



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

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

(11)



1-0025124

(51)⁷ C12N 5/04; A01C 1/00; A01H 5/00

(13) B

(21) 1-2014-00447

(22) 20/07/2012

(86) PCT/US2012/047644 20/07/2012

(87) WO2013/016210A1 31/01/2013

(30) 61/510,585 22/07/2011 US; 61/541,832 30/09/2011 US

(45) 25/08/2020 389

(43) 25/06/2014 315A

(73) RICETEC AKTIENGESELLSCHAFT (LI)

Bergstrasse 5, Postfach 366, FL-9490 Vaduz, Liechtenstein

(72) HINGA, Melissa (US); GRIFFIN, Steven (US); MOON, Melissa, Shannon (US);
RASMUSSEN, Russell, D. (US); CUEVAS, Federico (US).

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

(54) PHƯƠNG PHÁP PHÒNG TRỪ CỎ DẠI, PHƯƠNG PHÁP TẠO RA CÂY LÚA
KHÁNG THUỐC DIỆT CỎ ỨC CHẾ ACCAZA VÀ CÂY LÚA THU ĐƯỢC TỪ
PHƯƠNG PHÁP NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến cây lúa đột biến kháng/dung nạp các thuốc diệt cỏ ức chế ACCaza, cụ thể là các thuốc diệt cỏ FOP, được liệt kê trong bảng 1. Các thuốc diệt cỏ ức chế ACCaza này được sử dụng để chọn lọc bao gồm quizalofop. Sáng chế đề cập đến cây lúa đột biến được lấy làm ví dụ dung nạp thuốc diệt cỏ ACCaza, với hệ gen của cây lúa có sự đột biến G2096S hoặc tương đương, ở vùng carboxyl transferaza của gen mã hoá ACCaza, sử dụng hệ thống đánh số Black-Grass. Sự đột biến này thể hiện đáp ứng phân hoá đối với các thuốc diệt cỏ FOP với DIM, và rất khác so với các dòng lúa không có tính kháng thuốc diệt cỏ. Sáng chế cũng đề cập đến các phương pháp phòng trừ cỏ dại và các phương pháp sản xuất cây lúa có tính kháng thuốc diệt cỏ bao gồm cả cây lúa chuyển gen.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Đơn này yêu cầu bảo hộ quyền ưu tiên từ các đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 61/510,585 nộp ngày 22 tháng 7 năm 2011 và đơn số 61/541,832 nộp ngày 30 tháng 9 năm 2011, cả hai đơn này đều được kết hợp tham khảo. Sáng chế đề cập và mô tả cây lúa mới khác biệt ở chỗ dung nạp/kháng các thuốc diệt cỏ là các chất ức chế ACCaza và biểu hiện các đặc tính khác có lợi cho cây lúa. Sáng chế cũng đề cập đến các phương pháp phòng trừ các loại cỏ dại bằng cách sử dụng cây lúa kháng thuốc diệt cỏ trên các cánh đồng, và các phương pháp tạo ra cây lúa kháng thuốc diệt cỏ bằng cách sử dụng, ví dụ, các gen chuyển mã hóa cho enzym ACCaza đột biến.

Danh mục trình tự

Đơn này có Danh mục trình tự mà đã được trình bày ở dạng ASCII qua EFS-Web và được kết hợp vào bản mô tả này. Bản sao ASCII này, được tạo ra vào ngày 20 tháng 7 năm 2012, được ký hiệu là 115760_SEQ_ST25.txt và có kích cỡ 32.768 byte.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Giá trị của cây lúa

Lúa là một loại cây nông nghiệp từ thời cổ đại và đến ngày nay là một trong những loại cây lương thực chính trên thế giới. Có hai loại lúa được trồng là: *Oryza sativa* L., giống lúa châu Á, và *Oryza glaberrima* Steud., giống lúa châu Phi. Giống lúa châu Á hầu như hình thành ra tất cả các giống lúa được trồng trên khắp thế giới và là giống lúa được phát triển ở nước Mỹ. Ở nước Mỹ có ba vùng trồng lúa chủ yếu là: vùng đồng bằng Mississippi (Arkansas, Mississippi, vùng đông bắc Louisiana, vùng đông nam Missouri), vùng bờ vịnh (the Gulf Coast) (vùng tây nam Louisiana, vùng đông nam Texas), và các thung

lũng trung tâm của California.

Lúa là một trong số ít các cây trồng mà có thể sinh trưởng được ở vùng ngập lũ vì nó có cấu trúc đồng nhất cho phép trao đổi khí nhờ thân nằm giữa rễ và môi trường. Sự sinh trưởng ở vùng ngập lũ cho năng suất tốt nhất và là lý do mà cây lúa thường sinh trưởng được ở các vùng đất sét nặng và các vùng đất có lớp đất cái không thấm nước nằm dưới bề mặt đất cày. Các loại đất này thường không thích hợp cho các loại cây trồng khác hoặc ở điều kiện tốt nhất nhưng năng suất của cây trồng vẫn kém.

Sự cải tiến giống lúa là cấp thiết để cung cấp chất dinh dưỡng cần thiết cho sự phát triển dân số trên thế giới. Một phần lớn dân số trên thế giới sử dụng lúa làm nguồn dinh dưỡng chủ yếu. Sự cải tiến giống lúa được thực hiện thông qua các phương pháp lai thông thường và bằng các kỹ thuật tái tổ hợp di truyền. Xem ra cho dù hướng đến những thứ nằm ngoài phạm vi này, nhưng sự cải tiến cây trồng cần có các kỹ năng khoa học và nghệ thuật tinh tế.

Mặc dù các mục tiêu lai đặc trưng hơi thay đổi ở các vùng sản xuất gạo khác nhau, nhưng mục tiêu chính của tất cả các kế hoạch đều nhằm gia tăng năng suất.

Quá trình lai thực vật bắt đầu với sự phân tích và xác định về ưu nhược điểm của các giống cây trồng hiện nay, tiếp đến là thiết lập các mục tiêu của chương trình, để hướng đến sự xác định kể cả sự xác định các mục tiêu lai đặc trưng. Mục đích là kết hợp một tổ hợp các tính trạng mong muốn được cải tiến từ các nguồn ban đầu vào trong cây trồng đơn lẻ. Các tính trạng quan trọng này có thể bao gồm năng suất cao hơn, chịu được ứng suất môi trường, kháng các loại bệnh và côn trùng, thân và rễ tốt hơn, chịu được nhiệt độ thấp, có các đặc tính nông học tốt hơn và chất lượng hạt tốt hơn.

Ban đầu người chọn giống lựa chọn và lai chéo hai hoặc nhiều dòng cha mẹ, sau đó chọn lọc trong số nhiều tổ hợp di truyền mới. Về lý thuyết, người chọn giống có thể tạo ra hàng tỷ tổ hợp di truyền mới khác nhau thông qua quá trình lai chéo. Người chọn giống không có sự kiểm soát trực tiếp ở mức độ tế

bào; do vậy, hai người chọn giống sẽ không bao giờ phát triển cùng một dòng giống nhau, hoặc thậm chí là các dòng khá giống, có các tính trạng lúa giống nhau.

Quá trình lai hệ phả thường được sử dụng để cải tiến các cây trồng tự thụ phân như cây lúa. Hai dòng cha mẹ mà có các tính trạng bổ trợ, hữu ích được lai chéo sinh ra thế hệ F_1 . Một hoặc cả hai dòng cha mẹ có thể chính là thế hệ F_1 từ quá trình lai trước. Vì vậy, quần thể phân ly được sinh ra, phát triển hạt giống bởi sự gieo trồng một hoặc vài dòng F_1 nếu hai dòng cha mẹ là thuần chủng, hoặc bằng cách phát triển trực tiếp hạt giống bởi quá trình lai ban đầu nếu ít nhất một trong số các dòng cha mẹ là dòng F_1 . Quá trình chọn lọc các cá thể tốt nhất có thể bắt đầu ở quần thể phân ly thứ nhất hoặc thế hệ F_2 ; rồi thì bắt đầu ở thế hệ F_3 , các cá thể tốt nhất ở các dòng họ tốt nhất được lựa chọn. Thuật ngữ "tốt nhất" được xác định theo các mục đích của chương trình lai cụ thể, chẳng hạn như nhằm gia tăng năng suất, chống được bệnh tật. Nói chung, phương pháp nhiều yếu tố được sử dụng để định nghĩa thuật ngữ "tốt nhất" vì các sự tương tác di truyền. Gen mong muốn trong nền tảng di truyền có thể thay đổi ở nền tảng khác nhau. Ngoài ra, sự nhập nội gen có thể phá vỡ các đặc tính di truyền có ích khác. Thử nghiệm sao chép các họ có thể bắt đầu ở thế hệ F_4 để nâng cao hiệu quả của quá trình chọn lọc cho các tính trạng với mức di truyền thấp. Ở giai đoạn nâng cao của quá trình lai cận huyết (tức là, F_6 và F_7), các dòng tốt nhất hoặc các tổ hợp của các dòng tương tự kiểu hình được thử nghiệm về sự giải phóng tiềm năng dưới dạng các dòng cha mẹ mới.

Quá trình lai hồi quy đã được sử dụng để truyền các gen có tính trạng có khả năng di truyền cao vào trong cây trồng có đồng hợp tử mong muốn hoặc dòng cận huyết mà là dòng cha mẹ hồi quy. Nguồn tính trạng cần được truyền được gọi là nguồn cung cấp gen. Thực vật thu được được mong muốn có các thuộc tính của dòng cha mẹ hồi quy (ví dụ, giống cây trồng) và tính trạng mong muốn được truyền từ nguồn cung cấp gen. Sau quá trình lai ban đầu, các cá thể có kiểu hình của nguồn cung cấp gen được lựa chọn và được lai lặp (lai hồi quy) với dòng cha mẹ hồi quy. Quy trình này được sử dụng để phục hồi tất cả các đặc

tính có ích của dòng cha mẹ hồi quy với sự bổ sung tính trạng mới được cung cấp bởi nguồn cung cấp gen.

Các dòng lai tiên tiến đầy hứa hẹn được thử nghiệm kỹ lưỡng và được so sánh với các tiêu chuẩn thích hợp trong các môi trường điển hình của (các) vùng thương mại xác định trong ít nhất ba năm trở lên. Các dòng tốt nhất là các dòng được cho là các giống mới có giá trị thương mại hoặc là các dòng cha mẹ của các thế lai; các dòng vẫn thiếu vài tính trạng có thể được sử dụng làm dòng cha mẹ để tạo ra các quần thể mới cho sự chọn lọc tiếp theo.

Các quá trình này, là các quá trình dẫn đến giai đoạn tiếp thị và phân phối sau cùng, thường mất khoảng từ 8 đến 12 năm tính từ thời điểm tiến hành quá trình lai đầu tiên và có thể dựa vào sự phát triển của các dòng lai được cải tiến dưới dạng các tiền thể. Do vậy, sự phát triển các giống cây trồng mới là một quá trình tốn thời gian mà yêu cầu sự lên kế hoạch tỉ mỉ trong tương lai, sự sử dụng hiệu quả nguồn tài nguyên, và giảm thiểu các sự thay đổi có định hướng.

Sự cải tiến giống lúa thông qua sự lai được giới hạn ở sự biến đổi di truyền tự nhiên ở các giống lúa và các giống lúa lai như giống lúa hoang dại. Việc đưa sự biến dị mới trong chương trình lai thường thông qua chương trình lai như đã nêu, như quá trình lai hệ phả hoặc quá trình lai hồi quy. Tuy nhiên, đôi khi các sự đột biến tự nhiên được cho là dẫn đến sự đưa các tính trạng mới vào như tính kháng bệnh tật hoặc sự thay đổi về chiều cao. Người chọn giống cũng đã phát triển các tính trạng mới bằng cách gây ra các sự đột biến (các sự thay đổi nhỏ về trình tự ADN) trong hệ gen của cây lúa. Thông thường, EMS hoặc MNU có bổ sung natri azit được sử dụng làm các tác nhân gây đột biến. Các chất hóa học này ngẫu nhiên gây ra các sự thay đổi bazơ riêng lẻ trong ADN, thường là G và C được thay đổi thành A và T. Phần lớn các sự thay đổi này không ảnh hưởng đến cây trồng vì chúng không liên quan đến các vùng mã hóa gen hoặc không làm thay đổi trình tự axit amin của gen.

Người chọn giống không có sự kiểm soát trực tiếp các vị trí đột biến trong trình tự ADN. Sự nhận biết các sự thay đổi hữu ích là nhờ khả năng ngẫu

nhiên mà sẽ gây ra sự đột biến hữu hiệu và người chọn giống sẽ có khả năng chọn sự đột biến đó. Các hạt giống được xử lý bằng hóa chất gây phát sinh đột biến và được trồng ngay lập tức để phát triển và tạo ra hạt giống M2. Hạt giống M2 sẽ mang nhiều sự biến dị mới; do vậy, sẽ không có việc hai thử nghiệm đều tạo ra các tổ hợp giống nhau. Trong số các sự biến dị này, các tính trạng mới trước đó không tồn tại trong cây lúa và không có giá trị chọn lọc đối với người chọn giống thực vật có thể được phát hiện và sử dụng để cải tiến giống lúa.

Để phát hiện được các tính trạng mới, người chọn giống phải sử dụng các phương pháp chọn lọc một cách có mục đích và hiệu quả vì quá trình này là hoàn toàn ngẫu nhiên và có xác suất phát hiện các tổ hợp hữu ích mới cực thấp. Trong số hàng ngàn thể biến dị di truyền mới được tạo ra, có thể chỉ có một thể biến dị có tính trạng mới mong muốn. Một hệ thống chọn lọc tối ưu sẽ sàng lọc đến cùng hàng ngàn thể biến dị mới và cho phép phát hiện một vài hoặc thậm chí chỉ duy nhất một thực vật mà có khả năng mang tính trạng mới. Sau khi nhận dạng hoặc phát hiện tính trạng mới có thể chấp nhận được, người chọn giống phải phát triển giống cây trồng mới bằng quá trình lai hệ phả hoặc quá trình lai hồi quy và thử nghiệm nhiều lần để xác minh tính trạng mới và giống cây trồng biểu hiện giá trị ổn định và có khả năng di truyền đối với nhà sản xuất lúa.

Bằng cách sử dụng các kỹ thuật tái tổ hợp di truyền, các phân tử axit nucleic có các sự đột biến, mà mã hóa các đặc tính được nâng cao ở cây lúa, có thể được đưa vào trong cây lúa với các hệ gen thích hợp có bán trên thị trường. Sau khi sự đột biến được xác nhận, sự đột biến này có thể được truyền vào trong cây lúa bằng các phương pháp tái tổ hợp.

Các ứng dụng của các patent kháng thuốc diệt cỏ ở cây lúa

Cỏ ở các vụ mùa cạnh tranh tài nguyên và làm giảm đáng kể năng suất và chất lượng của cây trồng. Cỏ đã được phòng trừ ở các vụ mùa nhờ việc phun các thuốc diệt cỏ chọn lọc mà nhằm diệt trừ cỏ nhưng không gây hại cho cây trồng. Thông thường, khả năng lựa chọn các thuốc diệt cỏ là dựa trên các

sự thay đổi sinh hóa hoặc các sự khác biệt giữa cây trồng và cỏ. Vài loại thuốc diệt cỏ không có tính chọn lọc, tức là chúng tiêu diệt tất cả hoặc hầu như tất cả các loài thực vật. Các thuốc diệt cỏ không có tính chọn lọc hoặc các thuốc diệt cỏ phổ rộng có thể được sử dụng trong các vụ mùa nếu các gen mới được đánh vào mà biểu hiện các protein đặc trưng mà có thể truyền tính dung nạp hoặc tính kháng thuốc diệt cỏ. Tính kháng các loại thuốc diệt cỏ cũng đã đạt được ở các cây trồng nhờ các sự đột biến di truyền mà làm thay đổi các protein và các quá trình sinh hóa. Các sự đột biến này có thể xảy ra một cách tự nhiên, nhưng phần lớn chúng được gây ra trong các cây trồng hoặc được gây ra *in vitro* trong các môi trường nuôi cấy mô. Không may trong một số trường hợp, đặc biệt là với việc sử dụng nhiều lần một loại thuốc diệt cỏ cụ thể, cỏ đã phát triển tính kháng thuốc nhờ quá trình chọn lọc không mong muốn các sự đột biến tự nhiên mà tạo ra tính kháng thuốc. Nếu cỏ đã kháng được loại thuốc diệt cỏ cụ thể, thì thuốc diệt cỏ đó không có ích trong việc phòng trừ cỏ nữa. Sự phát triển tính kháng thuốc ở cỏ bị làm trễ nhờ sự thay đổi việc sử dụng các cơ chế hoạt động khác nhau để phòng trừ cỏ, cản trở sự phát triển của cỏ có tính kháng thuốc diệt cỏ.

Quá trình sản xuất lúa bị cản trở bởi sự đặc biệt khó phòng trừ loài cỏ được gọi là lúa đỏ. Sự khó khăn phát sinh bởi lúa đỏ là vì chúng tương tự với cây lúa được gieo trồng về mặt di truyền (đôi khi chúng thụ phấn chéo) mà chưa có các thuốc diệt cỏ chọn lọc có khả năng phòng trừ cây lúa đỏ, mà không gây hại cho cây lúa. Hiện nay, trong quá trình sản xuất lúa thương mại, sự phòng trừ được tạo ra thông qua sự phát triển các đột biến được nhận thấy ở cây lúa mà truyền cho cây lúa tính kháng các loại thuốc diệt cỏ phổ rộng, ví dụ, thuốc diệt cỏ imidazolinon và sulfonylure chẳng hạn.

Nhờ phát hiện ra các sự đột biến mới ở cây lúa mà làm cho cây lúa có tính kháng các thuốc diệt cỏ, và kháng các hỗn hợp của các thuốc diệt cỏ với các cơ chế tác động luân phiên sẽ rất có lợi cho quá trình sản xuất lúa. Việc thu được và kết hợp các gen có tính kháng thuốc diệt cỏ vào trong hệ gen của cây lúa với các đặc tính hữu ích bổ sung và tính kháng thuốc diệt cỏ thích hợp đang đề ra những

vấn đề thách thức, không thể đoán trước được, tốn nhiều thời gian và chi phí rất lớn, nhưng là cần thiết để đáp ứng các nhu cầu về lương thực đang ngày càng gia tăng trên thế giới.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế mô tả các dòng lúa tách biệt có tính kháng đơn nhất với các thuốc diệt cỏ với các cơ chế tác động luân phiên. Các dòng lúa này sẽ kéo dài thời gian sử dụng hữu ích của vài loài thuốc diệt cỏ nhờ khả năng luân phiên các loại thuốc diệt cỏ được phun vào các canh đồng, nhờ vậy làm chậm sự phát triển tính kháng thuốc của cỏ. Một số phương pháp có khả năng truyền tính kháng thuốc này vào các thể lai hoặc các giống lúa để phòng trừ cỏ, cũng như các sự tùy chọn cho quá trình sản xuất hạt giống lúa lai. Các dòng lúa được mô tả trong bản mô tả này là kết quả của các phương pháp mới phòng trừ cỏ ở cây lúa và có thể được triển khai trong nhiều kế hoạch khả thi để phòng trừ các loại cỏ và kéo dài thời gian sử dụng của phương pháp phòng trừ cỏ đại này và các phương pháp phòng trừ cỏ đại khác. Cụ thể, sáng chế đề cập đến cây lúa đột biến dung nạp các thuốc diệt cỏ ức chế ACCaza. Đây là các cây trồng có các trình tự axit amin đã xác định.

Ví dụ, cây lúa với thể đột biến ACCaza G2096S được làm thích ứng rồi và thông qua quá trình lai hoặc lai ngược như được nêu ở đây, sẽ tạo ra tính kháng thuốc diệt cỏ trong chất liệu sinh học thích hợp có bán trên thị trường.

Cây lúa đột biến dung nạp thuốc diệt cỏ ức chế ACCaza được đề cập có sự đột biến G2096S ở vùng mã hoá carboxyl transferaza của gen ACCaza, bằng cách sử dụng hệ thống đánh số Black Grass (*Alopecurus myosuroides*). Sự đột biến này làm cho enzym axetyl-coenzym A carboxylaza dung nạp/kháng các chất ức chế ACCaza được dùng làm thuốc diệt cỏ.

Các tế bào có nguồn gốc từ cỏ kháng thuốc diệt cỏ, các loài thực vật sinh trưởng từ các loại cỏ này và tế bào có nguồn gốc từ các loài thực vật này, thế hệ con của các loài thực vật sinh trưởng được từ cỏ và các tế bào có nguồn gốc từ thế hệ con này đều nằm trong phạm vi của sáng chế. Sự phát triển của các loài

thực vật được gây ra bởi hạt giống được lưu giữ, và thế hệ con của các loài thực vật này sẽ kháng/dung nạp các thuốc diệt cỏ ức chế axetyl-coenzym A carboxylaza ở các mức độ của thuốc diệt cỏ mà thông thường sẽ kìm hãm sự sinh trưởng của loài thực vật kiểu hoang dại tương ứng.

Phương pháp kiểm soát sự sinh trưởng cỏ ở vùng gần với cây lúa cũng nằm trong phạm vi của sáng chế. Một ví dụ về các phương pháp này là việc phun một hoặc nhiều thuốc diệt cỏ lên cỏ và lên cây lúa ở các mức độ của thuốc diệt cỏ mà thường sẽ kìm hãm sự sinh trưởng của cây lúa. Ví dụ, ít nhất một thuốc diệt cỏ ức chế hoạt tính axetyl-Coenzym A carboxylaza. Các phương pháp này có thể được thực hiện với thuốc diệt cỏ bất kỳ mà ức chế hoạt tính axetyl-Coenzym A carboxylaza và bất kỳ sự đột biến của cây lúa có tính kháng thuốc, ví dụ, ba phương án được đề cập sau đây.

Phương pháp phát triển cây lúa dung nạp thuốc diệt cỏ bao gồm (a) gieo trồng hạt lúa có tính kháng thuốc; (b) cho phép hạt lúa nảy mầm; (c) phủ một hoặc nhiều loại thuốc diệt cỏ lên mầm của cây lúa ở các mức độ của thuốc diệt cỏ mà thường sẽ kìm hãm sự sinh trưởng của cây lúa. Ví dụ, ít nhất một trong số các thuốc diệt cỏ ức chế axetyl-Coenzym A carboxylaza. Các phương pháp này có thể được thực hiện với bất kỳ thuốc diệt cỏ ức chế hoạt tính axetyl-Coenzym A carboxylaza.

Các phương pháp tạo ra cây lúa dung nạp thuốc diệt cỏ mà cũng có thể sử dụng gen chuyển. Một ví dụ về phương pháp này là biến nạp tế bào của cây lúa với gen chuyển, trong đó gen chuyển mã hoá enzym axetyl-Coenzym A carboxylaza mà truyền tính dung nạp cho cây lúa thu được đối với ít nhất một thuốc diệt cỏ được chọn từ nhóm bao gồm các thuốc diệt cỏ aryloxyphenoxypropionat, các thuốc diệt cỏ xyclohexandion, các thuốc diệt cỏ phenypyrazolin hoặc các hỗn hợp của chúng. Tế bào thích hợp bất kỳ có thể được sử dụng trong quá trình thực hiện các phương pháp này, ví dụ, tế bào có thể là dạng thể chai. Một phương án về sự chuyển gen là phương pháp bao gồm sự đột biến ở axit nucleic mã hoá ACCaza, từ G thành S ở vị trí 2096 (hệ thống

đánh số Black Grass).

Phân tử axit nucleic tái tổ hợp, phát sinh đột biến, tổng hợp, và/hoặc phân tách bao gồm chuỗi nucleotit mã hoá axetyl-Coenzym A carboxylaza được gây đột biến của cây lúa, trong đó trình tự axit amin của axetyl-Coenzym A carboxylaza được gây đột biến khác với trình tự axit amin của axetyl-Coenzym A carboxylaza của thực vật kiểu đại tương ứng, đều nằm trong phạm vi của sáng chế.

Các sự đột biến khác nhau ở gen mã hoá ACCaza thường liên quan đến tính kháng các loại thuốc diệt cỏ ức chế ACCaza đặc hiệu (FOPS), (DIMS). Đặc trưng của các sự đột biến khác nhau như vậy tạo ra triển vọng phát triển nhiều cơ chế hoạt động để phòng trừ cỏ ở cây lúa.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

FIG.1 thể hiện các cây trồng sống sót ở dãy được phun quizalofop 11USAG51477 được đánh dấu bằng cờ.

FIG.2 thể hiện các cây được phun quizalofop sống sót sau khi gieo trồng.

FIG.3 thể hiện cây lúa 11USAG52084-2 với bộ hạt.

FIG.4 thể hiện trình tự ADN cho vùng mã hoá carboxyl transfereaza ở gen mã hoá ACCaza; sự thay đổi một nucleotit từ G2096S được xác nhận ở dòng đột biến ML0831265-01493 mà được ghi nhận là 09PM72399. FIG.4 thể hiện các SEQ ID NO. 2-4 theo trình tự.

FIG.5 thể hiện sự so sánh các trình tự protein cho vùng carboxyl transferaza của gen ACCaza; dòng có mã 09PM72399 là dòng ML0831265-01493; dòng này thể hiện sự thay đổi một axit amin ở vị trí 2096, so với Black-Grass; R0146 là dòng gốc được xử lý bằng tác nhân gây đột biến để tạo ra quần thể đột biến. FIG.5 thể hiện các SEQ ID NO 5-7 theo trình tự.

FIG.6 thể hiện các kết quả của các cây trồng từ ML0831265-01493 ở các tỷ lệ phun thuốc diệt cỏ quizalofop khác nhau.

FIG.7 thể hiện các kết quả của các cây trồng từ ML0831265-01493 với

quá trình phun các thuốc diệt cỏ kiểu ACCaza khác nhau.

FIG.8 là chuỗi nucleotit đột biến (SEQ ID NO: 1) mà mã hoá enzym ACCaza với sự thay thế G bằng S ở vị trí 2096 (hệ thống đánh số Black Grass).

FIG.9 thể hiện sự so sánh tỷ lệ % tồn hại sau khi tiếp xúc với các thuốc diệt cỏ FOP ức chế ACCaza ở (a) các cây lúa có sự đột biến G2096S; và (b) các cây lúa không có sự đột biến, với sự so sánh đột biến khác nhau đã công bố.

Mô tả chi tiết sáng chế

Giống lúa *Oryza sativa* L. là cây trồng quan trọng và có giá trị. Như vậy, mục đích kế tiếp của người chọn giống lúa là phát triển cây lúa khoẻ mạnh có năng suất cao và ổn định. Người trồng luôn mong đợi sự gia tăng năng suất từ các giống lúa và thể lai mới vì nhờ đó mà làm tăng điều kiện kinh tế của họ. Ngoài ra, xét về mức độ dân số, sự gia tăng năng suất là cần thiết vì nhu cầu dinh dưỡng ngày càng mở rộng nhưng các nguồn tài nguyên sản xuất thì chỉ có hạn. Để hoàn thành mục tiêu này, người chọn giống lúa phải chọn lọc và phát triển các cây lúa có các tính trạng cần thiết và có năng suất cao.

Các enzym axetyl-Coenzym A carboxylaza (ACCaza; EC 6.4.1.2) tổng hợp malonyl-CoA dưới dạng chất khởi đầu của chu trình tổng hợp axit béo de novo trong lục lạp của thực vật. ACCaza trong lục lạp của cỏ là polypeptit đơn, rất lớn, được mã hoá bởi hệ gen của nhân, đa chức, được chuyển vào trong plasmit nhờ peptit chuyển tiếp có đầu cuối N. Dạng hoạt hoá trong lục lạp của cỏ là protein dime đồng nhất.

Các enzym ACCaza trong cỏ bị kìm hãm bởi ba loại thành phần hoạt tính diệt cỏ. Hai loại phổ biến nhất là aryloxyphenoxypropanoat ("FOP") và xyclohexandion ("DIM"). Ngoài hai loại này, còn có loại thứ ba là phenylpyrazolin ("DEN") đã được mô tả.

Các sự đột biến cụ thể ở vùng carboxyl transferaza của enzym ACCaza làm cho cỏ trở nên kháng các thuốc diệt cỏ ACCaza. Trong hệ thống đánh số Black-Grass cho cỏ, ít nhất năm sự đột biến được đề cập tạo ra tính kháng các

thuốc diệt cỏ ACCaza kiểu FOP hoặc DIM. Vài sự đột biến các enzym ACCaza truyền tính kháng các thuốc diệt cỏ này có thể bị suy giảm.

Quần thể đột biến và sự thiết lập

Chương trình lai đột biến được bắt đầu để phát triển các dòng dung nạp thuốc diệt cỏ độc quyền. Quần thể đột biến thường xuyên được tạo ra bằng cách cho khoảng 10.000 hạt giống (được ước tính theo trọng lượng trung bình của hạt) của ba dòng bao gồm P1003, R0146, và P1062 tiếp xúc với các tác nhân gây đột biến natri azit (AZ) và metyl-nitrosoure (MNU). Các hạt đã xử lý được gieo trồng. Các cá thể thực vật thu được tạo ra 8281 dòng đột biến. Các dòng đột biến được duy trì dưới dạng quần thể đột biến thường xuyên để sàng lọc tính trạng.

Sự sàng lọc thuốc diệt cỏ

Quần thể đột biến thường xuyên được sàng lọc bằng thuốc diệt cỏ quizalofop. Các tác giả sáng chế đã trồng 2735 hàng cây thể hệ con M2 từ R0146, 3774 hàng cây thể hệ con M2 từ P1003 và 655 hàng cây thể hệ con M2 từ P1062 trong hai thử nghiệm với khoảng 250.000 cây ở mỗi lần thử nghiệm. Quizalofop được phun với tỷ lệ 15 oz/acre (115,59 gmai/ha) đối với lần thử nghiệm thứ nhất 27 ngày sau khi trồng. Các cây trồng ở giai đoạn 3-4 lá và đang rất phát triển khi được phun thuốc diệt cỏ. Cánh đồng được phun nước vào ngày sau khi phun. Sau khoảng 9 ngày, số lượng cây trồng sống sót được tính trong bốn hàng cây thể hệ con khác nhau thể hiện tỷ lệ đột biến ước tính là 0,006% (các FIG.1-3).

So sánh trình tự protein ở các dòng có tính kháng các thuốc diệt cỏ ACCaza

Phần gen mà mã hoá cho protein ACCaza thể hạt được xác định trình tự từ tất cả các cây trồng còn sống sau khi phun thuốc diệt cỏ quizalofop. Chỉ có vùng mã hoá carboxyl transferaza của gen được xác định trình tự (FIG.4). Tất cả các cây trồng có nguồn gốc từ dòng ML0831265-01493 có sự đột biến về trình tự ADN mà gây ra sự thay đổi axit amin ở protein ACCaza. Một bazơ ADN được thay đổi trong codon cho axit amin 2096 so với sự đánh số trong Black-

Grass. (Gen Bank CAC84161.1, được ký hiệu là "*Am*") (FIG.5). Trong cả cây lúa lẫn hệ thống Black-Grass, axit amin ở vị trí 2096 là glyxin. Sự đột biến tính kháng thuốc trong hệ thống Black-Grass làm thay đổi axit amin ở vị trí này thành alanin. Sự đột biến được nhận thấy ở cây lúa còn sống sau khi phun thuốc diệt cỏ quizalofop với ký hiệu ML0831265-01493 thay đổi codon ADN cho axit amin 2096 từ GGC thành AGC dẫn đến serin được xen vào vị trí 2096 thay cho glyxin. Dòng đột biến có tính kháng quizalofop ở quá trình sàng lọc thứ nhất của quần thể đột biến. Sự sàng lọc sau đó bằng quizalofop xác nhận tính kháng đối với các thuốc diệt cỏ FOP. Các dòng đột biến còn sống có thể chịu được các thuốc diệt cỏ ức chế ACCaza kiểu DIM.

Không có dòng nào từ quần thể đột biến còn sống sau quá trình sàng lọc bằng quizalofop có sự đột biến ở vùng carboxyl transferaza của gen mã hoá ACCaza, tuy nhiên, chúng đã được xác nhận là có tính kháng thuốc diệt cỏ quizalofop. Tính kháng thuốc ở các dòng này có khả năng thu được từ các sự thay đổi bên ngoài vùng carboxyl transferaza của ACCaza hoặc có thể thu được từ kiểu cơ chế kháng khác.

Thực vật có tính kháng thuốc

Sau quá trình xử lý bằng thuốc diệt cỏ, các thực vật còn sống trước khi trồng có màu xanh và trông khoẻ mạnh trong khi tất cả các thực vật xung quanh hàng cây và các dãy lân cận bị tàn lụi. Các thực vật sau khi trồng được chăm sóc và thu hoạch. Thế hệ con được chăm sóc, thử nghiệm, và phát triển làm nguồn cung cấp tính kháng thuốc diệt cỏ trong quá trình tạo ra cây lúa (bảng 1). Tính trạng này được lai ngược hoặc được lai vào trong các dòng lúa độc quyền và được sử dụng để phát triển các giống mới hoặc các thể lai mới mà sẽ cung cấp cho nhà sản xuất cơ chế tác động thích hợp khác để phòng trừ các loại cỏ ở cánh đồng lúa. Cơ hội này tạo cho người trồng đạt được lợi ích lớn là thu được năng suất cao và kéo dài thời gian sử dụng hữu ích của các công nghệ phòng trừ cỏ được sử dụng hiện nay. Các dòng kháng thuốc diệt cỏ này có thể được theo dõi thông qua quá trình phun đơn giản các thuốc diệt cỏ

lên các thực vật đang phát triển hoặc thông qua các kỹ thuật phân tử. Vì trình tự đầy đủ của các dòng đột biến là đã biết bao gồm cả sự đột biến gây ra tính kháng thuốc diệt cỏ, các gen đánh dấu phân tử có thể được tạo ra, như các gen đánh dấu đa hình nucleotit đơn, cho sự chọn lọc các thực vật và các dòng có tính kháng thuốc. Các gen đánh dấu này cùng với các thử nghiệm sinh học về thuốc diệt cỏ tạo điều kiện thuận lợi cho sự phát triển của ít nhất kiểu kháng thuốc diệt cỏ ACCaza FOP ở cây lúa.

Quá trình chọn lọc cây lúa kháng thuốc diệt cỏ trong chương trình lai được hoàn thành bằng cách phun thuốc diệt cỏ vào thế hệ con trong thử nghiệm sinh học để quan sát vật liệu kế thừa tính kháng thuốc. Theo cách khác, dòng ML0831265-01493 có thể được chọn bằng cách xác định trình tự đoạn gen chứa sự đột biến hoặc bằng cách tạo ra gen đánh dấu đa hình nucleotit đơn để phát hiện sự đột biến.

Tạo ra cây lúa lai dung nạp/kháng chất ức chế ACCaza

Sự phát triển có ích của tính trạng phòng trừ cỏ ở cây lúa là dựa trên cơ sở phun các thuốc diệt cỏ ACCaza kiểu FOP hiện có thể thực hiện được. Trước đây, các thuốc diệt cỏ này không được phun vào lúa bởi vì chúng làm hại cây lúa. Bất kỳ dòng lúa được nêu là thích hợp để được phát triển thành cây lúa hoặc thể lai và được sử dụng trong quá trình sản xuất lúa dưới dạng phương pháp phòng trừ cỏ dại. Tính trạng kháng thuốc này được giải thích là có thể được di truyền hoàn toàn cho phép lai và phát triển.

Tính trạng này giải thích cho việc sống sót và tạo ra bộ hạt giống chuẩn sau khi phun các thuốc diệt cỏ FOP ở các tỷ lệ mà thường gây hại lúa. Ngoài ra, tính trạng này có thể cải thiện hơn nữa đối với việc phun nhiều thuốc diệt cỏ FOP. Các mức độ kháng thuốc diệt cỏ làm nhằm cho phép phòng trừ hoàn toàn cây lúa cỏ và các loài cỏ dại khác.

Tính trạng này hoàn toàn có thể chọn được bằng thử nghiệm sinh học về thuốc diệt cỏ hoặc gen đánh dấu phân tử cho phép chọn lọc và lai để phát triển các giống cây lúa mới và các thể lai có tính kháng thuốc diệt cỏ FOP. Tính

kháng thuốc được tạo ra ở dòng ML0831265-01493 là nhờ một gen tác động vượt trội một phần hoặc toàn bộ làm cho nó hoàn toàn thích hợp để được lai ngược vào cây trồng hiện đang bán trên thị trường. Theo cách khác, dòng ML0831265-01493, mặc dù khuyết thiếu các đặc tính chất lượng chủ đạo cho một số thị trường, vẫn là phù hợp để được sử dụng làm dòng cha mẹ trong chương trình lai hệ phả. Theo cách khác, dòng này nếu được lai chéo với các dòng cái cụ thể, có thể được sử dụng để trực tiếp sinh ra hạt giống lai có tính kháng thuốc diệt cỏ, như được nêu trong bản mô tả này.

Các dòng thích hợp mà trong khi chuyển hoán với các gen mà được đề cập trong bản mô tả này tạo ra giống lúa thương mại kháng các thuốc diệt cỏ ức chế ACCaza, các hạt giống này được lưu giữ trong ATCC dưới ký hiệu PTA-8504, PTA-8505, PTA-836 và PTA-6795. Sự chuyển hoán có thể xảy ra nhờ các phương pháp lai hoặc các phương pháp tái tổ hợp.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Các kết quả đáp ứng tỷ lệ thuốc diệt cỏ quizalofop của các cây lúa ML0831265-01493

Các dòng lúa có sự đột biến G2096S được thử nghiệm về mức độ kháng thuốc diệt cỏ quizalofop (Assure II®) bằng cách thử nghiệm hàng loạt tỷ lệ phun khác nhau của thuốc diệt cỏ. Quá trình xử lý theo tỷ lệ thuốc diệt cỏ là như được thể hiện trên FIG.6. Tất cả các quá trình xử lý được phun ở giai đoạn 2-3 lá. Hai mươi một ngày sau khi phun, các luống thử nghiệm được đánh giá. Thuốc diệt cỏ được phun với thể tích 10 gal/acre và với nồng độ dầu của cây trồng (Crop Oil Concentrate) 1%. Các quá trình xử lý được đánh giá theo tỷ lệ phần trăm mức tổn hại so với luống đối chứng không được phun.

Nguồn đột biến G2096S là dòng ML0831265-01493. Mẫu hạt từ ML0831265-01493 được lưu giữ theo ATCC. Dòng này là giống dòng R0146, chỉ khác nó có tính kháng vài loại thuốc diệt cỏ ACCaza do sự đột biến gây ra sự thay đổi axit amin từ glyxin thành serin ở vị trí 2096 ở gen ACCaza.

Bốn sự chọn lọc ML0831265-01493 khác nhau đều có sự đột biến

G2096S được lặp lại ba lần với mỗi quá trình xử lý và được thử nghiệm cùng với dòng R0146 không đột biến. Các kết quả là dựa trên sự tính điểm hai mươi một ngày sau khi phun thuốc diệt cỏ.

Ví dụ 2: Các kết quả đáp ứng tỷ lệ thuốc diệt cỏ ức chế ACC của các dòng lúa có sự đột biến G2096S

Các dòng lúa (ML0831265-01493) có sự đột biến G2096S được thử nghiệm về sự phản ứng lại đối với các thuốc diệt cỏ ức chế ACCaza khác nhau. Một bộ thuốc diệt cỏ (FIG.7) được chọn và được phun lên ba dòng lúa có sự đột biến G2096S cùng với giống ban đầu không được gây đột biến R0146. Sự phản ứng của dòng R0146 và dòng được gây đột biến được thể hiện trên FIG.7. Tỷ lệ phun thuốc diệt cỏ là gấp đôi mức tỷ lệ được ghi trên nhãn trừ quizalofop và clethodim, tỷ lệ này gấp đôi tỷ lệ được chọn làm tỷ lệ vừa đủ để làm lụi lúa.

Tất cả các quá trình xử lý được phun ở giai đoạn 2-3 lá khoảng 20 ngày sau khi hạt giống được gieo trồng. Hai mươi một ngày sau khi phun, các luống thử nghiệm được đánh giá. Thuốc diệt cỏ được phun với thể tích 10 gal/acre và với nồng độ dầu của cây trồng 1%. Các quá trình xử lý được đánh giá theo tỷ lệ phần trăm mức tổn hại so với luống đối chứng không được phun.

Mẫu hạt giống từ ML0831265-01493 được lưu giữ theo ATCC. Dòng này là tương tự với R0146 chỉ khác là nó có tính kháng một số thuốc diệt cỏ ACCaza do sự đột biến gây ra sự thay đổi axit amin từ to glyxin thành serin ở vị trí 2096 trong gen ACCaza.

Ba sự chọn lọc ML0831265-01493 đều có sự đột biến G2096S được lặp lại hai hoặc ba lần cho từng quá trình xử lý và được thử nghiệm cùng với dòng R0146 không đột biến. Các kết quả là dựa trên sự tính điểm hai mươi một ngày sau khi phun thuốc diệt cỏ.

Các sự đột biến khác nhau ở gen mã hoá ACCaza thường liên quan đến tính kháng các kiểu đặc trưng của các thuốc diệt cỏ ức chế ACCaza

(FOP), (DIM). Tính đặc hiệu của các sự đột biến khác nhau tạo ra khả năng phát triển nhiều cơ chế tác động để phòng trừ cỏ ở lúa. Ví dụ, FIG.9 cho thấy rằng sự đột biến G2096S được mô tả trong bản mô tả này truyền tính dung nạp lớn hơn ở lúa đối với hai thuốc diệt cỏ kiểu FOP ức chế ACCaza so với sự đột biến đã được công bố gần đây khác. Sự đáp ứng khác nhau của dòng lúa ML0831265-01493 đối với các thuốc diệt cỏ FOP cho thấy rằng sự phát triển thương mại của dòng này hoặc các dòng gần như tương tự tạo ra cơ chế tác động mới để phòng trừ cỏ hiện không có giá trị so với các nguồn khác.

Ví dụ 3: Dòng lúa đột biến ML0831265-01493 không thể hiện các sự khác biệt bên ngoài so với dòng lúa R0146 không được gây đột biến về các đặc tính khác với cây lúa kháng chất ức chế ACCaza.

Ở các luống thử nghiệm, dòng đột biến ML0831265-01493 được quan sát kỹ lưỡng cùng với dòng không đột biến R0146. Không thấy có sự khác biệt nào. Các cây trồng thể hiện các kiểu sinh trưởng giống nhau. Sức khỏe và tình trạng của cây trồng cũng là tương tự nhau mà không phát hiện thấy bất kỳ sự khác biệt nào. Vài đặc tính mà được xác định cũng thể hiện sự khác biệt đáng kể giữa dòng đột biến ML0831265-01493 và dòng không được gây đột biến R0146 (bảng 2). Sự đột biến G2096S ở dòng ML0831265-01493 không thể hiện các tác động tiêu cực đến sự sinh trưởng bình thường hoặc tính thích ứng của cây trồng.

Ví dụ 4: Sự phát triển các gen đánh dấu ADN để chọn các cây trồng có sự đột biến.

Các gen đánh dấu ADN cho phép lựa chọn các tính trạng cụ thể mà không phải để ý đến kiểu hình. Trong trường hợp của dòng ML0831265-01493, sự đột biến gây ra tính kháng thuốc là đã biết bao gồm trình tự ADN đặc trưng và trình tự xung quanh. Nhờ biết được trình tự nên có thể cho phép thiết kế, tạo ra và sử dụng hệ gen đánh dấu bất kỳ mà sẽ phát hiện được các hiện tượng đa hình của nucleotit đơn.

Trong phần lớn các thử nghiệm phát hiện nucleotit đơn, đoạn môi được

đánh dấu bằng thuốc nhuộm phát huỳnh quang và được tổng hợp dựa vào trình tự ADN để ủ với một nucleotit ở vị trí đột biến. Đoạn môi thứ hai cũng được tạo ra mang thuốc nhuộm phát huỳnh quang thứ hai có màu khác để ủ với nucleotit khác ở vị trí đột biến. Cả hai đoạn môi đều được cho ủ với mẫu ADN từ một cá thể thực vật. Sau đó chỉ rửa các đoạn môi mà có cặp đoạn môi được ủ vẫn còn trong mẫu. Sự phát huỳnh quang được đo và dựa vào màu sắc phát hiện được nucleotit ở vị trí đột biến được xác định. Tùy thuộc vào màu sắc được phát hiện, nếu nhận thấy có một màu có nghĩa là mẫu có đồng hợp tử cho kiểu không đột biến hoặc kiểu đột biến, và phát hiện ra cả hai màu có nghĩa là mẫu có dị hợp tử.

Bằng cách ứng dụng các gen đánh dấu nucleotit đơn cho quá trình đột biến, cho phép chọn lọc tính kháng thuốc diệt cỏ mà không cần để ý đến hiệu quả phun thuốc diệt cỏ lên cây trồng. Quá trình thử nghiệm bằng gen đánh dấu phân tử hoặc kiểu hình được yêu cầu cho đến khi chứng minh được dòng mới là có đồng hợp tử do đột biến. Các gen đánh dấu phân tử cho thấy nếu dòng hoặc thực vật có đồng hợp tử hoặc có dị hợp tử thì cho phép phát hiện tính đồng hợp của một thể hệ sớm hơn so với khả năng nhờ quan sát hiệu quả phun các thuốc diệt cỏ.

Ví dụ 5: Sự hợp nhất tính kháng ACCaza vào trong các dòng thương mại

Các cây trồng được sinh trưởng từ dòng ML0831265-01493 có sự đột biến G2096S (nguồn cung cấp gen) và các cây trồng có nguồn gốc từ dòng cha mẹ hồi quy, mà trong ví dụ này là P1233. Cây trồng P1233 bị làm mất tính đực theo các quá trình lai chuẩn và được thụ phấn với phấn hoa của các cây trồng thuộc dòng ML0831265-01493. 2-4 in-sơ lá của cây trồng được sử dụng để tiến hành quá trình lai và phân tích cây trồng bằng các gen đánh dấu phân tử để xác nhận bộ gen đánh dấu đa hình. Đây là cách tốt nhất để xác nhận khoảng 100 gen đánh dấu đa hình được đặt cách đều nhau qua hệ gen cây lúa. Thu được hạt giống F1 từ các cây P1233, hạt giống này được sử dụng làm nguồn cung cấp gen giống cái trong quá trình lai.

Các hạt giống F1 và dòng cha mẹ hồi quy, P1233 lại được gieo trồng và phát triển. Cây giống F1 được phun thuốc diệt cỏ để xác nhận quá trình lai thành công từ nguồn cung cấp gen kháng thuốc diệt cỏ. Các cây trồng không di truyền tính kháng thuốc sẽ tàn lụi. Ngoài ra, các cây trồng cũng có thể được thử nghiệm với một số gen đánh dấu đa hình để xác nhận chúng thực sự là cây trồng thế hệ F1, tức là, nhận các gen đánh dấu từ cả hai nguồn cung cấp gen, quá trình lai được lặp lại bằng cách sử dụng các cây trồng F1 có tính kháng thuốc làm nguồn cung cấp gen giống đực hoặc phấn hoa cho các thực vật từ dòng P1233 được làm mất tính đực và được sử dụng làm nguồn cung cấp gen giống cái. Sau khi hạt thành thực thì thu được hạt giống BC1F1.

Hạt giống BC1F1 và dòng cha mẹ hồi quy, P1233 được gieo trồng và phát triển. Cây giống BC1F1 được phun thuốc diệt cỏ để xác nhận chúng được di truyền sự đột biến dung nạp thuốc diệt cỏ từ nguồn cung cấp gen. Mô lá được thu thập từ các cây giống có tính dung nạp và được đưa đến phòng thí nghiệm để phân tích với các gen đánh dấu đa hình. Năm cây được chọn thể hiện phần cao nhất của hệ gen dòng P1233 trên cơ sở phân tích gen đánh dấu. Chúng được sử dụng làm thể cho phấn hoa cho các cây bị làm mất tính đực của dòng P1233. Sau khi hạt thành thực thì thu được hạt giống BC2F1.

Dòng BC2F1 và dòng cha mẹ hồi quy, P1233 được gieo trồng và phát triển. Cây giống BC2F1 được phun thuốc diệt cỏ để xác nhận chúng được di truyền sự đột biến dung nạp thuốc diệt cỏ từ nguồn cung cấp gen. Mô lá được thu thập từ các cây giống có tính dung nạp và được đưa đến phòng thí nghiệm để phân tích bằng toàn bộ các gen đánh dấu không cố định (phân ly). Năm cây được chọn cho thấy mức khôi phục hơn 95% hệ gen P1233 và chúng được cho tự thụ phấn. Công đoạn lai ngược được lặp lại nếu không có cá thể nào thể hiện mức phục hồi ít nhất 95% hệ gen P1233. Hạt giống BC2F2 thu được từ các cá thể cây tự thụ phấn.

Ít nhất 24 cá thể hạt BC2F2 từ mỗi cây được gieo trồng và phát triển. Mô lá được thu thập; ADN được chiết và được xác định trình tự để nhận dạng các

cá thể mà mang sự đột biến G2096S ở tình trạng có đồng hợp tử. Các cây này được cho phép tự thụ phấn. Hạt BC2F3 từ các cây này được thu và xác nhận là dòng dung nạp thuốc diệt cỏ mới của P1233. Các dòng hoặc các hàng thể hệ con được phát triển ở các dây đầu và tiến hành lựa chọn dây tốt nhất để thúc đẩy các thử nghiệm lai chéo thể lai và năng suất.

Quy trình tương tự cũng có thể được thực hiện để phát triển các dòng khác mà có tính kháng các thuốc diệt cỏ kiểu FOP ACCaza. Dòng cha mẹ hồi quy được chọn làm dòng S để phát triển tính kháng thuốc ở nguồn cung cấp gen giống cái được sử dụng trong quá trình sản xuất thể lai. Theo cách khác, tính kháng có thể được phát triển trong nhiều dòng cha mẹ hồi quy. Một dòng cha mẹ hồi quy là dòng có tính được sử dụng trong thể lai và dòng còn lại là dòng có tính cái được sử dụng trong thể lai để tạo ra thể lai mà có tính kháng thuốc (đột biến G2096S) ở điều kiện có đồng hợp tử. Các ví dụ khác về các dòng cha mẹ hồi quy có thể là các dòng mang các tính trạng có tính thương mại hiện nay như tính kháng thuốc diệt cỏ khác hoặc thậm chí là các tính trạng chuyển gen. Các dòng cha mẹ khác có thể thu được từ các sự sàng lọc các dòng đột biến khác và được chọn để kết hợp nhiều tính trạng vào trong một dòng đơn nhất.

Ví dụ 6: Phát triển các dòng thương mại mới có tính kháng các thuốc diệt cỏ FOP kiểu ACCaza

Tính kháng thuốc ở lúa đối với các thuốc diệt cỏ kiểu FOP ACCaza được phát triển trong các dòng cha mẹ lai hoặc các giống lai thông qua quá trình lai. Tiến hành phân tích kỹ dòng ML0831265-01493 về các ưu nhược điểm di truyền để xác nhận các dòng mà sẽ hiệu chỉnh điểm yếu ở dòng ML0831265-01493. Dòng ML0831265-01493 mang tính kháng thuốc diệt cỏ làm dòng cha mẹ tính được sử dụng sao cho các thử nghiệm sinh học riêng rẽ (phun các thuốc diệt cỏ lên cây trồng thử nghiệm và quan sát các cây này sống dưới dạng các cá thể mà được di truyền tính kháng thuốc) có thể được áp dụng để xác định các quá trình lai thành công.

Sau khi chọn một hoặc nhiều dòng cha mẹ phù hợp, quá trình lai trước tiên được thực hiện với một dòng được chọn. Các quá trình lai với các dòng cha mẹ khác có thể được tiến hành ở các thế hệ sau để góp phần bổ sung các tính trạng hoặc biến đổi di truyền. Trong ví dụ này, quá trình phát triển sẽ chỉ liên quan đến một quá trình lai với P1003 để nâng cao các đặc tính còn yếu kém của dòng đột biến ML0831265-01493. Các dòng cha mẹ khác được chọn từ quần thể đột biến mang tính kháng thuốc diệt cỏ khác cho phép nhiều thuốc diệt cỏ được sử dụng để phòng trừ cỏ trong quá trình sản xuất lúa. Các dòng cha mẹ cũng được chọn, các dòng cha mẹ này có tính kháng thuốc diệt cỏ đã phát triển rồi và có bán trên thị trường hoặc các tính trạng chuyển gen.

Ở bước thứ nhất, dòng cha mẹ được chọn P1003 được làm mất tính được sử dụng làm dòng cha mẹ mang tính cái và được cho là tạo ra các đặc tính đơn nhất và khi được tái tổ hợp với dòng ML0831265-01493 sẽ dẫn đến sự phát triển giống mới hoặc dòng cha mẹ mới cho thế lai. Phần từ dòng đột biến ML0831265-01493 mang sự đột biến G2096S được sử dụng để thụ phấn các cây bị làm mất tính được của dòng P1003. Hạt giống F1 được thu gom và gieo trồng. Nếu cần, có thể tiến hành quá trình lai bổ trợ với các dòng cha mẹ hoặc với dòng cha mẹ khác với mục đích đưa các đặc tính khác và sự biến đổi di truyền vào.

Tiến hành nuôi dưỡng hạt giống F1 và phun thuốc diệt cỏ để xác nhận quá trình lai là thành công. Các cây sống sót sẽ là cây thế hệ F1 thực sự và được cho phép tự tạo ra hạt giống F2. Hạt giống F2 sau đó sẽ được trồng và lại được phun để xác nhận các cây được di truyền tính kháng thuốc diệt cỏ. Các cây vẫn còn sống là các cây có đồng hợp tử hoặc dị hợp tử cho tính trạng kháng thuốc diệt cỏ. Nếu các tính trạng khác là có lợi, chúng cũng sẽ được đánh giá ở giai đoạn này về tính di truyền ở các cây F2. Chọn các cây F2 sống sót sau quá trình xử lý bằng thuốc diệt cỏ và cho phép chúng tự thụ phấn để tạo ra hạt giống F3. Thu lấy hạt giống F3 từ các cây này và nuôi dưỡng làm họ F3.

Các họ F3 sau đó được trồng thành các hàng và lại được phun thuốc diệt cỏ để xác nhận các cây F2 và các họ F3 là đồng hợp tử đối với tính kháng thuốc

diệt cỏ. Các sự chọn lọc được tiến hành trong số các họ F3 mà có gen xác định tính trạng cho tính kháng thuốc diệt cỏ cho các tính trạng khác và các đặc tính có ích. Hạt giống F4 thu được từ các dây được chọn.

Hạt giống F4 được sử dụng trực tiếp trong các thử nghiệm về năng suất để phát triển giống mới hoặc thử nghiệm lai để chọn các dòng cha mẹ để tạo ra các hạt giống lai để thử nghiệm trong các thử nghiệm về năng suất. Tiến hành các sự lựa chọn về năng suất và các tính trạng mong muốn khác và các đặc tính như chất lượng trong số các dòng trong các thử nghiệm về năng suất. Hạt giống F4 cũng sẽ được gia tăng đến F5 tại đó các sự lựa chọn các tính trạng mong muốn cũng có thể được thực hiện. Hạt giống F5 sẽ được sử dụng lại trong các quá trình lai thử nghiệm cho các thử nghiệm về năng suất với các hạt giống lai cũng như được đưa trực tiếp vào trong các thử nghiệm về năng suất nếu cần phát triển một giống.

Sau các thử nghiệm về năng suất, bao gồm cả thử nghiệm sao chép và nhiều vị trí, và thử nghiệm đầy đủ về sự đáp ứng tính trạng, sự lựa chọn sau cùng được thực hiện để xác nhận một hoặc vài dòng để giải phóng dưới dạng dòng được mã hoá. Các dòng này sau đó được sử dụng để gia tăng và giải phóng hạt dưới dạng giống mới hoặc dòng cha mẹ trong thế lai.

Ví dụ 7: Tính kháng thuốc diệt cỏ được triển khai trong các thế lai

Tính kháng thuốc diệt cỏ được mô tả ở dòng ML0831265-01493 có khả năng là trộn hoặc trội một phần. Tính kháng được triển khai trong thế lai bằng cách kết hợp vào trong dòng cha mẹ tính đực, dòng cha mẹ tính cái hoặc cả hai. Bất kỳ sự kết hợp nào được phát triển để phòng trừ hoàn toàn cỏ ở lúa với kiểu FOP ACCaza của thuốc diệt cỏ. Nhờ tiến hành quá trình được nêu trong các ví dụ, các dòng cha mẹ nêu trên được phát triển để có tính kháng thuốc diệt cỏ ACCaza. Các dòng cha mẹ này sau đó được sử dụng trong hệ thống sản xuất hạt giống lai mang tính kháng ACCaza đối với các thuốc diệt cỏ kiểu FOP. Quá trình sản xuất hạt giống bao gồm việc trồng dòng cái vào các dây kế tiếp với dòng đực. Các dòng cái chính là dòng đực bất dục để phòng ngừa sự tự thụ

phần. Các dòng cái sau đó được thích hợp phần bởi các dòng đực và được thu lấy để tạo ra hạt giống F1. Hạt giống F1 là hạt lai và được trồng để sinh ra hạt lúa. Trong tình huống ở đó một giống được phát triển, hạt giống được trồng một cách riêng biệt và sau đó được thu lấy để bán cho người trồng để làm ra hạt lúa.

Trong quá trình chuẩn bị tạo ra hạt giống lai hoặc hạt giống từ các dòng được chọn có tính kháng ACCaza thu được từ các dòng ML0831265-01493 phải là thuần chủng, được thử nghiệm kỹ, và được gia tăng.

Trong ví dụ tạo ra hạt giống lai có tính kháng các thuốc diệt cỏ kiểu FOP ACCaza, tính kháng này có thể được tạo ra ở dòng cha mẹ tính đực, dòng cha mẹ tính cái hoặc cả hai. Việc tạo ra tính kháng ở cả hai dòng cha mẹ có thể là cần thiết để có mức độ kháng thuốc đủ cao để ngăn ngừa thuốc diệt cỏ làm tổn hại đến cây lúa khi được phun thuốc diệt cỏ. Tuy nhiên, cơ chế phân phối thích hợp hơn trong các thể lai là nếu tính kháng có thể được tạo ra trong chỉ dòng cha mẹ tính đực hoặc chỉ ở dòng cha mẹ tính cái.

Bằng cách tạo ra tính kháng ở chỉ dòng cha mẹ tính đực dẫn đến quá trình loại bỏ hạt có tính cái trên cánh đồng của người trồng. Với tính kháng thuốc chỉ được cung cấp từ dòng cha mẹ tính đực thì khi người trồng phun thuốc diệt cỏ, tất cả các thực vật giống cái sẽ mẫn cảm với thuốc diệt cỏ và do vậy sẽ bị loại. Cánh đồng của người trồng sẽ loại bỏ được những cây con yếu nhờ hoá chất và dẫn đến chỉ còn các cây lai.

Cũng có thể tính kháng ACCaza đối với các thuốc diệt cỏ FOP bằng cách kết hợp với các tính trạng khác. Ví dụ, kháng các thuốc diệt cỏ với các cơ chế hoạt động khác hoặc các tính trạng khác như như kháng côn trùng, chịu hạn. Việc kết hợp với các tính trạng khác có thể thực hiện được nhờ các phương pháp thông thường hoặc các phương pháp chuyển gen.

Trong một ví dụ, tính kháng ACCaza được kết hợp vào trong dòng cha mẹ tính cái và tính kháng thuốc diệt cỏ thích hợp khác được kết hợp vào trong dòng cha mẹ tính đực. Hạt giống kháng cả hai thuốc diệt cỏ này và người trồng có thể sử dụng một hoặc cả hai thuốc diệt cỏ để phòng trừ cỏ. Theo cách khác,

chỉ một loại tính kháng được tạo ra trong thể lai riêng biệt. Cả hai hệ thống cũng như các kế hoạch khác đều cung cấp cho người trồng các sự lựa chọn bổ sung để phòng trừ cỏ và có khả năng kéo dài thời gian sử dụng hữu ích của các thuốc diệt cỏ. Trong trường hợp triển khai ở chỉ một dòng cha mẹ hoặc chỉ một thể lai, bất kỳ cây lúa đỏ mà phát triển tính kháng thông qua sự lai ngoại huyết sẽ chỉ di truyền một loại tính kháng và sẽ bị diệt trừ nhờ phun thuốc diệt cỏ có cơ chế tác động thích hợp.

Ví dụ 8: Sản xuất hạt

Tính kháng thuốc diệt cỏ có thể được sử dụng để sản xuất hạt giống lai. Ví dụ, nếu dòng cha mẹ tính cái được phát triển có tính kháng thuốc diệt cỏ kiểu FOP ACCaza nhờ sự di truyền từ dòng ML0831265-01493 thì thuốc diệt cỏ có thể được sử dụng trong quá trình sản xuất hạt để loại trừ dòng cha mẹ tính đực. Bằng cách triển khai trong dòng cha mẹ tính cái, làm cho nó có tính kháng, rồi thì thuốc diệt cỏ được phun lên cánh đồng sản xuất hạt để diệt trừ các cây đực trước khi gieo hạt nhưng sau khi thụ phấn. Theo cách này, dòng cha mẹ tính đực được ngăn không cho gieo hạt và cho phép cánh đồng sản xuất hạt thu hoạch với sản lượng cao hơn thay vì chỉ thu hoạch các hàng cây có tính cái. Ngoài ra, độ thuần khiết của hạt giống lai cũng có thể được thẩm định thông qua việc truyền tính kháng ở chỉ một dòng cha mẹ. Bất kỳ hạt cùng loại của dòng cha mẹ khác bị tàn lụi khi được phun thuốc diệt cỏ.

Thông tin mẫu lưu giữ

Mẫu sản phẩm của RiceTec, Inc. ML0831265-01493 được đề cập ở trên và được nêu trong phần yêu cầu bảo hộ đã được lưu giữ tại American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110. Ngày gửi là 30/05/2012. Tất cả các sự giới hạn sẽ bị loại bỏ trong quá trình cấp patent, và mẫu vật được mong đợi đáp ứng tất cả các yêu cầu của điều khoản 37 C.F.R. .sctn..sctn.1.801-1.809. Mã số ATCC là PTA-12933. Mẫu vật sẽ được lưu giữ trong kho trong thời gian ba năm, hoặc năm năm sau lần yêu cầu gần nhất, hoặc trong thời gian còn hiệu lực của patent, bất kể kéo dài bao lâu, và sẽ

được thay thế nếu cần trong suốt thời gian đó.

Hạt giống được lưu giữ ngày 19/3/2013 với ký hiệu ML0831265-02283 như mã số ATCC là PTA-13619.

Trong một số phương án và khía cạnh được lấy làm ví dụ nêu trên, các chuyên gia trong lĩnh vực sẽ thừa nhận các sự thay đổi, các sự hoán vị, các sự bổ sung và các sự kết hợp phụ. Do vậy, phần yêu cầu bảo hộ được hiểu bao gồm tất cả các sự thay đổi, các sự hoán vị, các sự bổ sung và các sự kết hợp phụ vì đều nằm trong phạm vi của sáng chế.

Các định nghĩa

Trong phần mô tả và các bảng sau đây có sự dụng một số thuật ngữ. Nhằm làm sáng tỏ và hiểu rõ hơn về bản mô tả và yêu cầu bảo hộ, bao gồm cả phạm vi mà thuật ngữ này bao quát, các định nghĩa sau đây được đưa ra:

Alen: Alen là một trong số nhiều dạng thích hợp khác của gen, nói chung đều liên quan đến một tính trạng hoặc một đặc tính. Trong tế bào lưỡng bội hoặc tổ chức lưỡng bội, hai alen của gen cụ thể chiếm các ổ gen tương ứng trên cặp nhiễm sắc thể tương đồng.

Lai ngược: quá trình lai thể hệ con lai với một dòng cha mẹ, ví dụ, thể lai thể hệ thứ nhất F1 với một trong số các kiểu gen cha mẹ của thể lai F1.

Thể lai: lai tự nhiên các hạt lúa giống của cây lúa lai với các hạt của một, hai, ba, bốn hoặc nhiều cây lúa lai, giống lúa hoặc dòng lúa lai cận huyết khác để tạo ra cây trồng chứa các đặc tính của tất cả các hạt lúa và cây lúa trong thể lai này.

Tế bào: tế bào như được sử dụng ở đây bao gồm tế bào thực vật, được đã tách trong môi trường nuôi cấy mô hoặc được đồng hoá trong thực vật hoặc một bộ phận của thực vật.

Cây trồng: giống hoặc chủng tồn tại trong quá trình trồng trọt.

Phôi: phôi là một dạng cây nhỏ có trong hạt trưởng thành.

Gần như tất cả các đặc tính về hình thái và sinh lý. Thực vật có hầu như tất cả các đặc tính về hình thái và sinh lý của thể lai hoặc cây trồng, trừ các đặc tính có nguồn gốc từ gen được chuyển hoán.

Năng suất hạt: trọng lượng của hạt thu được từ vùng xác định. Năng suất hạt cũng có thể được xác định một cách gián tiếp bằng cách lấy số chùm trên đơn vị diện tích nhân với số hạt trên một chùm và nhân với trọng lượng hạt.

Ô gen: ô gen là vị trí trên nhiễm sắc thể mà chuỗi ADN chiếm lấy; nó truyền một hoặc nhiều tính trạng như, ví dụ, làm bất thụ tính đực, dung nạp thuốc diệt cỏ, kháng côn trùng, chống bệnh tật, tinh bột sáp, cải biến sự chuyển hoá axit béo, cải biến sự chuyển hoá axit phytic, cải biến sự chuyển hoá carbohydrat và cải biến sự trao đổi protein. Tính trạng này có thể, ví dụ, được truyền bởi gen xuất hiện tự nhiên được đưa vào trong hệ gen của giống đó bằng cách lai ngược, gây đột biến hoặc đột biến tự nhiên, hoặc gen chuyển được đưa vào bằng các phương pháp biến nạp di truyền. Ô gen có thể bao gồm một hoặc nhiều alen được kết hợp ở vị trí nhiễm sắc thể đơn.

Thực vật: như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "thực vật" bao gồm đề cập đến toàn bộ thực vật chưa trưởng thành hoặc trưởng thành, kể cả thực vật từ đó hạt giống hoặc hạt gạo hoặc bao phấn đã bị lấy ra. Hạt hoặc phôi mà sẽ tạo ra cây cũng được coi là thực vật.

Bộ phận của thực vật: như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "bộ phận của thực vật" (hoặc cây lúa, hoặc một bộ phận của cây lúa) bao gồm các thể nguyên sinh, lá, thân, rễ, đầu rễ, bao phấn, hạt, hột, phôi, phấn hoa, noãn, lá mầm, trụ dưới lá mầm, mày, chùm, hoa, chồi, mô, tế bào, tế bào phân sinh và tương tự.

Ô gen tính trạng định lượng (QTL - Quantitative Trait Loci): ô gen di truyền mà kiểm soát vài tính trạng đo số lượng cấp độ mà thường được phân bố liên tục.

Sự tái sinh: sự tái sinh là để chỉ sự phát triển của thực vật từ quá trình nuôi cấy mô.

Gen đơn được biến đổi (chuyển hoá): gen đơn được biến đổi (chuyển hoá) bao gồm các cây được phát triển bằng kỹ thuật lai thực vật được gọi là lai ngược trong đó hầu hết tất cả các đặc tính hình thái và sinh lý mong muốn của dòng lai cận huyết được khôi phục, trong khi vẫn giữ lại gen đơn được truyền vào trong dòng lai cận huyết nhờ quá trình lai và lai ngược. Thuật ngữ này cũng có thể là nói đến việc đưa gen đơn vào nhờ các kỹ thuật xử lý di truyền đã biết trong lĩnh vực này.

Bảng 1 — Các dòng lúa thu được từ các cây sống sót trong quần thể đột biến thường xuyên được xác nhận mang tính kháng thuốc diệt cỏ quizalofop. Mã số ATCC được thể hiện cho dòng có sự đột biến ở vùng carboxyl transferaza của gen ACCaza. Mã số ATCC chưa được đặt cho hai dòng còn lại.

Mẫu	Mã số ATCC	Đột biến ở miền CT
ML0831265-01493	PTA-12933	G2096S
ML0831265-02283	PTA-13619	Không
ML0831265-00776	Chưa có	Không

Bảng 2 — So sánh dòng đột biến ML0831265-01493 với dòng gốc không được gây đột biến R0146 thể hiện tính tương tự cao giữa hai dòng.

Dòng/nguồn	Các ngày đến 50% đầu	Loại thực vật	Chiều cao cm	Lông măng	Màu vỏ	Râu	Trọng lượng nghìn hạt, g	Năng suất/cây, g
R0146	87	Trương nước	93	Có lông măng	Xanh lục	Không	22,4	Không biết
11AG52084-2	88	Trương nước	92	Có lông măng	Xanh lục	Không	21,6	7,8g

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp phòng trừ cỏ dại ở cánh đồng lúa, phương pháp này bao gồm các bước:

(a) trồng cây lúa trên cánh đồng trong đó cây lúa này kháng các thuốc diệt cỏ ức chế ACCaza nhờ sự đột biến, và trong đó cây lúa được tạo ra từ các hạt lúa được lưu giữ dưới mã ATCC số PTA-12933 hoặc PTA-13619; và

(b) phun các thuốc diệt cỏ lên cánh đồng lúa.

2. Phương pháp tạo ra cây lúa có tính kháng các thuốc diệt cỏ ức chế ACCaza, trong đó tính kháng các thuốc diệt cỏ ức chế ACCaza thu được từ các gen của mã ATCC số PTA-12933 hoặc PTA-13619, phương pháp này bao gồm các bước:

(a) lai nhập gen cây lúa có các gen trong các hạt lúa được lưu giữ dưới mã ATCC số PTA-12933 hoặc PTA-13619 vào nguồn cây lúa không có tính kháng thuốc; và

(b) xác nhận cây lúa được lai nhập gen có tính kháng thuốc bằng cách phun ít nhất một trong số các thuốc diệt cỏ và xác định rằng tỷ lệ sống sót được tăng cường so với cây lúa không được lai nhập gen.

3. Cây lúa được ký hiệu ML0831265-02283, trong đó cây lúa này chứa thông tin di truyền từ hạt mẫu được lưu giữ dưới mã ATCC số PTA-13619, mà có tính kháng các chất ức chế ACCaza.

4. Cây lúa được ký hiệu ML0831265-01493, trong đó cây lúa này chứa thông tin di truyền từ hạt mẫu được lưu giữ dưới mã ATCC số PTA-12933, mà có tính kháng các chất ức chế ACCaza.

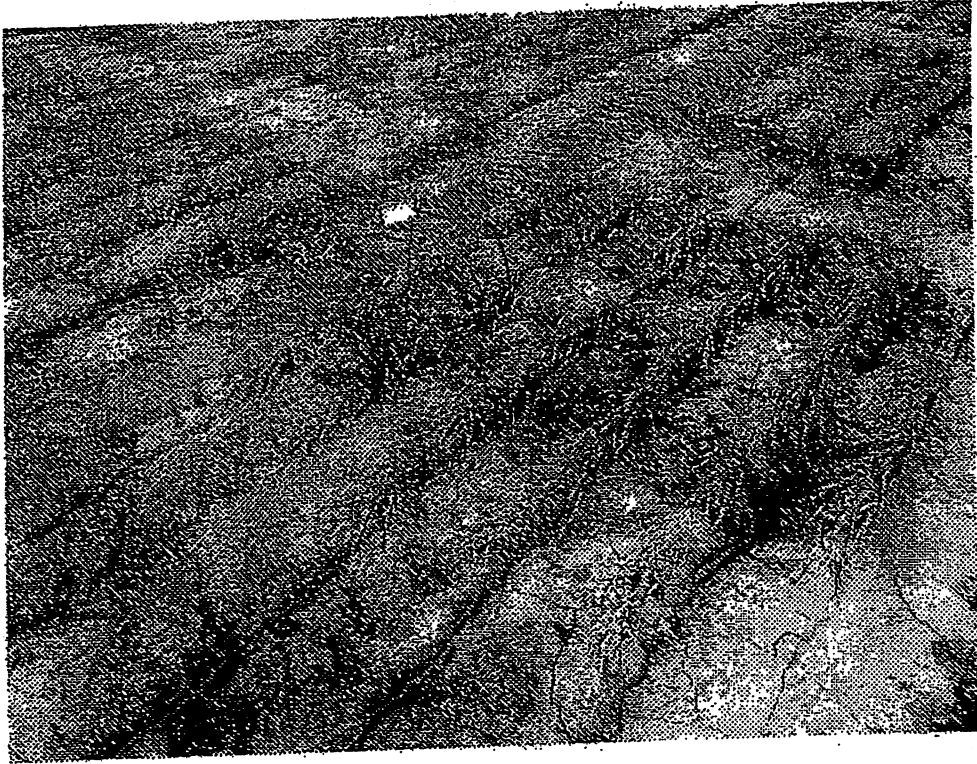


FIG. 1

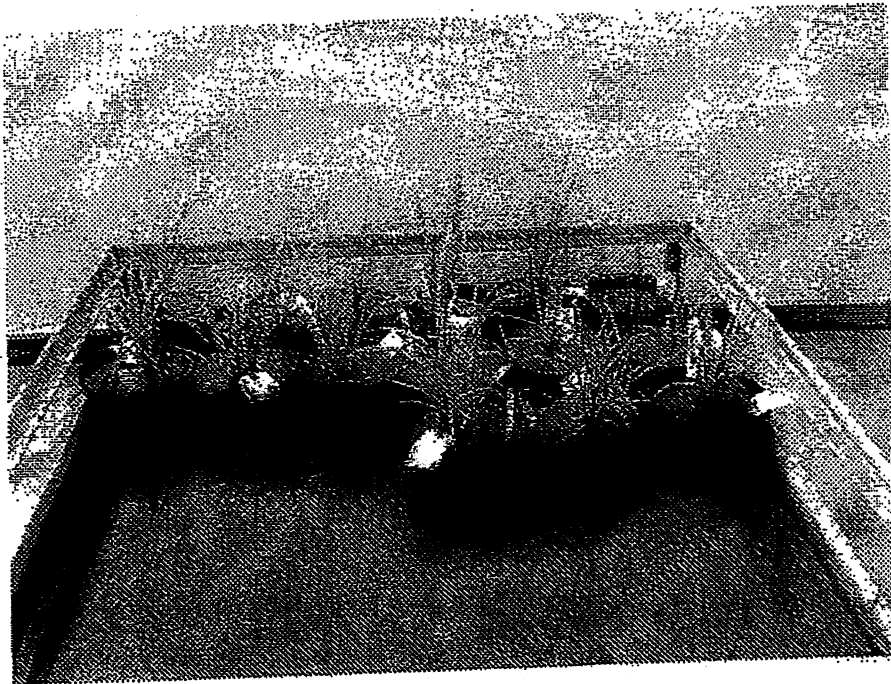


FIG. 2



FIG. 3

NIPPONBARE.TXT	CCTGTTCTGCTAGGAATAATAGAACTACATACTGCTATGATTTTCCACTGGTGAGTTGAC
R0146.TXT	CCTGTTCTGCTAGGAATAATAGAACTACATACTGCTATGATTTTCCACTGGTGAGTTGAC
09PM72399.TXT	CCTGTTCTGCTAGGAATAATAGAACTACATACTGCTATGATTTTCCACTGGTGAGTTGAC
NIPPONBARE.TXT	TGCTCCCTTATATTCAATGCATTACCATAGCAAATTCATATTCGTTTCATGTTGTCAAAT
R0146.TXT	TGCTCCCTTATATTCAATGCATTACCATAGCAAATTCATATTCGTTTCATGTTGTCAAAT
09PM72399.TXT	TGCTCCCTTATATTCAATGCATTACCATAGCAAATTCATATTCGTTTCATGTTGTCAAAT
NIPPONBARE.TXT	AAGCCGATGAAAATTCAAACCTGTAGGCATTGAACTGCAGTGAGGAAGTCATGGTCCT
R0146.TXT	AAGCCGATGAAAATTCAAACCTGTAGGCATTGAACTGCAGTGAGGAAGTCATGGTCCT
09PM72399.TXT	AAGCCGATGAAAATTCAAACCTGTAGGCATTGAACTGCAGTGAGGAAGTCATGGTCCT
NIPPONBARE.TXT	CTAGTACCTCTGGTGCTTCTAAAGGTGTGAAAATGCCCAATGTTATGTTAAAGCTACAG
R0146.TXT	CTAGTACCTCTGGTGCTTCTAAAGGTGTGAAAATGCCCAATGTTATGTTAAAGCTACAG
09PM72399.TXT	CTAGTACCTCTGGTGCTTCTAAAGGTGTGAAAATGCCCAATGTTATGTTAAAGCTACAG
NIPPONBARE.TXT	AGTTGGTATTTGCGGACAAACATGGGTCAITGGGGCACTCCTTTAGTTCAAATGGACCGGC
R0146.TXT	AGTTGGTATTTGCGGACAAACATGGGTCAITGGGGCACTCCTTTAGTTCAAATGGACCGGC
09PM72399.TXT	AGTTGGTATTTGCGGACAAACATGGGTCAITGGGGCACTCCTTTAGTTCAAATGGACCGGC
NIPPONBARE.TXT	CTGCTGGGCTCAATGACATTGGTATGGTAGCTTGGACCTTGAAGATGTCCACTCCTGAAT
R0146.TXT	CTGCTGGGCTCAATGACATTGGTATGGTAGCTTGGACCTTGAAGATGTCCACTCCTGAAT
09PM72399.TXT	CTGCTGGGCTCAATGACATTGGTATGGTAGCTTGGACCTTGAAGATGTCCACTCCTGAAT
NIPPONBARE.TXT	TTCTTAGTGGTAGGGAGATTATTGTTGTGCAAATGATATTACGTTTCAAGCTGGATCAT
R0146.TXT	TTCTTAGTGGTAGGGAGATTATTGTTGTGCAAATGATATTACGTTTCAAGCTGGATCAT
09PM72399.TXT	TTCTTAGTGGTAGGGAGATTATTGTTGTGCAAATGATATTACGTTTCAAGCTGGATCAT
NIPPONBARE.TXT	TTGGCCCAAGGGAAGATGCATTTTTTTGAAGCTGTTACCAACCTAGCCTGTGAGAAGAAAC
R0146.TXT	TTGGCCCAAGGGAAGATGCATTTTTTTGAAGCTGTTACCAACCTAGCCTGTGAGAAGAAAC
09PM72399.TXT	TTGGCCCAAGGGAAGATGCATTTTTTTGAAGCTGTTACCAACCTAGCCTGTGAGAAGAAAC
NIPPONBARE.TXT	TTCTCTTATTTATTTGGCAGCAAATTCGGTGCTCGAATTGGCATAGCAGATGAAGTGA
R0146.TXT	TTCTCTTATTTATTTGGCAGCAAATTCGGTGCTCGAATTGGCATAGCAGATGAAGTGA
09PM72399.TXT	TTCTCTTATTTATTTGGCAGCAAATTCGGTGCTCGAATTGGCATAGCAGATGAAGTGA
NIPPONBARE.TXT	AATCTTGCTTCCGTGTTGGGTGGTCTGATGATGGCAGCCCTGAACGTGGGTTTCAGTACA
R0146.TXT	AATCTTGCTTCCGTGTTGGGTGGTCTGATGATGGCAGCCCTGAACGTGGGTTTCAGTACA
09PM72399.TXT	AATCTTGCTTCCGTGTTGGGTGGTCTGATGATGGCAGCCCTGAACGTGGGTTTCAGTACA
NIPPONBARE.TXT	TTTATCTAAGCGAAGAAGACTATGCTCGTATTGGCACTTCTGTATAGCACATAAGATGC
R0146.TXT	TTTATCTAAGCGAAGAAGACTATGCTCGTATTGGCACTTCTGTATAGCACATAAGATGC
09PM72399.TXT	TTTATCTAAGCGAAGAAGACTATGCTCGTATTGGCACTTCTGTATAGCACATAAGATGC
NIPPONBARE.TXT	AGCTAGACAGTGGTGAAAATTAGGTGGGTATTGATTCTGTTGTGGGCAAGGAAGATGGAC
R0146.TXT	AGCTAGACAGTGGTGAAAATTAGGTGGGTATTGATTCTGTTGTGGGCAAGGAAGATGGAC
09PM72399.TXT	AGCTAGACAGTGGTGAAAATTAGGTGGGTATTGATTCTGTTGTGGGCAAGGAAGATGGAC

FIG. 4

NIPPONBARE.TXT	TTGGTGTGGAGAATATACATGGAAGTGCTGCTATTGCCAGTGCTTATTCTAGGGCATATA
R0146.TXT	TTGGTGTGGAGAATATACATGGAAGTGCTGCTATTGCCAGTGCTTATTCTAGGGCATATA
09PM72399.TXT	TTGGTGTGGAGAATATACATGGAAGTGCTGCTATTGCCAGTGCTTATTCTAGGGCATATA
NIPPONBARE.TXT	AGGAGACATTTACACTTACATTTGTGACTGGAAGAACTGTTGGAATAGGAGCTTATCTTG
R0146.TXT	AGGAGACATTTACACTTACATTTGTGACTGGAAGAACTGTTGGAATAGGAGCTTATCTTG
09PM72399.TXT	AGGAGACATTTACACTTACATTTGTGACTGGAAGAACTGTTGGAATAGGAGCTTATCTTG
NIPPONBARE.TXT	CTCGACTTGGCATCCGGTGCATACAGCGTCTTGACCAGCCTATTATTCTTACAGGCTATT
R0146.TXT	CTCGACTTGGCATCCGGTGCATACAGCGTCTTGACCAGCCTATTATTCTTACAGGCTATT
09PM72399.TXT	CTCGACTTGGCATCCGGTGCATACAGCGTCTTGACCAGCCTATTATTCTTACAGGCTATT
NIPPONBARE.TXT	CTGCACTGAACAAGCTTCTTGGGCGGGAAAGTGACAGCTCCCACATGCAGTTGGGTGGTC
R0146.TXT	CTGCACTGAACAAGCTTCTTGGGCGGGAAAGTGACAGCTCCCACATGCAGTTGGGTGGTC
09PM72399.TXT	CTGCACTGAACAAGCTTCTTGGGCGGGAAAGTGACAGCTCCCACATGCAGTTGGGTGGTC
NIPPONBARE.TXT	CCAAAATCATGGCAACTAAAGGTGTTGTCCATCTTACTGTTTCAGATGACCTTGAAGGCG
R0146.TXT	CCAAAATCATGGCAACTAAAGGTGTTGTCCATCTTACTGTTTCAGATGACCTTGAAGGCG
09PM72399.TXT	CCAAAATCATGGCAACTAAAGGTGTTGTCCATCTTACTGTTTCAGATGACCTTGAAGGCG
NIPPONBARE.TXT	TTTCTAATATATTGAGGTGGCTCAGTTATGTTCCCTGCCTACATTGGTGGACCACTTCCAG
R0146.TXT	TTTCTAATATATTGAGGTGGCTCAGTTATGTTCCCTGCCTACATTGGTGGACCACTTCCAG
09PM72399.TXT	TTTCTAATATATTGAGGTGGCTCAGTTATGTTCCCTGCCTACATTGGTGGACCACTTCCAG
NIPPONBARE.TXT	TAACAACACCGTTGGACCCACCGGACAGACCTGTTGCATACATTCCCTGAGAACTCGTGTG
R0146.TXT	TAACAACACCGTTGGACCCACCGGACAGACCTGTTGCATACATTCCCTGAGAACTCGTGTG
09PM72399.TXT	TAACAACACCGTTGGACCCACCGGACAGACCTGTTGCATACATTCCCTGAGAACTCGTGTG
NIPPONBARE.TXT	ATCCTCGAGCGGCTATCCGIGGTGTTGATGACAGCCAAGGGAAATGGTTAGGTGGTATGT
R0146.TXT	ATCCTCGAGCGGCTATCCGIGGTGTTGATGACAGCCAAGGGAAATGGTTAGGTGGTATGT
09PM72399.TXT	ATCCTCGAGCGGCTATCCGIGGTGTTGATGACAGCCAAGGGAAATGGTTAGGTGGTATGT
NIPPONBARE.TXT	TTGATAAAGACAGCTTTGTGGAAACATTTGAAGGTTGGGCTAAGACAGTGGTTACTGGCA
R0146.TXT	TTGATAAAGACAGCTTTGTGGAAACATTTGAAGGTTGGGCTAAGACAGTGGTTACTGGCA
09PM72399.TXT	TTGATAAAGACAGCTTTGTGGAAACATTTGAAGGTTGGGCTAAGACAGTGGTTACTGGCA
NIPPONBARE.TXT	GAGCAAAGCTTGGTGGAAATCCAGTGGGTGTGATAGCTGTGGAGACTCAGACCATGATGC
R0146.TXT	GAGCAAAGCTTGGTGGAAATCCAGTGGGTGTGATAGCTGTGGAGACTCAGACCATGATGC
09PM72399.TXT	GAGCAAAGCTTGGTGGAAATCCAGTGGGTGTGATAGCTGTGGAGACTCAGACCATGATGC
NIPPONBARE.TXT	AAACTATCCCTGCTGACCCCTGGTTCAGCTTGATTCCCGTGAGCAATCTGTTCCCTCGTGCTG
R0146.TXT	AAACTATCCCTGCTGACCCCTGGTTCAGCTTGATTCCCGTGAGCAATCTGTTCCCTCGTGCTG
09PM72399.TXT	AAACTATCCCTGCTGACCCCTGGTTCAGCTTGATTCCCGTGAGCAATCTGTTCCCTCGTGCTG
NIPPONBARE.TXT	GACAAGTGTGGTTTCCAGATTCTGCAACCAAGACTGCGCAGGCATTGCTGGACTTCAACC
R0146.TXT	GACAAGTGTGGTTTCCAGATTCTGCAACCAAGACTGCGCAGGCATTGCTGGACTTCAACC
09PM72399.TXT	GACAAGTGTGGTTTCCAGATTCTGCAACCAAGACTGCGCAGGCATTGCTGGACTTCAACC

FIG. 4 (tiếp)

NIPPONBARE.TXT	GTGAAGGATTACCTCTGTTTCATCCTCGCTAACTGGAGAGGCTTCTCTGGTGGACAAAGAG
R0146.TXT	GTGAAGGATTACCTCTGTTTCATCCTCGCTAACTGGAGAGGCTTCTCTGGTGGACAAAGAG
09PM72399.TXT	GTGAAGGATTACCTCTGTTTCATCCTCGCTAACTGGAGAGGCTTCTCTGGTGGACAAAGAG
NIPPONBARE.TXT	ATCTTTTTGAAGGAATTCTTCAGGCTGGCTCGACTATTGTTGAGAACCTTAGGACATACA
R0146.TXT	ATCTTTTTGAAGGAATTCTTCAGGCTGGCTCGACTATTGTTGAGAACCTTAGGACATACA
09PM72399.TXT	ATCTTTTTGAAGGAATTCTTCAGGCTGGCTCGACTATTGTTGAGAACCTTAGGACATACA
NIPPONBARE.TXT	ATCAGCCTGCCTTTGTCTACATTCCCATGGCTGCAGAGCTACGAGGAGGGGCTTGGGTTG
R0146.TXT	ATCAGCCTGCCTTTGTCTACATTCCCATGGCTGCAGAGCTACGAGGAGGGGCTTGGGTTG
09PM72399.TXT	ATCAGCCTGCCTTTGTCTACATTCCCATGGCTGCAGAGCTACGAGGAGGGGCTTGGGTTG
NIPPONBARE.TXT	TGGTTGATAGCAAGATAAAACCCAGACCGCATTGAGTGCTATGCTGAGAGGACTGCAAAA
R0146.TXT	TGGTTGATAGCAAGATAAAACCCAGACCGCATTGAGTGCTATGCTGAGAGGACTGCAAAA
09PM72399.TXT	TGGTTGATAGCAAGATAAAACCCAGACCGCATTGAGTGCTATGCTGAGAGGACTGCAAAA
NIPPONBARE.TXT	GCAATGTTCTGGAACCGCAAGGGTTAATTGAGATCAAGTTCAGGTCAGAGGAACTCCAGG
R0146.TXT	GCAATGTTCTGGAACCGCAAGGGTTAATTGAGATCAAGTTCAGGTCAGAGGAACTCCAGG
09PM72399.TXT	GCAATGTTCTGGAACCGCAAGGGTTAATTGAGATCAAGTTCAGGTCAGAGGAACTCCAGG
NIPPONBARE.TXT	ATTGCATGAGTCGGCTTGACCCAACATTAATTGATCTGAAAGCAAAACTCGAAGTAGCAA
R0146.TXT	ATTGCATGAGTCGGCTTGACCCAACATTAATTGATCTGAAAGCAAAACTCGAAGTAGCAA
09PM72399.TXT	ATTGCATGAGTCGGCTTGACCCAACATTAATTGATCTGAAAGCAAAACTCGAAGTAGCAA
NIPPONBARE.TXT	ATAAAAATGGAAGTGCTGACACAAAATCGCTTCAAGAAAATATAGAAGCTCGAACAAAAC
R0146.TXT	ATAAAAATGGAAGTGCTGACACAAAATCGCTTCAAGAAAATATAGAAGCTCGAACAAAAC
09PM72399.TXT	ATAAAAATGGAAGTGCTGACACAAAATCGCTTCAAGAAAATATAGAAGCTCGAACAAAAC
NIPPONBARE.TXT	AGTTGATGCCTCTATATACTCAGATTGCGATACGGTTTGCTGAATTGCATGATACATCCC
R0146.TXT	AGTTGATGCCTCTATATACTCAGATTGCGATACGGTTTGCTGAATTGCATGATACATCCC
09PM72399.TXT	AGTTGATGCCTCTATATACTCAGATTGCGATACGGTTTGCTGAATTGCATGATACATCCC
NIPPONBARE.TXT	TCAGAAATGGCTGCGAAAGGTGTGATTAAGAAAGTTGTGGACTGGGAAGAATCACGATCTT
R0146.TXT	TCAGAAATGGCTGCGAAAGGTGTGATTAAGAAAGTTGTGGACTGGGAAGAATCACGATCTT
09PM72399.TXT	TCAGAAATGGCTGCGAAAGGTGTGATTAAGAAAGTTGTGGACTGGGAAGAATCACGATCTT
NIPPONBARE.TXT	TCTTCTATAAGAGATTACGGAGGAGGATCTCTGAGGATGTTCTTGCAAAAGAAATTAGAG
R0146.TXT	TCTTCTATAAGAGATTACGGAGGAGGATCTCTGAGGATGTTCTTGCAAAAGAAATTAGAG
09PM72399.TXT	TCTTCTATAAGAGATTACGGAGGAGGATCTCTGAGGATGTTCTTGCAAAAGAAATTAGAG
NIPPONBARE.TXT	CTGTAGCAGGTGAGCAGTTTTTCCCAACCAACCAGCAATCGAGCTGATCAAGAAATGGTATT
R0146.TXT	CTGTAGCAGGTGAGCAGTTTTTCCCAACCAACCAGCAATCGAGCTGATCAAGAAATGGTATT
09PM72399.TXT	CTGTAGCAGGTGAGCAGTTTTTCCCAACCAACCAGCAATCGAGCTGATCAAGAAATGGTATT
NIPPONBARE.TXT	CAGCTTCACATGCAGCTGAATGGGATGATGACGATGCTTTTGTGCTTGGATGGATAACC
R0146.TXT	CAGCTTCACATGCAGCTGAATGGGATGATGACGATGCTTTTGTGCTTGGATGGATAACC
09PM72399.TXT	CAGCTTCACATGCAGCTGAATGGGATGATGACGATGCTTTTGTGCTTGGATGGATAACC

FIG. 4 (tiếp)

NIPPONBARE.TXT	CTGAAAAC TACAAGGATTATATTCAATATCTTAAGGCTCAAAGAGTATCCCAATCCCTCT
R0146.TXT	CTGAAAAC TACAAGGATTATATTCAATATCTTAAGGCTCAAAGAGTATCCCAATCCCTCT
09PM72399.TXT	CTGAAAAC TACAAGGATTATATTCAATATCTTAAGGCTCAAAGAGTATCCCAATCCCTCT
NIPPONBARE.TXT	CAAGTCTTT CAGATTCCAGCTCAGATTTGCAAGCCCTGCCACAGGGTCTTTCCATGTTAC
R0146.TXT	CAAGTCTTT CAGATTCCAGCTCAGATTTGCAAGCCCTGCCACAGGGTCTTTCCATGTTAC
09PM72399.TXT	CAAGTCTTT CAGATTCCAGCTCAGATTTGCAAGCCCTGCCACAGGGTCTTTCCATGTTAC
NIPPONBARE.TXT	TAGATAAGGTAATTAGCTTACTGATGCTTATATAAAATTCCTTTTCATTACATATGGCTGG
R0146.TXT	TAGATAAGGTAATTAGCTTACTGATGCTTATATAAAATTCCTTTTCATTACATATGGCTGG
09PM72399.TXT	TAGATAAGGTAATTAGCTTACTGATGCTTATATAAAATTCCTTTTCATTACATATGGCTGG
NIPPONBARE.TXT	AGAACTATCTAATCAAATAATGATTATAATTCCAATCGTTCTTTTTATGCCATTATGATC
R0146.TXT	AGAACTATCTAATCAAATAATGATTATAATTCCAATCGTTCTTTTTATGCCATTATGATC
09PM72399.TXT	AGAACTATCTAATCAAATAATGATTATAATTCCAATCGTTCTTTTTATGCCATTATGATC
NIPPONBARE.TXT	TTCTGAAATTTCTTCTTTGGACACTTATTCAGATGGATCCCTCTAGAAGAGCTCAACTT
R0146.TXT	TTCTGAAATTTCTTCTTTGGACACTTATTCAGATGGATCCCTCTAGAAGAGCTCAACTT
09PM72399.TXT	TTCTGAAATTTCTTCTTTGGACACTTATTCAGATGGATCCCTCTAGAAGAGCTCAACTT
NIPPONBARE.TXT	GTTGAAGAAATCAGGAAGGTCCTTGGTTGAATCATATGATG
R0146.TXT	GTTGAAGAAATCAGGAAGGTCCTTGGTTGAATCATATGATG
09PM72399.TXT	GTTGAAGAAATCAGGAAGGTCCTTGGTTGAATCATATGATG

FIG. 4 (tiếp)

NIPP-PRO.TXT MDRPAGLNDIGMVAWTLKMSTPEFPGREIIVVANDITFRAGSFGPREDAFFEAVTNLAC
 R0146-PRO.TXT MDRPAGLNDIGMVAWTLKMSTPEFPGREIIVVANDITFRAGSFGPREDAFFEAVTNLAC
 09PM72399-PRO.TX MDRPAGLNDIGMVAWTLKMSTPEFPGREIIVVANDITFRAGSFGPREDAFFEAVTNLAC

NIPP-PRO.TXT EKKLPLIYLAANS GARIGIADEVKSCFRVGWSDDGSPERGFQYIYLSEEDYARIGTSVIA
 R0146-PRO.TXT EKKLPLIYLAANS GARIGIADEVKSCFRVGWSDDGSPERGFQYIYLSEEDYARIGTSVIA
 09PM72399-PRO.TX EKKLPLIYLAANS GARIGIADEVKSCFRVGWSDDGSPERGFQYIYLSEEDYARIGTSVIA

NIPP-PRO.TXT HKMQLDSGEIRWVIDSVVGKEDGLGVENIHGSAAIASAYSRAYKETFTLTFVTGRTVGIG
 R0146-PRO.TXT HKMQLDSGEIRWVIDSVVGKEDGLGVENIHGSAAIASAYSRAYKETFTLTFVTGRTVGIG
 09PM72399-PRO.TX HKMQLDSGEIRWVIDSVVGKEDGLGVENIHGSAAIASAYSRAYKETFTLTFVTGRTVGIG

NIPP-PRO.TXT AYLARLGIRCIQRLDQPIILTGYSALNKLLGREVYSSHMQLGGPKIMATNGVVHLTVSDD
 R0146-PRO.TXT AYLARLGIRCIQRLDQPIILTGYSALNKLLGREVYSSHMQLGGPKIMATNGVVHLTVSDD
 09PM72399-PRO.TX AYLARLGIRCIQRLDQPIILTGYSALNKLLGREVYSSHMQLGGPKIMATNGVVHLTVSDD

NIPP-PRO.TXT LEGVSNILRWLSYVPAYIGGPLVTTPLDPPDRPVAYIPENSCDPRAAIRGVDDSQGKWL
 R0146-PRO.TXT LEGVSNILRWLSYVPAYIGGPLVTTPLDPPDRPVAYIPENSCDPRAAIRGVDDSQGKWL
 09PM72399-PRO.TX LEGVSNILRWLSYVPAYIGGPLVTTPLDPPDRPVAYIPENSCDPRAAIRGVDDSQGKWL

NIPP-PRO.TXT GGMFDKDSFVETFEWNAKT VVTGRAKLGGIPVGVI AVETQTMQTIPADPGQLDSREQSV
 R0146-PRO.TXT GGMFDKDSFVETFEWNAKT VVTGRAKLGGIPVGVI AVETQTMQTIPADPGQLDSREQSV
 09PM72399-PRO.TX GGMFDKDSFVETFEWNAKT VVTGRAKLGGIPVGVI AVETQTMQTIPADPGQLDSREQSV

NIPP-PRO.TXT PRAGQVWFPDSATKTAQALLDFNREGLPLFILANWRGFSGGQORDLFEGLQAGSTIVENL
 R0146-PRO.TXT PRAGQVWFPDSATKTAQALLDFNREGLPLFILANWRGFSGGQORDLFEGLQAGSTIVENL
 09PM72399-PRO.TX PRAGQVWFPDSATKTAQALLDFNREGLPLFILANWRGFSGGQORDLFEGLQAGSTIVENL

NIPP-PRO.TXT RTYNQPAFVYIPMAAELRGGAUVVVD SKINPDRIECYAERTAKENVLEPOGLIEIKFRSE
 R0146-PRO.TXT RTYNQPAFVYIPMAAELRGGAUVVVD SKINPDRIECYAERTAKENVLEPOGLIEIKFRSE
 09PM72399-PRO.TX RTYNQPAFVYIPMAAELRGGAUVVVD SKINPDRIECYAERTAKENVLEPOGLIEIKFRSE

NIPP-PRO.TXT ELQDCMSRLDPTLIDLKAKLEVANKNGSADTKSLOENIEARTKQLMPLYTQIAIRFAELH
 R0146-PRO.TXT ELQDCMSRLDPTLIDLKAKLEVANKNGSADTKSLOENIEARTKQLMPLYTQIAIRFAELH
 09PM72399-PRO.TX ELQDCMSRLDPTLIDLKAKLEVANKNGSADTKSLOENIEARTKQLMPLYTQIAIRFAELH

NIPP-PRO.TXT DTSLRMAAKGVIRKVVWDWEESRSFFYKRLRRRISEDLAKEIRAVAGEQFSHQPAIELIK
 R0146-PRO.TXT DTSLRMAAKGVIRKVVWDWEESRSFFYKRLRRRISEDLAKEIRAVAGEQFSHQPAIELIK
 09PM72399-PRO.TX DTSLRMAAKGVIRKVVWDWEESRSFFYKRLRRRISEDLAKEIRAVAGEQFSHQPAIELIK

NIPP-PRO.TXT KWYSASHAAEWDDDDAFVAMNDNPNENYKDYIQYLKAQRVSQSLSSLSDDSSDLQALPQGL
 R0146-PRO.TXT KWYSASHAAEWDDDDAFVAMNDNPNENYKDYIQYLKAQRVSQSLSSLSDDSSDLQALPQGL
 09PM72399-PRO.TX KWYSASHAAEWDDDDAFVAMNDNPNENYKDYIQYLKAQRVSQSLSSLSDDSSDLQALPQGL

NIPP-PRO.TXT SMLLDKVISLLMLI
 R0146-PRO.TXT SMLLDKVISLLMLI
 09PM72399-PRO.TX SMLLDKVISLLMLI

FIG. 5

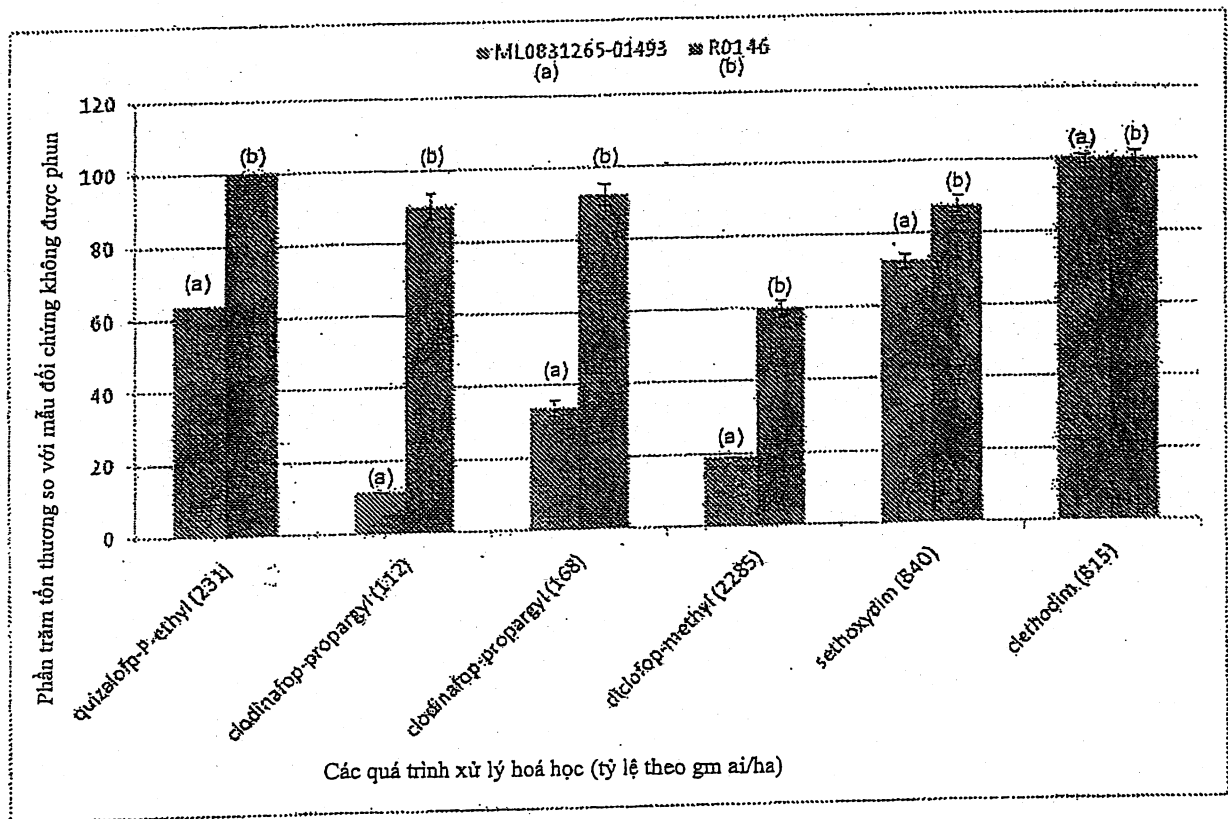


FIG. 6

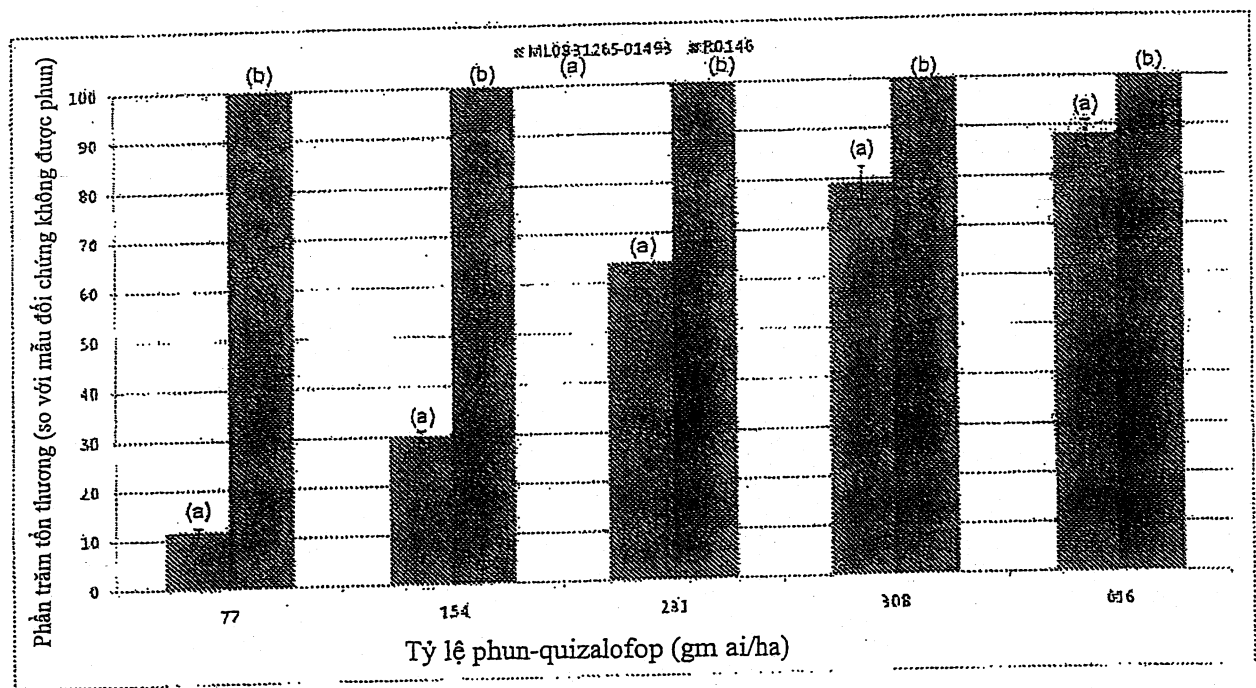


FIG. 7

```

1 CCTGTTCTGC TAGGAATAAT AGAACTACAT ACTGCTATGA TTTTCCACTG
51 GTGAGTTGAC TGCTCCCTTA TATTCAATGC ATTACCATAG CAAATTCATA
101 TTGTTTCATG TTGTCAAAAT AAGCCGATGA AAATTCAAAA CTGTAGGCAT
151 TTGAAACTGC AGTGAGGAAG TCATGGTCCT CTAGTACCTC TGGTGCTTCT
201 AAAGGTGTTG AAAATGCCCA ATGTTATGTT AAAGCTACAG AGTTGGTATT
251 TGC GGACAAA CATGGGTCAT GGGGCACTCC TTTAGTTCAA ATGGACCGGC
301 CTGCTGGGCT CAATGACATT GGTATGGTAG CTTGGACCTT GAAGATGTCC
351 ACTCCTGAAT TTCCTAGTGG TAGGGAGATT ATTGTTGTTG CAAATGATAT
401 TACGTTACAG GCTGGATCAT TTGGCCCAAG GGAAGATGCA TTTTGTGAAG
451 CTGTTACCAA CCTAGCCTGT GAGAAGAAAC TTCCTCTTAT TTATTTGGCA
501 GCAAATTCGT GTGCTCGAAT TGGCATAGCA GATGAAGTGA AATCTTGCTT
551 CCGTGTGGG TGGTCTGATG ATGGCAGCCC TGAACGTGGG TTTCAGTACA
601 TTTATCTAAG CGAAGAAGAC TATGCTCGTA TTGGCACTTC TGTACATAGCA
651 CATAAGATGC AGCTAGACAG TGGTGAAATT AGGTGGGTTA TTGATTCTGT
701 TGTGGGCAAG GAAGATGGAC TTGGTGTGGA GAATATACAT GGAAGTGCTG
751 CTATTGCCAG TGCTTATTCT AGGGCATATA AGGAGACATT TACACTTACA
801 TTTGTGACTG GAAGAACTGT TGGAATAGGA GCTTATCTTG CTCGACTTGG
851 CATCCGGTGC ATACAGCGTC TTGACCAGCC TATTATTCTT ACAGGCTATT
901 CTGCACTGAA CAAGCTTCTT GSGCGGGAAG TGTACAGCTC CCACATGCAG
951 TTGGGTGGTC CCAAAATCAT GGCAACTAAT GGTGTTGTCC ATCTTACTGT
1001 TTCAGATGAC CTTGAAGGCG TTTCTAATAT ATTGAGGTGG CTCAGTTATG
1051 TTCCTGCCTA CATTGGTGGA CCACTTCCAG TAACAACACC GTTGGACCCA
1101 CCGGACAGAC CTGTTGCATA CATTCTGAG AACTCGTGTG ATCCTCGAGC
1151 GGCTATCCGT GGTGTTGATG ACAGCCAAGG GAAATGGTTA GGTGGTATGT
1201 TTGATAAAGA CAGCTTTGTG GAAACATTTG AAGGTIGGGC TAAGACAGTG
1251 GTTACTGGCA GAGCAAAGCT TGGTGGAATT CCAGTGGGTG TGATAGCTGT
1301 GGAGACTCAG ACCATGATGC AAATATCCC TGCTGACCCT GGTGAGCTTG
1351 ATTCCCGTGA GCAATCTGTT CCTCGTGCTG GACAAGTGTG GTTTCCAGAT
1401 TCTGCAACCA AGACTGCGCA GGCATTGCTG GACTTCAACC GTGAAGGATT
1451 ACCTCTGTTT ATCCTCGCTA ACTGGAGAGG CTCTCTGGT TGAGAACCTT
1501 ATCTTTTTGA AGGAATTCTT CAGGCTGGCT CGACTATTGT TGAGAACCTT
1551 AGGACATACA ATCAGCCTGC CTTTGTCTAC ATTCCCATGG CTGCAGAGCT
1601 ACGAGGAGGG GCTTGGGTTG TGGTTGATAG CAAGATAAAC CCAGACCGCA
1651 TTGAGTGCTA TGCTGAGAGG ACTGCAAAAA GCAATGTTCT GGAACCGCAA
1701 GGGTTAATTG AGATCAAGTT CAGGTCAGAG GAACTCCAGG ATTGCATGAG
1751 TCGGCTTGAC CCAACATTAA TTGATCTGAA AGCAAACTC GAAGTAGCAA
1801 ATAAAAATGG AAGTGCTGAC ACAAATCGC TTCAAGAAAA TATAGAAGCT
1851 CGAACAAAAC AGTTGATGCC TCTATATACT CAGATTGCGA TACGGTTTGC
1901 TGAATTGCAT GATACATCCC TCAGAATGGC TCGGAAAGGT GTGATTGAAG
1951 AAGTTGTGGA CTGGGAAGAA TCACGATCTT TCTTCTATAA GAGATTACGG
2001 AGGAGGATCT CTGAGGATGT TCTTGCAAAA GAAATTAGAG CTGTAGCAGG
2051 TGAGCAGTTT TCCCACCAAC CAGCAATCGA GCTGATCAAG AAATGGTATT
2101 CAGCTTCACA TGCAGCTGAA TGGGATGATG ACGATGCTTT TGTTGCTTGG
2151 ATGGATAACC CTGAAAATA CAAGGATTAT ATTCAATATC TTAAGGCTCA
2201 AAGAGTATCC CAATCCCTCT CAAGTCTTTC AGATTCCAGC TCAGATTTGC
2251 AAGCCCTGCC ACAGGGTCTT TCCATGTTAC TAGATAAGGT AATTAGCTTA
2301 CTGATGCTTA TATAAATTCT TTTTCATTAC ATATGGCTGG AGAACTATCT
2351 AATCAAAATA TGATTATAAT TCCAATCGTT CTTTTTATGC CATTATGATC
2401 TTCTGAAATT TCCTTCTTTG GACACTTATT CAGATGGATC CCTCTAGAAG
2451 AGCTCAACTT GTTGAAGAAA TCAGGAAGGT CTTGGTTGA ATCATATGAT
2501 G

```

FIG. 8

Được làm thích ứng
từ WO2011/028833

Thế đột biến G2096S

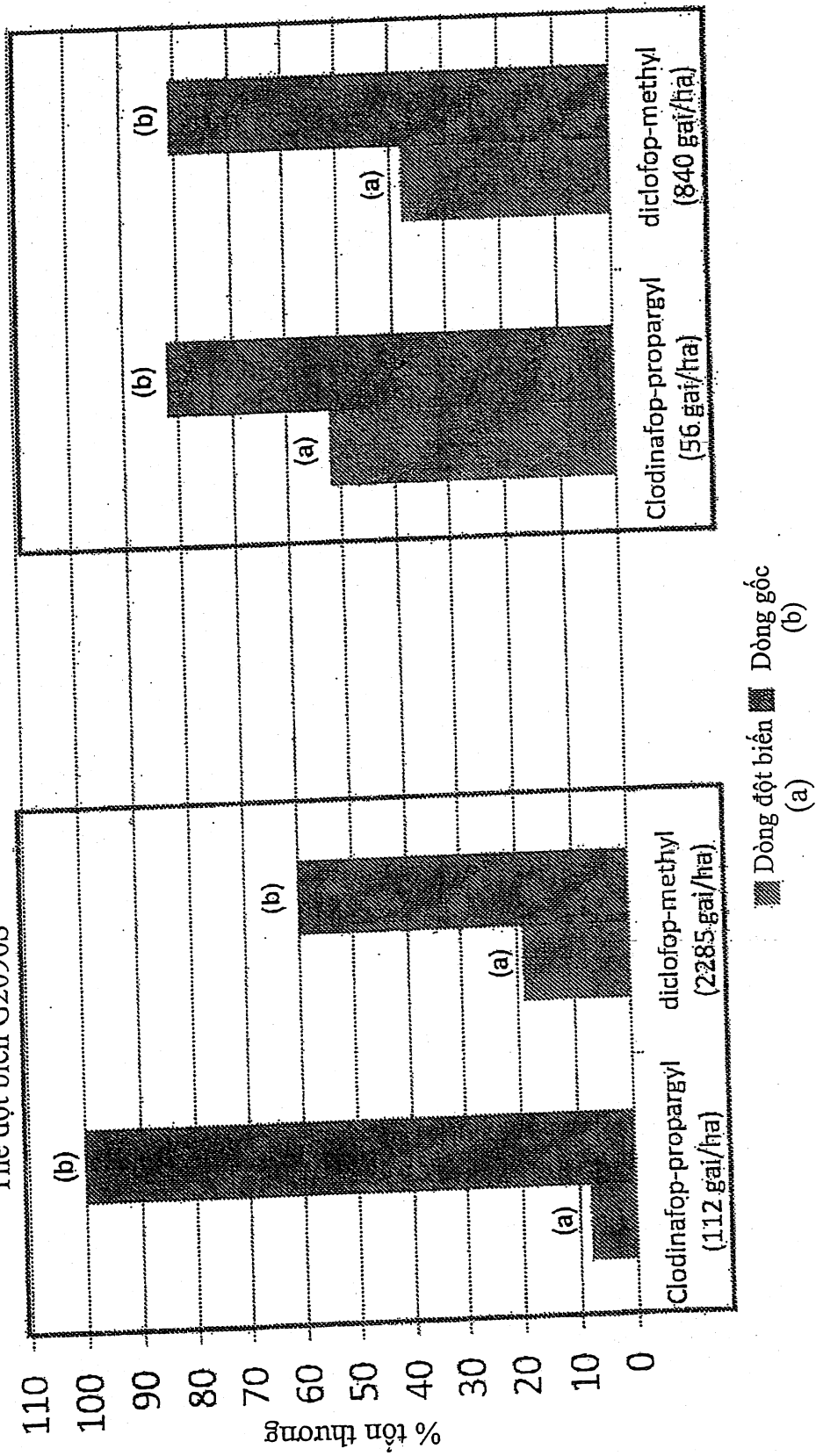


FIG. 9

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> RICETEC AKTIENGESELLSCHAFT

<120> PHƯƠNG PHÁP PHÒNG TRỪ CỎ DẠI, PHƯƠNG PHÁP TẠO RA CÂY LÚA KHÁNG THUỐC DIỆT CỎ ỨC CHẾ ACCAZA VÀ CÂY LÚA THU ĐƯỢC TỪ PHƯƠNG PHÁP NÀY

<130> 50970-115760

<140>

<141>

<150> 61/541,832

<151> 2011-09-30

<150> 61/510,585

<151> 2011-07-22

<160> 7

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 2501

<212> ADN

<213> Oryza sativa

<400> 1

cctgttctgc taggaataat agaactacat actgctatga ttttccaactg gtgagttgac	60
tgctccctta tattcaatgc attaccatag caaattcata ttogttcatg ttgtcaaaat	120
aagccgatga aaattcaaaa ctgtaggcatt ttgaaactgc agtgaggaag tcatggctct	180
ctagtacctc tgggtgcttct aaagggtgtg aaaatgccca atgttatgtt aaagctacag	240
agttgggtatt tgcggacaaa catgggtcat ggggcactcc tttagttcaa atggaccggc	300
ctgctgggct caatgacatt ggtatggtag cttggacctt gaagatgtcc actcctgaat	360
ttcctagtgg tagggagatt attgttggtg caaatgatat tacgttcaga gctggatcat	420
ttggcccaag ggaagatgca ttttttgaag ctgttaccaa cctagcctgt gagaagaaac	480
ttcctcttat ttatttgga gcaaattctg gtgctcgaat tggcatagca gatgaagtga	540
aatcttgctt ccgtgttggtg tgggtctgatg atggcagccc tgaacgtggg ttccagtaca	600
tttatctaag cgaagaagac tatgctcgta ttggcacttc tgcataagca cataagatgc	660
agctagacag tggtgaaatt aggtgggtta ttgattctgt tgtgggcaag gaagatggac	720
ttgggtgtgga gaatatacat ggaagtgtg ctattgccag tgcttattct agggcatata	780
aggagacatt tacacttaca tttgtgactg gaagaactgt tggaatagga gcttatcttg	840
ctcgacttgg catccggtgc atacagcgtc ttgaccagcc tattattctt acaggctatt	900
ctgcactgaa caagcttctt gggcgggaag tgtacagctc ccacatgcag ttgggtgggc	960

ccaaaatcat ggcaactaat ggtgttggtcc atottactgt ttcagatgac cttgaaggcg	1020
tttctaatat attgaggtgg ctcagttatg ttcctgcocta cattgggtgga ccacttccag	1080
taacaacacc gttggaccca ccggacagac ctgttgcata cattcctgag aactcgtgtg	1140
atcctogagc ggctatccgt ggtgttgatg acagccaagg gaaatggta ggtggatgt	1200
ttgataaaga cagctttgtg gaaacatttg aaggttgggc taagacagt gttactggca	1260
gagcaaagct tgggtggaatt ccagtgggtg tgatagctgt ggagactcag accatgatgc	1320
aaactatccc tgctgaccct ggtcagcttg attcccgtga gcaatctgtt cctogtgctg	1380
gacaagtgtg gtttccagat tctgcaacca agactgcgca ggcattgctg gacttcaacc	1440
gtgaaggatt acctctgttc atcctcgcta actggagagg cttctctggt ggacaaagag	1500
atctttttga aggaattctt caggctggct cgactattgt tgagaacctt aggacataca	1560
atcagcctgc ctttgtctac attcccatgg ctgcagagct acgaggaggg gcttgggttg	1620
tggttgatag caagataaac ccagaccgca ttgagtgeta tgctgagagg actgcaaaaa	1680
gcaatgttct ggaaccgcaa gggttaattg agatcaagtt caggtcagag gaactccagg	1740
attgcatgag teggcttgac ccaacattaa ttgatctgaa agcaaaactc gaagtagcaa	1800
ataaaaatgg aagtgtgac acaaaatcgc ttcaagaaaa tatagaagct cgaacaaaac	1860
agttgatgcc tctatatact cagattgcga tacggtttgc tgaattgcat gatacatccc	1920
tcagaatggc tgcgaaaggt gtgattaaga aagttgtgga ctgggaagaa tcacgatctt	1980
tcttctataa gagattacgg aggaggatct ctgaggatgt tcttgcaaaa gaaattagag	2040
ctgtagcagg tgagcagttt tcccaoccaac cagcaatcga gctgatcaag aaatggtatt	2100
cagcttcaca tgcagctgaa tgggatgatg acgatgcttt tgttgcttgg atggataacc	2160
ctgaaaacta caaggattat attcaatata ttaaggctca aagagtatcc caatccctct	2220
caagtcttct agattccagc tcagatttgc aagccctgcc acagggctctt tccatgttac	2280
tagataaggt aattagctta ctgatgctta tataaattct ttttcattac atatggctgg	2340
agaactatct aatcaaataa tgattataat tccaatcggt ctttttatgc cattatgac	2400
ttctgaaatt tccttctttg gacacttatt cagatggatc cctctagaag agctcaactt	2460
gttgaagaaa tcaggaaggt ccttggttga atcatatgat g	2501

<210> 2

<211> 2501

<212> ADN

<213> Oryza sativa

<400> 2

cctgttctgc taggaataat agaactacat actgctatga ttttccactg gtgagttgac	60
tgtccctta tattcaatgc attaccatag caaattcata ttcgttcatg ttgtcaaaat	120
aagccgatga aaattcaaaa ctgtaggcat ttgaaactgc agtgaggaag tcatggctct	180
ctagtacctc tgggtgcttct aaagggtgttg aaaatgccca atgttatgtt aaagctacag	240
agttggtatt tgcggacaaa catgggtcat ggggcactcc tttagttcaa atggaccggc	300
ctgctgggct caatgacatt ggtatggtag cttggacctt gaagatgtcc actcctgaat	360
ttcctagtgg tagggagatt attgttgttg caaatgatat tacgttcaga gctggatcat	420
ttggcccaag ggaagatgca ttttttgaag ctgttaccaa cctagcctgt gagaagaaac	480
ttcctcttat ttatttggca gcaaattctg gtgctcgaat tggcatagca gatgaagtga	540
aatcttgott ccgtgttggg tgggtctgat atggcagccc tgaacgtggg tttcagtaaa	600
tttatctaag cgaagaagac tatgctcgta ttggcacttc tgtcatagca cataagatgc	660
agctagacag tggtgaaatt aggtgggtta ttgattctgt tgtgggcaag gaagatggac	720
ttggtgtgga gaatatacat ggaagtgtg ctattgccag tgcttattct agggcatata	780
aggagacatt tacacttaca tttgtgactg gaagaactgt tggaatagga gcttatcttg	840
ctegacttgg catccgttgc atacagegtc ttgaccagcc tattattctt acaggctatt	900
ctgcaactgaa caagcttctt gggcgggaag tgtacagctc ccacatgcag ttgggtggtc	960
ccaaaatcat ggcaactaat ggtgttgtcc atcttactgt ttcagatgac cttgaaggcg	1020
tttctaatat attgaggtgg ctacgttatg ttcttgcta cattggtgga ccacttcag	1080
taacaacacc gttggaccca ccggacagac ctgttgcata cattcctgag aactcgtgtg	1140
atcctcgagc ggctatccgt ggtgttgatg acagccaagg gaaatggta ggtggtatgt	1200
ttgataaaga cagctttgtg gaaacatttg aaggttgggc taagacagtg gttactggca	1260
gagcaaagct tgggtggaatt ccagtgggtg tgatagetgt ggagactcag accatgatgc	1320
aaactatccc tgetgacctt ggtcagcttg attccctga gcaatctgtt cctcgtgctg	1380
gacaagtgtg gtttccagat tctgcaacca agactgcgca ggcattgctg gacttcaacc	1440
gtgaaggatt acctctgttc atcctcgcta actggagagg cttctctggt ggacaaagag	1500
atctttttga aggaattctt caggctggct cgactattgt tgagaacctt aggacataca	1560
atcagcctgc ctttgtctac attcccatgg ctgcagagct acgaggaggg gcttgggttg	1620
tggttgatag caagataaac ccagaccgca ttgagtgtca tgetgagagg actgcaaaag	1680
gcaatgttct ggaaccgcaa gggtaattg agatcaagtt caggtcagag gaactccagg	1740
attgcatgag tcggcttgac ccaacattaa ttgatotgaa agcaaaactc gaagtagcaa	1800

ataaaaaatgg aagtgctgac acaaaaatogc ttcaagaaaa tatagaagct cgaacaaaac	1860
agttgatgcc tctatatact cagattgcga tacgggtttgc tgaattgcat gatacatccc	1920
tcagaatggc tgcgaaaggt gtgattaaga aagttgtgga ctgggaagaa tcacgatctt	1980
tcttctataa gagattacgg aggaggatct ctgaggatgt tcttgcaaaa gaaattagag	2040
ctgtagcagg tgagcagttt tcccaccaac cagcaatcga gctgatcaag aaatggtatt	2100
cagcttcaca tgcagctgaa tgggatgatg acgatgcttt tgttgcttgg atggataacc	2160
ctgaaaacta caaggattat attcaatata ttaaggctca aagagtatcc caatccctct	2220
caagtctttc agattccagc tcagatttgc aagccctgcc acagggtctt tccatgttac	2280
tagataaggt aattagctta ctgatgctta tataaattct ttttcattac atatggctgg	2340
agaactatct aatcaaataa tgattataat tccaatogtt ctttttatgc cattatgac	2400
ttctgaaatt tccttctttg gacacttatt cagatggac cctctagaag agctcaactt	2460
gttgaagaaa tcaggaaggt ccttggttga atcatatgat g	2501

<210> 3

<211> 2501

<212> ADN

<213> *Oryza sativa*

<400> 3

cctgttctgc taggaataat agaactacat actgctatga ttttccactg gtgagttgac	60
tgctccctta tattcaatgc attaccatag caaattcata ttcgttcatg ttgtcaaaat	120
aagccgatga aaattcaaaa ctgtaggcat ttgaaactgc agtgaggaag tcatggtcct	180
ctagtacctc tgggtcttct aaaggtgttg aaaatgcccc atgttatgtt aaagctacag	240
agttggtatt tgcggacaaa catgggtcat ggggcactcc tttagttcaa atggaccggc	300
ctgctgggct caatgacatt ggtatggtag cttggacctt gaagatgtcc actcctgaat	360
ttcctagtgg tagggagatt attgttggtg caaatgatat tacgttcaga gctggatcat	420
ttggcccaag ggaagatgca ttttttgaag ctgttaccaa cctagcctgt gagaagaaac	480
ttcctcttat ttatttggca gcaaattctg gtgctcgaat tggcatagca gatgaagtga	540
aatcttgctt ccgtgttggg tggctctgat atggcagccc tgaacgtggg tttcagtaca	600
tttatctaag cgaagaagac tatgctcgta ttggcacttc tgcatagca cataagatgc	660
agctagacag tggtgaaatt aggtgggtta ttgattctgt tgtgggcaag gaagatggac	720
ttggtgtgga gaatatacat ggaagtgtg ctattgccag tgcttattct agggcatata	780
aggagacatt tacacttaca tttgtgactg gaagaactgt tggaatagga gcttatcttg	840

ctgcacttgg catccggtgc atacagcgto ttgaccagcc tattattctt acaggctatt 900
 ctgcactgaa caagcttctt gggcggaag tgtacagctc ccacatgcag ttgggtggto 960
 ccaaaatcat ggcaactaat ggtgttgtoc atottactgt ttcagatgac cttgaaggcg 1020
 tttctaatat attgaggtgg ctacgttatg ttctgccta cattgggtga ccacttecag 1080
 taacaacacc gttggaccca ccggacagac ctgttgcata cattcotgag aactcgtgtg 1140
 atcctcgagc ggotatccgt ggtgttgatg acagccaagg gaaatggta ggtggtatgt 1200
 ttgataaaga cagctttgtg gaaacatttg aaggttgggc taagacagtg gttactggca 1260
 gagcaaagct tgggtgaatt ccagtgggtg tgatagctgt ggagactcag accatgatgc 1320
 aaactatccc tgctgaccct ggtcagcttg attcccgta gcaatctgtt cctcgtgctg 1380
 gacaagtgtg gtttccagat tctgcaacca agactgcga ggcattgctg gacttcaacc 1440
 gtgaaggatt acctctgttc atcctcgta actggagagg cttctctggt ggacaaagag 1500
 atctttttga aggaattctt caggctggct cgactattgt tgagaacctt aggacataca 1560
 atcagcctgc ctttgtctac attcccatgg ctgcagagct acgaggagg gcttgggttg 1620
 tggttgatag caagataaac ccagaccgca ttgagtgtta tgctgagagg actgcaaaag 1680
 gcaatgttct ggaaccgcaa gggttaattg agatcaagtt caggtcagag gaaactccagg 1740
 attgcatgag tcggcttgac ccaacattaa ttgatctgaa agcaaaactc gaagtagcaa 1800
 ataaaaatgg aagtgtgac acaaaatcgc ttcaagaaaa tatagaagct cgaacaaaac 1860
 agttgatgcc tctatatact cagattgcga tacggtttgc tgaattgcat gatacatccc 1920
 tcagaatggc tgcgaaaggt gtgattaaga aagttgtgga ctgggaagaa tcacgatctt 1980
 tottctataa gagattacgg aggaggatct ctgaggatgt tottgcaaaa gaaattagag 2040
 ctgtagcagg tgagcagttt tcccaccaac cagcaatcga gctgatcaag aaatggtatt 2100
 cagcttcaca tgcagctgaa tgggatgatg acgatgcttt tgttgcttgg atggataacc 2160
 ctgaaaacta caaggattat attcaatato ttaaggctca aagagtatcc caatccctct 2220
 caagtcttcc agattccagc tcagatttgc aagccctgcc acagggctct tccatgttac 2280
 tagataaggt aattagotta ctgatgotta tataaattct ttttcattac atatggctgg 2340
 agaactatct aatcaaataa tgattataat tcoaatoctt ctttttatgc cattatgac 2400
 ttctgaaatt tcttcttttg gacacttatt cagatggatc cctctagaag agctcaactt 2460
 gttgaagaaa tcaggaaggt ccttggttga atcatatgat g 2501

<210> 4

<211> 2501
 <212> ADN
 <213> *Oryza sativa*

<400> 4
 cctgttctgc taggaataat agaactacat actgctatga tttccactg gtgagttgac 60
 tgctccctta tattcaatgc attaccatag caaattcata ttcgttcacg ttgtcaaaat 120
 aagccgatga aaattcaaaa ctgtaggcat ttgaaactgc agtgaggaag tcatggctct 180
 ctagtacctc tgggtgcttc aaaggtgttg aaaatgccca atgttatgtt aaagctacag 240
 agttggtatt tgcggacaaa catgggtcat ggggcactcc tttagttcaa atggaccggc 300
 ctgctgggct caatgacatt ggtatggtag cttggacctt gaagatgtcc actcctgaat 360
 ttcctagtgg tagggagatt attgttggtg caaatgatat tacgttcaga gctggatcat 420
 ttggcccaag ggaagatgca ttttttgaag ctgttaccaa cctagcctgt gagaagaaac 480
 ttcctcttat ttatttggca gcaaattctg gtgctcgaat tggcatagca gatgaagtga 540
 aatcttgctt ccgtgttggg tgggtctgat atggcagccc tgaacgtggg tttcagtaca 600
 tttatctaag cgaagaagac tatgctcgta ttggcacttc tgcatagca cataagatgc 660
 agctagacag tggtgaaatt aggtgggtta ttgattctgt tgtgggcaag gaagatggac 720
 ttggtgtgga gaatatacat ggaagtgtg ctattgccag tgctattct agggcatata 780
 aggagacatt tacacttaca tttgtgactg gaagaactgt tggaatagga gcttatcttg 840
 ctogacttgg catccggtgc atacagctc ttgaccagcc tattattctt acaggctatt 900
 ctgcactgaa caagcttctt gggcggaag tgtacagctc ccacatgcag ttgggtggtc 960
 ccaaaatcat ggcaactaat ggtgttgtcc atcttactgt ttcagatgac cttgaaggcg 1020
 tttctaatat attgaggtgg ctgagttatg ttcttgcta cattggtgga ccacttccag 1080
 taacaacacc gttggacca cggacagac ctgttgcata cattcctgag aactcgtgtg 1140
 atcctcgagc ggctatccgt ggtgttgatg acagccaagg gaaatggtta ggtggtatgt 1200
 ttgataaaga cagctttgtg gaaacatttg aaggttgggc taagacagtg gttactggca 1260
 gagcaaagct tgggtggaatt ccagtgggtg tgatagctgt ggagactcag accatgatgc 1320
 aaactatccc tgctgacctt ggtcagctt attcccgtga gcaatctgtt cctcgtgctg 1380
 gacaagtgtg gtttccagat tctgcaacca agactgcgca ggcattgctg gacttcaacc 1440
 gtgaaggatt acctctgttc atcctcgcta actggagagg cttctctggt ggacaaagag 1500
 atctttttga aggaattctt caggctggct cgactattgt tgagaacctt aggacataca 1560
 atcagcctgc ctttgtctac attcccatgg ctgcagagct acgaggaggg gcttgggttg 1620

```

tggttgatag caagataaac ccagaccgca ttgagtgcta tgctgagagg actgcaaaaa 1680
gcaatgttct ggaacogcaa gggttaattg agatcaagtt caggtcagag gaactccagg 1740
attgcatgag tcggottgac ccaacattaa ttgatctgaa agcaaaactc gaagtagcaa 1800
ataaaaatgg aagtgctgac acaaaatcgc ttcaagaaaa tatagaaget cgaacaaaac 1860
agttgatgcc tctatatact cagattgcga tacggtttgc tgaattgcat gatacatccc 1920
tcagaatggc tgcgaaaggt gtgattaaga aagttgtgga ctgggaagaa tcacgatctt 1980
tcttctataa gagattacgg aggaggatct ctgaggatgt tcttgcaaaa gaaattagag 2040
ctgtagcagg tgagcagttt tcccaccaac cagcaatcga gctgatcaag aaatgggtatt 2100
cagcttcaca tgcagctgaa tgggatgatg acgatgcttt tgttgcttgg atggataacc 2160
ctgaaaacta caaggattat attcaatatc ttaaggctca aagagtatcc caatccctct 2220
caagtctttc agattccagc tcagatttgc aagccctgcc acaggggtctt tccatgttac 2280
tagataaggt aattagctta ctgatgctta tataaattct ttttcattac atatggctgg 2340
agaactatct aatcaaataa tgattataat tccaatcgtt ctttttatgc cattatgac 2400
ttctgaaatt tccttctttg gacacttatt cagatggatc cctctagaag agctcaactt 2460
gttgaagaaa tcaggaaggt ccttggttga atcatatgat g 2501

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

[illegible]

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

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

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

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

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

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

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

Leu Ile

<210> 6

<211> 674

<212> PRT

<213> Oryza sativa

<400> 6

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

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

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

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

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

Asp Glu Val Lys Ser Cys Phe Arg Val Gly Trp Ser Asp Asp Gly Ser

[illegible]

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Ile

<210> 7

<211> 674

<212> PRT

<213> Oryza sativa

<400> 7

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Ile