGAGGATAG	GTTTTACAAG
OsAHASL1.6	ACAACCAACA	TTTGGGTATG	GTTGTGCAAT	TGGAGGATAG	GTTTTACAAG
ZmAHASL1	ACAACCAGCA	CCTCGGGATG	GTGGTGCAAT	GGGAGGACAG	GTTCTATAAG
ZmAHASL2	ACAACCAGCA	CCTGGGGATG	GTGGTGCAAT	GGGAGGACAG	GTTCTATAAG
OsAHASL2	ACAACCAGCA	CCTGGGCATG	GTGGTGCAAT	GGGAGGACAG	GTTCTACGAC
AtAHASL	ACAACCAGCA	TCTTGGCATG	GTTATGCAAT	GGGAAGATCG	GTTCTACAAG
	2351				2400
SEQ ID số:1	GCAAATAGGG	CGCATACATA	CTTGGGCAAC	CCAG.....	AATGTGAGAG
OsAHASL1.1	GCAAATAGGG	CGCATACATA	CTTGGGCAAC	CCAG.....	AATGTGAGAG
OsAHASL1.2	GCAAATAGGG	CGCATACATA	CTTGGGCAAC	CCAG.....	AATGTGAGAG
OsAHASL1.4	GCGAATAGGG	CGCATACATA	CTTGGGCAAC	CCGG.....	AATGTGAGAG
OsAHASL1.6	GCGAATAGGG	CGCATACATA	CTTGGGCAAC	CCGG.....	AATGTGAGAG
ZmAHASL1	GCCAAATAGAG	CACACACATT	CTTGGGAAAC	CCAG.....	AGAACGAAAG
ZmAHASL2	GCCAACAGAG	CGCACACATA	CTTGGGAAAC	CCAG.....	AGAATGAAAG
OsAHASL2	GCCAACAGGG	CGCACACCTA	CCTCGGCAAC	CCGGCGGCGA	ACGGCGGCGG
AtAHASL	GCTAACCGAG	CTCACACATT	TCTCGGGGAT	CCGG.....	CTCAGGAGGA
	2401				2450
SEQ ID số:1	TGAGATATAT	CCAGATTTTG	TGACTATTGC	TAAAGGGTTC	AATATTCCTG
OsAHASL1.1	TGAGATATAT	CCAGATTTTG	TGACTATTGC	TAAAGGGTTC	AATATTCCTG
OsAHASL1.2	TGAGATATAT	CCAGATTTTG	TGACTATTGC	TAAAGGGTTC	AATATTCCTG
OsAHASL1.4	CGAGATATAT	CCAGATTTTG	TGACTATTGC	TAAGGGGTTC	AATATTCCTG
OsAHASL1.6	CGAGATATAT	CCAGATTTTG	TGACTATTGC	TAAGGGGTTC	AATATTCCTG
ZmAHASL1	TGAGATATAT	CCAGATTTTG	TGGCAATTGC	TAAAGGGTTC	AACATTCCAG
ZmAHASL2	TGAGATATAT	CCAGATTTCG	TGACGATCGC	CAAAGGGTTC	AACATTCCAG
OsAHASL2	CGAGGTGTAC	CCGGACTTCG	TGACGATCGC	CGGAGGCTTC	GGCATCCCGG
AtAHASL	CGAGATATTG	CCGAACATGT	TGCTGTTTGC	AGCAGCTTGC	GGGATTCCAG

10/14

Fig. 1 (Tiếp theo)

	2451				2500
SEQ ID số:1	CAGTCCGTGT	AACAAAGAAG	AGTGAAGTCC	GTGCCGCCAT	CAAGAAGATG
OsAHASL1.1	CAGTCCGTGT	AACAAAGAAG	AGTGAAGTCC	GTGCCGCCAT	CAAGAAGATG
OsAHASL1.2	CAGTCCGTGT	AACAAAGAAG	AGTGAAGTCC	GTGCCGCCAT	CAAGAAGATG
OsAHASL1.4	CAGTCCGTGT	AACAAAGAAG	AGTGAAGTCC	GTGCCGCCAT	CAAGAAGATG
OsAHASL1.6	CAGTCCGTGT	AACAAAGAAG	AGTGAAGTCC	GTGCCGCCAT	CAAGAAGATG
ZmAHASL1	CAGTCCGTGT	GACAAAGAAG	AGCGAAGTCC	ATGCAGCAAT	CAAGAAGATG
ZmAHASL2	CGGTCCGTGT	GACAAAGAAG	AACGAAGTCC	CCGCAGCGAT	AAAGAAGATG
OsAHASL2	CGGCCCGCGT	GACGAGGAAG	GGCGAGGTCC	GGCCCGCGGT	CGAGGAGATG
AtAHASL	CGGCGAGGGT	GACAAAGAAA	GCAGATCTCC	GAGAAGCTAT	TCAGACAATG
	2501				2550
SEQ ID số:1	CTCGATACCC	CAGGGCCATA	CTTGTTGGAT	ATCATCGTCC	CACACCAGGA
OsAHASL1.1	CTCGATACCC	CAGGGCCATA	CTTGTTGGAT	ATCATCGTCC	CACACCAGGA
OsAHASL1.2	CTCGATACCC	CAGGGCCATA	CTTGTTGGAT	ATCATCGTCC	CACACCAGGA
OsAHASL1.4	CTCGAGACTC	CAGGGCCATA	CTTGTTGGAT	ATCATCGTCC	CGCACCAGGA
OsAHASL1.6	CTCGAGACTC	CAGGGCCATA	CTTGTTGGAT	ATCATCGTCC	CGCACCAGGA
ZmAHASL1	CTTGAGGCTC	CAGGGCCGTA	CCTCTTGGAT	ATAATCGTCC	CGCACCAGGA
ZmAHASL2	CTCGAGACTC	CAGGGCCGTA	CCTCTTGGAT	ATAATCGTCC	CACACCAGGA
OsAHASL2	ATGGCGGCGC	CGGGGCCGTA	CCTGCTGGAC	GTGTCGTGC	CTCACCAGGA
AtAHASL	CTGGATACAC	CAGGACCTTA	CCTGTTGGAT	GTGATTTGTC	CGCACCAGGA
	2551				2600
SEQ ID số:1	GCATGTGCTG	CCTATGATCC	CAAGTGGGGG	CGCATTCAAG	GACATGATCC
OsAHASL1.1	GCATGTGCTG	CCTATGATCC	CAAGTGGGGG	CGCATTCAAG	GACATGATCC
OsAHASL1.2	GCATGTGCTG	CCTATGATCC	CAAGTGGGGG	CGCATTCAAG	GACATGATCC
OsAHASL1.4	GCATGTGCTG	CCTATGATCC	CAAGTGGGGG	CGCATTCAAG	GACATGATCC
OsAHASL1.6	GCATGTGCTG	CCTATGATCC	CAAGTGGGGG	CGCATTCAAG	GACATGATCC
ZmAHASL1	GCATGTGTTG	CCTATGATCC	CTAGTGGTGG	GGCTTTCAAG	GATATGATCC
ZmAHASL2	GCATGTGTTG	CCTATGATCC	CTAGTGGTGG	GGCTTTCAAG	GATATGATCC
OsAHASL2	GCACGTGCTG	CCGATGATCC	CCAGCAATGG	CGCTTTCAAG	GACATTATCG
AtAHASL	ACATGTGTTG	CCGATGATCC	CGAGTGGTGG	CACTTTCAAC	GATGTCTATA
	2601				2650
SEQ ID số:1	TGGATGGTGA	TGGCAGGACT	GTGTATTAAAT	CTATA.ATCT	GTATGTTGGC
OsAHASL1.1	TGGATGGTGA	TGGCAGGACT	GTGTATTAAAT	CTATA.ATCT	GTATGTTGGC
OsAHASL1.2	TGGATGGTGA	TGGCAGGACT	GTGTATTAAAT	CTATA.ATCT	GTATGTTGGC
OsAHASL1.4	TGGATGGTGA	TGGCAGGACT	GTGTATTAAAT	CTATA.ATCT	GTATGTTGGC
OsAHASL1.6	TGGATGGTGA	TGGCAGGACT	GTGTATTAAAT	CTATA.ATCT	GTATGTTGGC
ZmAHASL1	TGGATGGTGA	TGGCAGGACT	GTGTATTGAT	CCGTTGA.CT	GCAGGTCGAC
ZmAHASL2	TGGATGGTGA	TGGCAGGACT	GTGTACTGAT	CTAAAATCCA	GCAAGCAACT
OsAHASL2	TGGACGGTGA	TGGCCGGAGT	TCGTATTAG.		
AtAHASL	CGGAAGGAGA	TGGCCGGATT	AAATACTGA.		

11/14

Fig. 2

```

1                               50
SEQ ID s6:2  ....MATTAA AAAATLSAAA TAKTGRKNHQ RHHVFPARGR VGAAA.....
OsAHASL1.1  ....MATTAA AAAATLSAAA TAKTGRKNHQ RHHVFPARGR VGAAA.....
OsAHASL1.2  ....MATTAA AAAATLSAAA TAKTGRKNHQ RHHVFPARGR VGAAA.....
OsAHASL1.4  ....MATTAA AAAAALSAAA TAKTGRKNHQ RHHVLPARGR VGAAA.....
OsAHASL1.6  ....MATTAA AAAAALSAAA TAKTGRKNHQ RHHVLPARGR VGAAA.....
ZmAHASL1    ....MATAAT AAAALT GATTATPKSR RRAHHLATRR ALAAP.....
ZmAHASL2    ....MATAAA ASTALT GATTAAPKAR RRAHLLATRR ALAAP.....
OsAHASL2    ....MAAAAA AASLSVSDAA AKLPKPGGQV QRRRDRDRFPR VDAAACTRDS
AtAHASL     ....MAAATT TTTTSSSISF STKPSPPSSSK SPLPISRFSL PFSLNPNKSS

51                               100
SEQ ID s6:2  ..... .VRCSAVSPV TPPSPAPPAT PLRPWGPAP
OsAHASL1.1  ..... .VRCSAVSPV TPPSPAPPAT PLRPWGPAP
OsAHASL1.2  ..... .VRCSAVSPV TPPSPAPPAT PLRPWGPAP
OsAHASL1.4  ..... .VRCSAVSPV TPPSPAPPAT PLRPWGPAP
OsAHASL1.6  ..... .VRCSAVSPV TPPSPAPPAT PLRPWGPAP
ZmAHASL1    ..... .IRCSALSRA TPT. .APPAT PLRPWGPNEP
ZmAHASL2    ..... .IRCSAASPA MPM. .APPAT PLRPWGPPTDP
OsAHASL2    RRPTRERC. . . . . STTVSLAATA TATTATPVRA PVRTRAPMGQ
AtAHASL     SSSRRRGIKS SSPSSISAVL NTTTNVTTTP SPTKPTKPET FISRFAPDQP

101                               150
SEQ ID s6:2  RKGADILVEA LERCGVSDVF AYPGGASMEI HQALTRSPVI TNHLFRHEQG
OsAHASL1.1  RKGADILVEA LERCGVSDVF AYPGGASMEI HQALTRSPVI TNHLFRHEQG
OsAHASL1.2  RKGADILVEA LERCGVSDVF AYPGGASMEI HQALTRSPVI TNHLFRHEQG
OsAHASL1.4  RKGADILVEA LERCGVSDVF AYPGGASMEI HQALTRSPVI TNHLFRHEQG
OsAHASL1.6  RKGADILVEA LERCGVSDVF AYPGGASMEI HQALTRSPVI TNHLFRHEQG
ZmAHASL1    RKGSDILVEA LERCGVRDVF AYPGGASMEI HQALTRSPVI ANHLFRHEQG
ZmAHASL2    RKGADILVES LERCGVRDVF AYPGGASMEI HQALTRSPVI ANHLFRHEQG
OsAHASL2    RKGADIVVEA LERCGVRDVF EYPGGASMEI HQALTRSPVI RNHLFRHEQG
AtAHASL     RKGADILVEA LERQGVETVF AYPGGASMEI HQALTRSSI RNVLPRHEQG

151                               200
SEQ ID s6:2  EAFAASGYAR ASGRVGVCVA TSGPGATNLV SALADALLDS VPMVAITGQV
OsAHASL1.1  EAFAASGYAR ASGRVGVCVA TSGPGATNLV SALADALLDS VPMVAITGQV
OsAHASL1.2  EAFAASGYAR ASGRVGVCVA TSGPGATNLV SALADALLDS VPMVAITGQV
OsAHASL1.4  EAFAASGYAR ASGRVGVCVA TSGPGATNLV SALADALLDS VPMVAITGQV
OsAHASL1.6  EAFAASGYAR ASGRVGVCVA TSGPGATNLV SALADALLDS VPMVAITGQV
ZmAHASL1    EAFAASAYAR ASGRVGVCIA TSGPGATNLV SALADALLDS VPMVAITGQV
ZmAHASL2    EAFAASGYAR SSGRVGVCIA TSGPGATNLV SALADALLDS VPMVAITGQV
OsAHASL2    EAFAASGYAR SSGRPGVCVA TSGPGATNLV SALADAHLDS VPLVAITGQA
AtAHASL     GVFAABGYAR SSGKPGICIA TSGPGATNLV SGLADALLDS VPLVAITGQV

```

12/14

Fig. 2 (Tiếp theo)

	201				250
SEQ ID số :2	PRRMIGTDV	QETPIVEVTR	SITKHNYLVL	DVEDIPRVIQ	EAFFLASSGR
OsAHASL1.1	PRRMIGTDAF	QETPIVEVTR	SITKHNYLVL	DVEDIPRVIQ	EAFFLASSGR
OsAHASL1.2	PRRMIGTDAF	QETPIVEVTR	SITKHNYLVL	DVEDIPRVIQ	EAFFLASSGR
OsAHASL1.4	PRRMIGTDAF	QETPIVEVTR	SITKHNYLVL	DVEDIPRVIQ	EAFFLASSGR
OsAHASL1.6	PRRMIGTDAF	QETPIVEVTR	SITKHNYLVL	DVEDIPRVIQ	EAFFLASSGR
ZmAHASL1	PRRMIGTDAF	QETPIVEVTR	SITKHNYLVL	DVDDIPRVVQ	EAFFLASSGR
ZmAHASL2	PRRMIGTDAF	QETPIVEVTR	SITKHNYLVL	DVDDIPRVVQ	EAFFLASSGR
OsAHASL2	PRRMIGTDAF	QETPIVEFTR	SITKHNYLIL	DVDDIPRVIN	EAFFLASTGR
AtAHASL	PRRMIGTDAF	QETPIVEVTR	SITKHNYLVM	DVEDIPRIIE	EAFFLATSGR
	251				300
SEQ ID số :2	PGPVLVDIPK	DIQQQMAVPV	WDTSMNLPGY	IARLPKPPAT	ELLEQVLRV
OsAHASL1.1	PGPVLVDIPK	DIQQQMAVPV	WDTSMNLPGY	IARLPKPPAT	ELLEQVLRV
OsAHASL1.2	PGPVLVDIPK	DIQQQMAVPV	WDTSMNLPGY	IARLPKPPAT	ELLEQVLRV
OsAHASL1.4	PGPVLVDIPK	DIQQQMAVPV	WDTSMNLPGY	IARLPKPPAT	ELLEQVLRV
OsAHASL1.6	PGPVLVDIPK	DIQQQMAVPV	WDTSMNLPGY	IARLPKPPAT	ELLEQVLRV
ZmAHASL1	PGPVLVDIPK	DIQQQMAVEA	WDTFMSLPGY	IARLPKPPAT	EFLEQVLRV
ZmAHASL2	PGPVLVDIPK	DIQQQMAVPV	WDKFMSPGY	IARLPKPPAT	ELLEQVLRV
OsAHASL2	PGPVLVDIPK	DIQQQMAVPS	WDAPMRLPGY	ISRLPKPPAA	NLLDEVIRLV
AtAHASL	PGPVLVDVPK	DIQQQLAIPN	WEQAMRLPGY	MSRMPKPPED	SHLEQIVRLI
	301				350
SEQ ID số :2	GESRRPILYV	GGGCSASGDE	LRRFVELTGI	PVTTTTLMGLG	NFPSDDPLSL
OsAHASL1.1	GESRRPILYV	GGGCSASGDE	LRRFVELTGI	PVTTTTLMGLG	NFPSDDPLSL
OsAHASL1.2	GESRRPILYV	GGGCSASGDE	LRRFVELTGI	PVTTTTLMGLG	NFPSDDPLSL
OsAHASL1.4	GESRRPILYV	GGGCSASGDE	LRRFVELTGI	PVTTTTLMGLG	NFPSDDPLSL
OsAHASL1.6	GESRRPILYV	GGGCSASGDE	LRRFVELTGI	PVTTTTLMGLG	NFPSDDPLSL
ZmAHASL1	GESRRPVLYV	GGGCAASGEE	LCRFVELTGI	PVTTTTLMGLG	NFPSDDPLSL
ZmAHASL2	GESRRPVLYV	GGGCAASGEE	LRRFVELTGI	PVTTTTLMGLG	NFPSDDPLSL
OsAHASL2	GDAERPVLVY	GGGCSASGYE	LRRFVELTGI	PVTTTTLMGIG	NFPSDDPLSL
AtAHASL	SESKKPVLYV	GGGCLNSSDE	LGRFVELTGI	PVASTLMGLG	SYPCDELDSL
	351				400
SEQ ID số :2	RMLGMHGTIV	ANYAVDKADL	LLAFGVRFDD	RVTGKIEAFA	SRAKIVHIDI
OsAHASL1.1	RMLGMHGTIV	ANYAVDKADL	LLAFGVRFDD	RVTGKIEAFA	SRAKIVHIDI
OsAHASL1.2	RMLGMHGTIV	ANYAVDKADL	LLAFGVRFDD	RVTGKIEAFA	SRAKIVHIDI
OsAHASL1.4	RMLGMHGTIV	ANYAVDKADL	LLAFGVRFDD	RVTGKIEAFA	SRAKIVHIDI
OsAHASL1.6	RMLGMHGTIV	ANYAVDKADL	LLAFGVRFDD	RVTGKIEAFA	SRAKIVHIDI
ZmAHASL1	RMLGMHGTIV	ANYAVDKADL	LLAFGVRFDD	RVTGKIEAFA	GRAKIVHIDI
ZmAHASL2	RMLGMHGTIV	ANYAVDKADL	LLALGVRFDD	RVTGKIEAFA	SRAKIVHVDI
OsAHASL2	RMLGMHGTIV	ANYAVDNADL	LLALGVRFDD	RVTGKVEAFA	SRAKIVHVDI
AtAHASL	HMLGMHGTIV	ANYAVEHSDL	LLAFGVRFDD	RVTGKLEAFA	SRAKIVHIDI

13/14

Fig. 2 (Tiếp theo)

	401				450
SEQ ID số:	2	DPAEIGKNKQ	PHVSICADV	LALQGLNALL	D...QSTTKT SSDFSAWHNE
OsAHASL1.1		DPAEIGKNKQ	PHVSICADV	LALQGLNALL	D...QSTTKT SSDFSAWHNE
OsAHASL1.2		DPAEIGKNKQ	PHVSICADV	LALQGLNALL	D...QSTTKT SSDFSAWHNE
OsAHASL1.4		DPAEIGKNKQ	PHVSICADV	LALQGLNALL	Q...QSTTKT SSDFSAWHNE
OsAHASL1.6		DPAEIGKNKQ	PHVSICADV	LALQGLNALL	Q...QSTTKT SSDFSAWHNE
ZmAHASL1		DPAEIGKNKQ	PHVSICADV	LALQGMNTLL	E...GSTSKK SPDFGSHWDE
ZmAHASL2		DPAEIGKNKQ	PHVSICADV	LALQGMNALL	E...GSTSKK SPDFGSHWDE
OsAHASL2		DPSELGKNKQ	PHVSICADV	LALQGMNALL	EQSAAAARK NLDFAWRSE
AtAHASL		DSAEIGKNKT	PHVSVCGDV	LALQGMNKVL	E...NRAEEL KLDFGVWRNE
	451				500
SEQ ID số:	2	LDQKREFPL	GYKTFGEIP	PQYAIQVLDE	LTKGEAIIAT GVGQHQMWA
OsAHASL1.1		LDQKREFPL	GYKTFGEIP	PQYAIQVLDE	LTKGEAIIAT GVGQHQMWA
OsAHASL1.2		LDQKREFPL	GYKTFGEIP	PQYAIQVLDE	LTKGEAIIAT GVGQHQMWA
OsAHASL1.4		LDQKREFPL	GYKTFGEIP	PQYAIQVLDE	LTKGEAIIAT GVGQHQMWA
OsAHASL1.6		LDQKREFPL	GYKTFGEIP	PQYAIQVLDE	LTKGEAIIAT GVGQHQMWA
ZmAHASL1		LDQKREFPL	GYKTFGEIP	PQYAIQVLDE	LTKGEAIIAT GVGQHQMWA
ZmAHASL2		LDQKREFPL	GYKTFGEIP	PQYAIQVLDE	LTKGEAIIAT GVGQHQMWA
OsAHASL2		LEKKKVEFPL	GYRTFGEIP	PQYAIQVLDE	VTNGEAIIVAT GVGQHQMWA
AtAHASL		LNVQKQKFPL	SPKTFGEIP	PQYAIQVLDE	LTDGKAIIAT GVGQHQMWA
	501				550
SEQ ID số:	2	QYYTYKRPRQ	WLSSAGLGAM	GFGLPAAAGA	SVANPGVTVV DIDGDGSFLM
OsAHASL1.1		QYYTYKRPRQ	WLSSAGLGAM	GFGLPAAAGA	SVANPGVTVV DIDGDGSFLM
OsAHASL1.2		QYYTYKRPRQ	WLSSAGLGAM	GFGLPAAAGA	SVANPGVTVV DIDGDGSFLM
OsAHASL1.4		QYYTYKRPRQ	WLSSAGLGAM	GFGLPAAAGA	SVANPGVTVV DIDGDGSFLM
OsAHASL1.6		QYYTYKRPRQ	WLSSAGLGAM	GFGLPAAAGA	SVANPGVTVV DIDGDGSFLM
ZmAHASL1		QYYTYKRPRQ	WLSSAGLGAM	GFGLPAAAGA	AVANPGVTVV DIDGDGSFLM
ZmAHASL2		QYYTYKRPRQ	WLSSAGLGAM	GFGLPAAAGA	SVANPGVTVV DIDGDGSFLM
OsAHASL2		QHYTYRRPRQ	WLSSAGLGAM	GFGLPAAAGA	AVANPGATVV DIDGDGSLLM
AtAHASL		QFYNYKKPRQ	WLSSAGLGAM	GFGLPAAAGA	SVANPDATVV DIDGDGSFIM
	551				600
SEQ ID số:	2	NIQELALIRI	ENLPVKVMVL	NNQHLGMVVQ	WEDRFYKANR AHTYLGNP..
OsAHASL1.1		NIQELALIRI	ENLPVKVMVL	NNQHLGMVVQ	WEDRFYKANR AHTYLGNP..
OsAHASL1.2		NIQELALIRI	ENLPVKVMVL	NNQHLGMVVQ	WEDRFYKANR AHTYLGNP..
OsAHASL1.4		NIQELALIRI	ENLPVKVMVL	NNQHLGMVVQ	WEDRFYKANR AHTYLGNP..
OsAHASL1.6		NIQELALIRI	ENLPVKVMVL	NNQHLGMVVQ	LEDRFYKANR AHTYLGNP..
ZmAHASL1		NIQELAMIRI	ENLPVKVFVL	NNQHLGMVVQ	WEDRFYKANR AHTYLGNP..
ZmAHASL2		NVQELAMIRI	ENLPVKVFVL	NNQHLGMVVQ	WEDRFYKANR AHTYLGNP..
OsAHASL2		NIQELAMVRV	EDLPVKVMVL	NNQHLGMVVQ	WEDRFYDANR AHTYLGNPAA
AtAHASL		NVQELATIRV	ENLPVKVLLL	NNQHLGMVMQ	WEDRFYKANR AHTYLGDP..

14/14

Fig. 2 (Tiếp theo)

	601		650
SEQ ID số :2	ECSEIYPDF	VTIAKGFNIP	AVRVTKKSEV RAAIKKMLDT PGPYLLDIIV
OsAHASL1.1	ECSEIYPDF	VTIAKGFNIP	AVRVTKKSEV RAAIKKMLDT PGPYLLDIIV
OsAHASL1.2	ECSEIYPDF	VTIAKGFNIP	AVRVTKKSEV RAAIKKMLDT PGPYLLDIIV
OsAHASL1.4	ECSEIYPDF	VTIAKGFNIP	AVRVTKKSEV RAAIKKMLDT PGPYLLDIIV
OsAHASL1.6	ECSEIYPDF	VTIAKGFNIP	AVRVTKKSEV RAAIKKMLDT PGPYLLDIIV
ZmAHASL1	ENSEIYPDF	VAIAKGFNIP	AVRVTKKSEV HAAIKKMLEA PGPYLLDIIV
ZmAHASL2	ENSEIYPDF	VTIAKGFNIP	AVRVTKKSEV RAAIKKMLDT PGPYLLDIIV
OsAHASL2	NGGGEVYDF	VTIAGGFGIP	AARVTRKGEV RAAVEEMMAA PGPYLLDVVV
AtAHASL	AQEDEIFPNM	LLFAAACGIP	AARVTKKADL REAIQTMLDT PGPYLLDVIC
	651		700
SEQ ID số :2	PHQEHVLPMI	PSGGAFKDMI	LDGDGRTVY.
OsAHASL1.1	PHQEHVLPMI	PSGGAFKDMI	LDGDGRTVY.
OsAHASL1.2	PHQEHVLPMI	PSGGAFKDMI	LDGDGRTVY.
OsAHASL1.4	PHQEHVLPMI	PSGGAFKDMI	LDGDGRTVY.
OsAHASL1.6	PHQEHVLPMI	PSGGAFKDMI	LDGDGRTVY.
ZmAHASL1	PHQEHVLPMI	PSGGAFKDMI	LDGDGRTVY.
ZmAHASL2	PHQEHVLPMI	PSGGAFKDMI	LDGDGRTVY.
OsAHASL2	PHQEHVLPMI	PSNGAFKDI	VDGDGRSSY.
AtAHASL	PHQEHVLPMI	PSGGTFNDVI	TEGDGRIKY.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuaria
 Livore, Blas
 Prina, Alberto Raul
 Singh, Bijay
 Ascenzi, Robert
 Whitt, Sherry R.

<120> Polynucleotit mã hoá tiểu phần lớn của axetohydroaxit synthaza (AHASL1)
 được phân lập từ cây lúa và catxet biểu hiện chứa polynucleotit này

<130> 038867/306618

<150> 60/657,968

<151> 2005-03-02

<160> 18

<170> FastSEQ cho Windows phiên bản 4.0

<210> 1

<211> 1961

<212> ADN

<213> *Oryza sativa*

<220>

<221> CDS

<222> (7)...(1938)

<400> 1

cccacc atg gct acg acc gcc gcg gcc gcg gcc gcc acc ttg tcc gcc	48
Met Ala Thr Thr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Thr Leu Ser Ala	
1 5 10	
gcc gcg acg gcc aag acc ggc cgt aag aac cac cag cga cac cac gtc	96
Ala Ala Thr Ala Lys Thr Gly Arg Lys Asn His Gln Arg His His Val	
15 20 25 30	
ttt ccc gct cga ggc cgg gtg ggg gcg gcg gcg gtc agg tgc tcg gcg	144
Phe Pro Ala Arg Gly Arg Val Gly Ala Ala Ala Val Arg Cys Ser Ala	
35 40 45	
gtg tcc ccg gtc acc ccg ccg tcc ccg gcg ccg ccg gcc acg ccg ctc	192
Val Ser Pro Val Thr Pro Pro Ser Pro Ala Pro Pro Ala Thr Pro Leu	
50 55 60	
cgg ccg tgg ggg ccg gcc gag ccc cgc aag ggc gcg gac atc ctc gtg	240
Arg Pro Trp Gly Pro Ala Glu Pro Arg Lys Gly Ala Asp Ile Leu Val	
65 70 75	
gag gcg ctg gag ccg tgc ggc gtc agc gac gtg ttc gcc tac ccg ggc	288
Glu Ala Leu Glu Arg Cys Gly Val Ser Asp Val Phe Ala Tyr Pro Gly	
80 85 90	
ggc gcg tcc atg gag atc cac cag gcg ctg acg cgc tcc ccg gtc atc	336

Gly 95	Ala	Ser	Met	Glu	Ile	His	Gln	Ala	Leu	Thr	Arg	Ser	Pro	Val	Ile 110	
					100					105						
acc	aac	cac	ctc	ttc	cgc	cac	gag	cag	ggc	gag	gcg	ttc	gcg	gcg	tcc	384
Thr	Asn	His	Leu	Phe	Arg	His	Glu	Gln	Gly	Glu	Ala	Phe	Ala	Ala	Ser	
				115					120					125		
ggg	tac	gcg	cgc	gcg	tcc	ggc	cgc	gtc	ggg	gtc	tgc	gtc	gcc	acc	tcc	432
Gly	Tyr	Ala	Arg	Ala	Ser	Gly	Arg	Val	Gly	Val	Cys	Val	Ala	Thr	Ser	
			130					135					140			
ggc	ccc	ggg	gca	acc	aac	ctc	gtg	tcc	gcg	ctc	gcc	gac	gcg	ctg	ctc	480
Gly	Pro	Gly	Ala	Thr	Asn	Leu	Val	Ser	Ala	Leu	Ala	Asp	Ala	Leu	Leu	
			145				150					155				
gac	tcc	gtc	ccg	atg	gtc	gcc	atc	acg	ggc	cag	gtc	ccc	cgc	cgc	atg	528
Asp	Ser	Val	Pro	Met	Val	Ala	Ile	Thr	Gly	Gln	Val	Pro	Arg	Arg	Met	
						165					170					
atc	ggc	acc	gac	gtc	ttc	cag	gag	acg	ccc	ata	gtc	gag	gtc	acc	cgc	576
Ile	Gly	Thr	Asp	Val	Phe	Gln	Glu	Thr	Pro	Ile	Val	Glu	Val	Thr	Arg	
175					180					185					190	
tcc	atc	acc	aag	cac	aat	tac	ctt	gtc	ctt	gat	gtg	gag	gac	atc	ccc	624
Ser	Ile	Thr	Lys	His	Asn	Tyr	Leu	Val	Leu	Asp	Val	Glu	Asp	Ile	Pro	
				195					200					205		
cgc	gtc	ata	cag	gaa	gcc	ttc	ttc	ctc	gcg	tcc	tcg	ggc	cgt	cct	ggc	672
Arg	Val	Ile	Gln	Glu	Ala	Phe	Phe	Leu	Ala	Ser	Ser	Gly	Arg	Pro	Gly	
			210					215					220			
ccg	gtg	ctg	gtc	gac	atc	ccc	aag	gac	atc	cag	cag	cag	atg	gct	gtg	720
Pro	Val	Leu	Val	Asp	Ile	Pro	Lys	Asp	Ile	Gln	Gln	Gln	Met	Ala	Val	
		225					230					235				
cca	gtc	tgg	gac	acc	tcg	atg	aat	cta	ccg	ggg	tac	att	gca	cgc	ctg	768
Pro	Val	Trp	Asp	Thr	Ser	Met	Asn	Leu	Pro	Gly	Tyr	Ile	Ala	Arg	Leu	
						245					250					
ccc	aag	cca	ccc	gcg	aca	gaa	ttg	ctt	gag	cag	gtc	ttg	cgt	ctg	gtt	816
Pro	Lys	Pro	Pro	Ala	Thr	Glu	Leu	Leu	Glu	Gln	Val	Leu	Arg	Leu	Val	
255					260					265					270	
ggc	gag	tca	cgg	cgc	ccg	att	ctc	tat	gtc	ggt	ggt	ggc	tgc	tct	gca	864
Gly	Glu	Ser	Arg	Arg	Pro	Ile	Leu	Tyr	Val	Gly	Gly	Gly	Cys	Ser	Ala	
				275					280					285		
tct	ggt	gat	gaa	ttg	cgc	cgg	ttt	gtt	gag	ctg	acc	ggc	atc	cca	gtt	912
Ser	Gly	Asp	Glu	Leu	Arg	Arg	Phe	Val	Glu	Leu	Thr	Gly	Ile	Pro	Val	
			290					295					300			
aca	acc	act	ctg	atg	ggc	ctc	ggc	aat	ttc	ccc	agt	gat	gat	ccg	ttg	960
Thr	Thr	Thr	Leu	Met	Gly	Leu	Gly	Asn	Phe	Pro	Ser	Asp	Asp	Pro	Leu	
			305				310					315				
tcc	ctg	cgc	atg	ctt	ggg	atg	cat	ggc	acg	gtg	tac	gca	aat	tat	gcg	1008
Ser	Leu	Arg	Met	Leu	Gly	Met	His	Gly	Thr	Val	Tyr	Ala	Asn	Tyr	Ala	

320	325	330	
gtg gat aag gct gac ctg ttg ctt gca ttt ggc gtg cgg ttt gat gat			1056
Val Asp Lys Ala Asp Leu Leu Leu Ala Phe Gly Val Arg Phe Asp Asp			
335	340	345	350
cggtgtgaca ggg aaa att gag gct ttt gca agc agg gcc aag att gtg			1104
Arg Val Thr Gly Lys Ile Glu Ala Phe Ala Ser Arg Ala Lys Ile Val			
	355	360	365
cac att gac att gat cca gcg gag att gga aag aac aag caa cca cat			1152
His Ile Asp Ile Asp Pro Ala Glu Ile Gly Lys Asn Lys Gln Pro His			
	370	375	380
gtg tca att tgc gca gat gtt aag ctt gct tta cag ggc ttg aat gct			1200
Val Ser Ile Cys Ala Asp Val Lys Leu Ala Leu Gln Gly Leu Asn Ala			
	385	390	395
ctg cta gac cag agc aca aca aag aca agt tct gat ttt agt gcg tgg			1248
Leu Leu Asp Gln Ser Thr Thr Lys Thr Ser Ser Asp Phe Ser Ala Trp			
	400	405	410
cac aat gag ttg gac cag cag aag agg gag ttt cct ctg ggg tac aag			1296
His Asn Glu Leu Asp Gln Gln Lys Arg Glu Phe Pro Leu Gly Tyr Lys			
	415	420	425
act ttt ggt gaa gag atc cca ccg caa tat gct att cag gtg ctg gat			1344
Thr Phe Gly Glu Glu Ile Pro Pro Gln Tyr Ala Ile Gln Val Leu Asp			
	435	440	445
gag ctg acg aaa ggg gag gca atc atc gct act ggt gtt gga cag cac			1392
Glu Leu Thr Lys Gly Glu Ala Ile Ile Ala Thr Gly Val Gly Gln His			
	450	455	460
cag atg tgg gcg gca caa tat tac acc tac aag cgg cca cgg cag tgg			1440
Gln Met Trp Ala Ala Gln Tyr Tyr Thr Tyr Lys Arg Pro Arg Gln Trp			
	465	470	475
ctg tct tcg gct ggt ctg ggc gca atg gga ttt ggg ctg cct gct gca			1488
Leu Ser Ser Ala Gly Leu Gly Ala Met Gly Phe Gly Leu Pro Ala Ala			
	480	485	490
gct ggt gct tct gtg gct aac cca ggt gtc aca gtt gtt gat att gat			1536
Ala Gly Ala Ser Val Ala Asn Pro Gly Val Thr Val Val Asp Ile Asp			
	495	500	505
ggg gat ggt agc ttc ctc atg aac att cag gag ttg gca ttg atc cgc			1584
Gly Asp Gly Ser Phe Leu Met Asn Ile Gln Glu Leu Ala Leu Ile Arg			
	515	520	525
att gag aac ctc ccg gtg aag gtg atg gtg ttg aac aac caa cat ttg			1632
Ile Glu Asn Leu Pro Val Lys Val Met Val Leu Asn Asn Gln His Leu			
	530	535	540
ggt atg gtt gtg caa tgg gag gat agg ttt tac aag gca aat agg gcg			1680
Gly Met Val Val Gln Trp Glu Asp Arg Phe Tyr Lys Ala Asn Arg Ala			
	545	550	555

```

cat aca tac ttg ggc aac cca gaa tgt gag agt gag ata tat cca gat 1728
His Thr Tyr Leu Gly Asn Pro Glu Cys Glu Ser Glu Ile Tyr Pro Asp
    560                      565                      570

ttt gtg act att gct aaa ggg ttc aat att cct gca gtc cgt gta aca 1776
Phe Val Thr Ile Ala Lys Gly Phe Asn Ile Pro Ala Val Arg Val Thr
575                      580                      585                      590

aag aag agt gaa gtc cgt gcc gcc atc aag aag atg ctc gat acc cca 1824
Lys Lys Ser Glu Val Arg Ala Ala Ile Lys Lys Met Leu Asp Thr Pro
    595                      600                      605

ggg cca tac ttg ttg gat atc atc gtc cca cac cag gag cat gtg ctg 1872
Gly Pro Tyr Leu Leu Asp Ile Ile Val Pro His Gln Glu His Val Leu
    610                      615                      620

cct atg atc cca agt ggg ggc gca ttc aag gac atg atc ctg gat ggt 1920
Pro Met Ile Pro Ser Gly Gly Ala Phe Lys Asp Met Ile Leu Asp Gly
    625                      630                      635

gat ggc agg act gtg tat taatctataa tctgtatgtt ggc 1961
Asp Gly Arg Thr Val Tyr
    640

```

<210> 2
 <211> 644
 <212> PRT
 <213> Oryza sativa

```

<400> 2
Met Ala Thr Thr Ala Ala Ala Ala Ala Thr Leu Ser Ala Ala Ala
 1          5          10          15
Thr Ala Lys Thr Gly Arg Lys Asn His Gln Arg His His Val Phe Pro
 20         25         30
Ala Arg Gly Arg Val Gly Ala Ala Ala Val Arg Cys Ser Ala Val Ser
 35         40         45
Pro Val Thr Pro Pro Ser Pro Ala Pro Pro Ala Thr Pro Leu Arg Pro
 50         55         60
Trp Gly Pro Ala Glu Pro Arg Lys Gly Ala Asp Ile Leu Val Glu Ala
 65         70         75         80
Leu Glu Arg Cys Gly Val Ser Asp Val Phe Ala Tyr Pro Gly Gly Ala
 85         90         95
Ser Met Glu Ile His Gln Ala Leu Thr Arg Ser Pro Val Ile Thr Asn
100        105        110
His Leu Phe Arg His Glu Gln Gly Glu Ala Phe Ala Ala Ser Gly Tyr
115        120        125
Ala Arg Ala Ser Gly Arg Val Gly Val Cys Val Ala Thr Ser Gly Pro
130        135        140
Gly Ala Thr Asn Leu Val Ser Ala Leu Ala Asp Ala Leu Leu Asp Ser
145        150        155        160
Val Pro Met Val Ala Ile Thr Gly Gln Val Pro Arg Arg Met Ile Gly
165        170        175
Thr Asp Val Phe Gln Glu Thr Pro Ile Val Glu Val Thr Arg Ser Ile
180        185        190
Thr Lys His Asn Tyr Leu Val Leu Asp Val Glu Asp Ile Pro Arg Val

```


<210> 3
 <211> 1932
 <212> ADN
 <213> Oryza sativa

<400> 3
 atggctacga ccgccgcggc cggggccggc accttggtccg ccgccgcgac ggccaagacc 60
 ggccgtaaga accaccagcg acaccacgtc tttcccgtc gaggccgggt gggggcggcg 120
 gcggtcaggt gctcggcggt gtccccggtc accccgccgt ccccggcgcc gccggccacg 180
 ccgctccggc cgtggggggc ggccgagccc cgcaagggcg cggacatcct cgtggaggcg 240
 ctggagcggg gcggcgtcag cgacgtgttc gcctaccgg gcggcgcgtc catggagatc 300
 caccaggcgc tgacgcgctc cccggtcatc accaaccacc tcttcgccca cgagcagggc 360
 gaggcgttcg cggcgctccgg gtaecgcgcg gcgtccggcc gcgtcggggg ctgcgtcgcc 420
 acctccggcc ccggggcaac caacctcgtg tccgcgctcg ccgacgcgct gctcgactcc 480
 gtcccgatgg tcgccatcac gggccagggt ccccgccgca tgatcggcac cgacgtcttc 540
 caggagacgc ccatagtcga ggtcaccgcg tccatcacca agcacaatta ccttgctcctt 600
 gatgtggagg acatcccccg cgtcatcacg gaagccttct tccctcgctc ctggggccgt 660
 cctggcccgg tgctggtcga catccccaa gacatccagc agcagatggc tgtgccagtc 720
 tgggacacct cgatgaatct accggggtac attgcacgcc tgcccaagcc acccgcgaca 780
 gaattgcttg agcaggctct gcgtctgggt ggcgagtcac ggcgcccgat tctctatgtc 840
 ggtggtggct gctctgcac tggtgatgaa ttgcgccggg ttggtgagct gaccggcatc 900
 ccagttacaa ccactctgat gggcctcggc aatttcccca gtgatgatcc gttgtccctg 960
 cgcatgcttg ggatgcatgg cacggtgtac gcaaattatg cgggtggataa ggctgacctg 1020
 ttgcttgcat ttggcgtgcg gtttgatgat cgtgtgacag ggaaaattga ggcttttgca 1080
 agcaggggcca agattgtgca cattgacatt gatccagcgg agattggaaa gaacaagcaa 1140
 ccacatgtgt caatttgccg agatgttaag cttgctttac agggcttgaa tgctctgcta 1200
 gaccagagca caacaaagac aagtctctgat tttagtgcgt ggcacaaatga gttggaccag 1260
 cagaagaggg agtttcctct ggggtacaag acttttgggt aagagatccc accgcaatat 1320
 gctattcagg tgctggatga gctgacgaaa ggggaggcaa tcatcgctac tgggtgttga 1380
 cagcaccaga tgtggcgcg acaatattac acctacaagc ggccacggca gtgggtgtct 1440
 tcggctggtc tgggcgcaat gggatttggg ctgcctgctg cagctgggtc ttctgtggct 1500
 aaccaggtg tcacagttgt tgatattgat ggggatggta gcttcctcat gaacattcag 1560
 gagttggcat tgatccgcat tgagaacctc ccggtgaagg tgatggtgtt gaacaaccaa 1620
 catttgggta tgggtgtgca atgggaggat aggttttaca aggcaaatag ggcgcataca 1680
 tacttgggca acccagaatg tgagagttag atatatccag attttgtgac tattgctaaa 1740
 gggttcaata ttcctgcagt ccgtgtaaca aagaagagtg aagtcggtgc cgccatcaag 1800
 aagatgctcg ataccacagg gccatacttg ttggatatca tcgtcccaca ccaggagcat 1860
 gtgctgccta tgatcccaag tgggggcgca ttcaaggaca tgatcctgga tgggtgatggc 1920
 aggactgtgt at 1932

<210> 4
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Khuếch đại PCR và sắp xếp trình tự đoạn mồi U136851

<400> 4
 gacatatggg gccactgt 19

<210> 5
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mồi L789 cho khuếch đại PCR và giải trình tự

<400> 5
gtagattcat cgaggtgtc 19

<210> 6
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mồi U642 cho khuếch đại PCR và giải trình tự

<400> 6
gtccttgatg tggaggacat 20

<210> 7
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mồi L1369 cho khuếch đại PCR và giải trình tự

<400> 7
catattgcgg tgggatctct 20

<210> 8
<211> 20
<212> ADNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mồi U1229 cho khuếch đại PCR và giải trình tự

<400> 8
gggcttgaat gctctgctac 20

<210> 9
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mồi L1742 cho khuếch đại PCR và giải trình tự

<400> 9
cgggttgccc aagtatgtat 20

<210> 10
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi U1633 cho khuếch đại PCR và giải trình tự

<400> 10
acctccctgt gaaggtgatg 20

<210> 11
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mỗi L2155 cho khuếch đại PCR và giải trình tự

<400> 11
aggattacca tgccaagcac 20

<210> 12
<211> 18
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mỗi U037 cho khuếch đại PCR và giải trình tự U037

<400> 12
caccacccac catggcta 18

<210> 13
<211> 18
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mỗi U114 cho khuếch đại PCR và giải trình tự U114

<400> 13
gtaagaacca ccagcgac 18

<210> 14
<211> 19
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mỗi U1109 cho khuếch đại PCR và giải trình tự

<400> 14
gtggataagg ctgacctgt 19

<210> 15
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mỗi U1166 cho khuếch đại PCR và giải trình tự

<400> 15
gggaaaattg aggcttttgc a 21

<210> 16
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mỗi L1299 cho khuếch đại PCR và giải trình tự

<400> 16
ctcattgtgc catgcactaa 20

<210> 17
<211> 19
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mỗi U1721 cho khuếch đại PCR và giải trình tự

<400> 17
gcatacatatc ttgggcaac 19

<210> 18
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mỗi L2054 cho khuếch đại PCR và giải trình tự

<400> 18
cataccactc tttatgggtc 20