



(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)



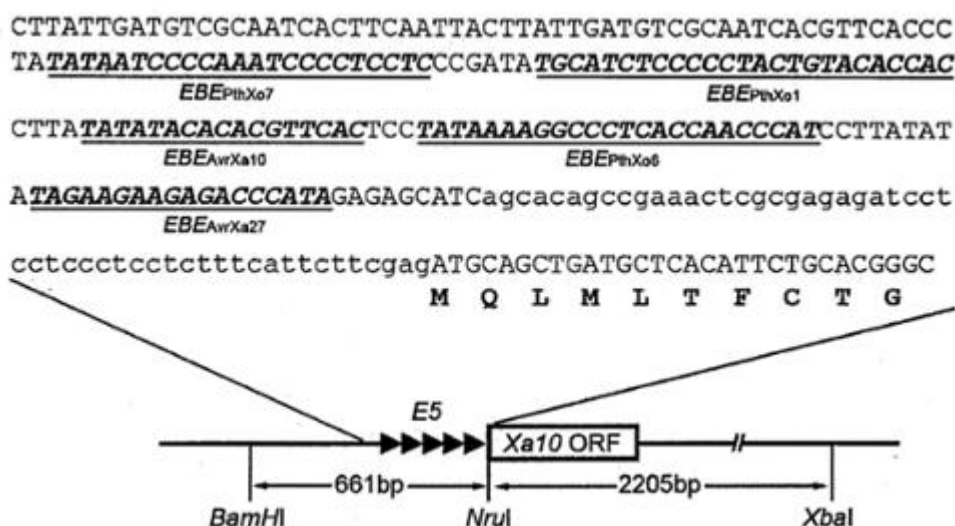
1-0028208

(51)⁷ C12N 15/11; C12N 5/10; C12N 15/29; (13) B
A01H 5/00; C12N 15/113

(21) 1-2015-01937 (22) 01/11/2012
(86) PCT/SG2012/000414 01/11/2012 (87) WO2014/070102 08/05/2014
(45) 25/05/2021 398 (43) 26/10/2015 331A
(73) TEMASEK LIFE SCIENCES LABORATORY LIMITED (SG)
1 Research Link, National University of Singapore, Singapore 117604, Singapore
(72) YIN, Zhongchao (SG); ZENG, Xuan (CN); TIAN, Dongsheng (CN).
(74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

(54) GEN KHỞI ĐẦU THỰC VẬT, THỰC VẬT CHUYỂN GEN VÀ PHƯƠNG PHÁP TẠO RA THỰC VẬT CHUYỂN GEN CÓ TÍNH ĐỀ KHÁNG PHỔ RỘNG VỚI BỆNH BẠC LÁ DO VI KHUẨN

(57) Sáng chế đề cập đến gen khởi đầu tổng hợp và gen tổng hợp mà tạo ra tính đề kháng bệnh phổ rộng với *Xanthomonas* ở thực vật. Sáng chế cũng đề cập đến thực vật chuyển gen chứa gen tổng hợp này và các thực vật thu được bằng cách lai thực vật với các thực vật chuyển gen như vậy. Cụ thể hơn, gen khởi đầu tổng hợp này là gen khởi đầu *Xa10* tổng hợp và gen tổng hợp này là gen *Xa10* tổng hợp chứa gen khởi đầu *Xa10* tổng hợp. Tính đề kháng này là tính đề kháng bệnh bạc lá do vi khuẩn và thực vật này là cây lúa.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến gen khởi đầu tổng hợp và gen tổng hợp mà tạo ra tính đề kháng bệnh phổ rộng với *Xanthomonas* ở thực vật. Sáng chế còn đề cập đến thực vật chuyển gen chứa gen tổng hợp này và các thực vật thu được bằng cách lai thực vật với các thực vật chuyển gen như vậy. Cụ thể hơn, gen khởi đầu tổng hợp này là gen khởi đầu *Xa10* tổng hợp và gen tổng hợp này là gen *Xa10* tổng hợp chứa gen khởi đầu *Xa10* tổng hợp. Tính đề kháng này là tính đề kháng bệnh bạc lá do vi khuẩn và thực vật này là cây lúa.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các tài liệu công bố và các tài liệu khác được sử dụng trong bản mô tả này để minh họa tình trạng kỹ thuật của sáng chế hoặc cung cấp thêm chi tiết về thực hiện sáng chế, được kết hợp vào bản mô tả này bằng cách tham khảo, và để thuận tiện được gộp lần lượt trong phần Mục lục sách tham khảo.

Vi khuẩn gây bệnh thực vật gram âm sử dụng hệ thống tiết typ III (type III secretion system: TTSS) để chuyển dịch protein là các chất hiệu ứng vào tế bào thực vật mà ở đó chúng điều biến chức năng của tế bào chủ để làm thuận tiện quá trình xâm nhập (Alfano and Collmer, 2004; Kay and Bonas, 2009). Các thành viên của họ chất hiệu ứng AvrBs3 gồm nhiều loại là loại duy nhất của các chất hiệu ứng typ III tạo ra bởi các biến thể bệnh lý của *Xanthomonas* và *Ralstonia solanacearum* (Bonas et al., 1989; Yang and White, 2004; Heuer et al., 2007). Các chất hiệu ứng tương tự AvrBs3, gần đây còn được đề cập đến là các chất hiệu ứng tương tự chất hoạt hoá phiên mã (transcription activator-like: TAL) (Yang et al., 2006; Bogdanove et al., 2010), có chung đầu tận N cần thiết cho sự tiết typ III và đầu tận C chứa các tín hiệu định vị nhân (nuclear localization signal: NLS) và miền hoạt hoá có tính axit (AAD). Các chất hiệu ứng TAL khác biệt ở vùng giữa, là vùng thường là các đoạn lặp gần như hoàn hảo thông thường có chiều dài 33-35 axit amin (amino acid: aa) kết thúc ở đoạn lặp bị cắt

ngắn có chiều dài 20 axit amin. Hai axit amin siêu biến ở vị trí 12 và 13 của các đoạn lặp, còn được gọi là hai gốc của đoạn lặp-biến đổi (RVD) (Moscou and Bogdanove, 2009), góp phần vào hiện tượng đa hình đoạn lặp, trong khi đó số lượng và trình tự các đoạn lặp có RVD đa hình trong chất hiệu ứng TAL quyết định hoạt tính đặc hiệu (Herbers et al., 1992; Yang et al., 2005).

Các chất hiệu ứng TAL đơn lẻ hoạt hóa quá trình phiên mã của các gen tính nhạy cảm (susceptibility: *S*) cơ thể chủ đặc hiệu làm thúc đẩy sự phát triển của bệnh (Yang et al., 2006; Kay et al., 2007; Sugio et al., 2007; Antony et al., 2010). Để chống lại các quá trình thúc đẩy bệnh, thực vật có cơ chế tiến hóa khai thác khả năng cảm ứng sự phiên mã của các chất hiệu ứng TAL (Gu et al., 2005; Romer et al., 2007). Do đó, một tập hợp nhỏ của các chất hiệu ứng TAL hoạt động như là các chất hiệu ứng không độc hại mất hoạt tính và hoạt hóa sự phiên mã của gen *R* bệnh. Các chất hiệu ứng TAL gắn kết trình tự ADN đặc trưng ở gen khởi đầu của gen *S* hoặc gen *R* (Kay et al., 2007; Romer et al., 2007; Romer et al., 2009; Antony et al., 2010). Mỗi RVD từ các đoạn lặp trung tâm của các chất hiệu ứng TAL nhận biết đặc hiệu nucleotit trong yếu tố ADN đích trong T bảo toàn ở đầu tận 5' (Boch and Bonas, 2010; Bogdanove et al., 2010).

Xanthomonas oryzae pv. *oryzae* là tác nhân gây bệnh bệnh bạc lá do vi khuẩn ở cây lúa (Nino-Liu et al., 2006). Các chủng đơn lẻ của *X. oryzae* pv. *oryzae* gắn 11 đến 19 các chất hiệu ứng TAL (White et al., 2009). Các chất hiệu ứng TAL từ *X. oryzae* pv. *oryzae* hướng đích đến gen cây lúa hoặc là cho tính nhạy cảm (Yang et al., 2006; Sugio et al., 2007; Chen et al., 2010) hoặc tính đề kháng với quá trình gây nhiễm vi khuẩn (Gu et al., 2005). Chất hiệu ứng TAL PthXo1 từ chủng *X. oryzae* pv. *oryzae* PXO99^A hướng đích *Os8N3/Xa13/OsSWEET11* ở cây lúa (Yang et al., 2006; Chen et al., 2010). Alen lặn *Xa13* (*xa13*) là không đáp ứng với PthXo1, và thực vật có *xa13* là có tính kháng với các chủng sinh bệnh mà chỉ dựa trên PthXo1 là chất hiệu ứng chính mang lại tính độc hại (Yang et al., 2006). Tính đề kháng qua trung gian *xa13* với bệnh bạc lá do vi khuẩn ở cây lúa có thể bị đánh bại bằng cách cảm ứng gen *S* *Os-11N3*, một thành viên khác của họ gen N3, bằng chủng của sinh bệnh sử dụng các chất hiệu ứng TAL AvrXa7 và PthXo3 (Antony et al., 2010).

PthXo6 và PthXo7 là hai chất hiệu ứng TAL khác từ PXO99^A và hướng đích lần lượt hai gen là yếu tố phiên mã, *OsTFXI* và *OsTFIIAγ1*, ở cây lúa (Sugio et al., 2007). *OsTFXI* mã hoá yếu tố phiên mã bZIP trong khi đó sản phẩm gen của *OsTFIIAγ1* là cấu trúc siêu phân tử nhỏ của yếu tố phiên mã IIA (Sugio et al., 2007). Việc cảm ứng *OsTFIIAγ1* nằm trên nhiễm sắc thể 1 bởi PthXo7 có thể phản ánh sự thích ứng của PXO99^A thành tính đề kháng qua trung gian *xa5* (Iyer and McCouch, 2004), alen của *OsTFIIAγ5* mã hoá dạng thứ hai của cấu trúc siêu phân tử nhỏ TFIIA trên nhiễm sắc thể 5 của cây lúa (Sugio et al., 2007). Trình tự đích ADN của PthXo1, *EBE_{PthXo1}* (Yếu tố gắn kết chất hiệu ứng - Effector Binding Element - cho PthXo1), đã được nhận diện trong gen khởi đầu của *Os8N3* (Antony et al., 2010), trong khi đó trình tự đích ADN của PthXo6 và PthXo7 vẫn cần được nhận diện hoặc kiểm tra trong lần lượt các gen khởi đầu của *OsTFXI* và *OsTFIIAγ1*, mặc dù các trình tự đích giả định đã được dự đoán (Boch et al., 2009).

Ba chất hiệu ứng TAL, AvrXa7 và AvrXa10 từ PXO86 (Hopkins et al., 1992) và AvrXa27 từ PXO99^A (Gu et al., 2005), hoạt hóa tính đề kháng bệnh khi cây lúa mang các gen *R* cùng nguồn gốc *Xa7*, *Xa10* hoặc *Xa27*. Cho đến nay, mới chỉ có gen *Xa27* đã được phân lập và được công bố (Gu et al., 2005). *Xa27* được cảm ứng bởi AvrXa27 và gen này có thể tạo ra tính đề kháng không đặc hiệu với *X. oryzae* pv. *oryzae* nếu như gen khởi đầu cảm ứng AvrXa27 được thay bằng gen khởi đầu cảm ứng stress từ gen *PR1* của cây lúa (Gu et al., 2005; Tian and Yin, 2009). Sự cảm ứng hoàn toàn của *Xa27* bởi AvrXa27 cần đến *OsTFIIAγ5*, sản phẩm gen của *Xa5* trên nhiễm sắc thể 5 (Gu et al., 2009). Yếu tố *cis* ADN gồm 16 đến 18 bp (cặp bazơ), được ký hiệu là *UPT_{AvrXa27}* (*UP* được điều chỉnh bởi chất hiệu ứng TAL AvrXa27 hoặc *EBE_{AvrXa27}*), được nhận diện trong gen khởi đầu của *Xa27* sẽ được cảm ứng đặc hiệu bởi AvrXa27 (Boch et al., 2009; Romer et al., 2009).

Xa10 tạo ra tính đề kháng đặc hiệu loài phổ hẹp với một vài loài Philippine của *X. oryzae* pv. *oryzae* (Yoshimura et al., 1995). Gen *R* này được thẩm nhập từ cây lúa Cas 209 vào giống lúa có tính nhạy cảm IR24 (Mew, 1982; Yoshimura et al., 1983). *Xa10* được lập bản đồ tinh vào vùng di truyền 0,28 cM giữa gen đánh dấu ở gần đầu M491 và gen đánh dấu ngoại biên M419 trên cánh tay dài của nhiễm sắc thể 11 và được đồng phân ly cùng với các gen đánh dấu S723 và M604 (Gu et al., 2008). Gen

Xa10 này mới được tách dòng gần đây bằng cách tách dòng dựa trên bản đồ và phương pháp biến nạp gen (công bố đơn quốc tế số WO 2012/033462). Trình tự đích chức năng của *AvrXa10*, *EBE_{AvrXa10}* được nhận diện ở gen khởi đầu của *Xa10* (công bố đơn quốc tế số WO 2012/033462). Sản phẩm gen *Xa10*, *XA10*, đóng vai trò chức năng ở cả cây một lá mầm và cây hai lá mầm bằng cách gây ra sự chết tế bào giống như đáp ứng siêu mẫn (hypersensitive response: HR) (không được công bố).

Tính đặc hiệu đề kháng này của gen R phụ thuộc chất hiệu ứng TAL với bệnh bạc lá do vi khuẩn được quyết định bởi gen *R* khởi đầu chứ không phải là các sản phẩm gen *R* (Gu et al., 2005). Trong khi đó, phổ các gen R phụ thuộc chất hiệu ứng TAL với bệnh bạc lá do vi khuẩn thay đổi rất nhiều, mà là phụ thuộc vào sự sẵn có các chất hiệu ứng TAL không độc hại mất hoạt tính ở chủng *X. oryzae* pv. *oryzae* (Gu et al., 2004; Gu et al., 2008). Romer et al (2009) đã cho thấy rằng nhiều yếu tố ADN phân biệt chức năng được hướng đích bởi các chất hiệu ứng TAL riêng rẽ vẫn giữ được chức năng và tính đặc hiệu của chúng khi được kết hợp vào một gen khởi đầu. Mong muốn là tạo ra tính đề kháng phổ rộng với bệnh bạc lá do vi khuẩn ở cây lúa.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến gen khởi đầu tổng hợp và gen tổng hợp mà tạo ra tính đề kháng bệnh phổ rộng *Xanthomonas* ở thực vật. Sáng chế còn đề cập đến thực vật chuyển gen chứa gen tổng hợp này và các thực vật thu được bằng cách lai thực vật với các thực vật chuyển gen như vậy. Cụ thể hơn, gen khởi đầu tổng hợp này là gen khởi đầu *Xa10* tổng hợp và gen tổng hợp này là gen *Xa10* tổng hợp mà chứa gen khởi đầu *Xa10* tổng hợp. Tính đề kháng này là tính đề kháng bệnh bạc lá do vi khuẩn và thực vật này là cây lúa.

Do đó, theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất gen khởi đầu tổng hợp chứa gen khởi đầu *Xa10* của cây lúa đã được cải biến để chứa nhiều yếu tố gắn kết chất hiệu ứng (Effector Binding Element: EBE) mỗi trong số đó gắn kết chất hiệu ứng giống chất hoạt hoá phiên mã (TAL) khác nhau. Theo một phương án, gen khởi đầu tổng hợp này chứa trình tự *EBE_{pthXo7}*. Theo một phương án khác, gen khởi đầu tổng hợp này chứa trình tự *EBE_{pthXo1}*. Theo một phương án bổ sung, gen khởi đầu tổng hợp này chứa trình tự *EBE_{AvrXa10}*. Theo một phương án nữa, gen khởi đầu tổng hợp này chứa trình tự *EBE_{pthXo6}*. Theo một phương án khác, gen khởi đầu tổng hợp này chứa trình tự

EBE_{AvrXa27}. Theo một phương án bổ sung, gen khởi đầu tổng hợp này chứa tất cả năm trong số các trình tự EBE này. Theo một phương án, gen khởi đầu tổng hợp này là gen khởi đầu mini tổng hợp chứa một đến năm trình tự EBE này và một phần tối thiểu của gen khởi đầu *Xa10* cây lúa có hoạt tính của gen khởi đầu. Theo một phương án khác, gen khởi đầu tổng hợp này là *Xa10* có chiều dài đầy đủ tổng hợp chứa một đến năm trình tự EBE này. Theo một phương án, gen khởi đầu có chiều dài đầy đủ tổng hợp này chứa gen khởi đầu mini tổng hợp. Theo một phương án nữa, gen khởi đầu tổng hợp này là mảnh bất kỳ của gen khởi đầu có chiều dài đầy đủ tổng hợp này mà lớn hơn gen khởi đầu mini tổng hợp, là kế tiếp với đầu 5' của gen khởi đầu mini tổng hợp, và có hoạt tính của gen khởi đầu.

Theo một phương án, gen khởi đầu mini tổng hợp này chứa trình tự được nêu trong SEQ ID NO:2. Theo một phương án khác, gen khởi đầu có chiều dài đầy đủ tổng hợp này chứa trình tự được nêu trong SEQ ID NO:10. Theo một phương án nữa, gen khởi đầu tổng hợp này chứa các nucleotit 2208-2456 và một số lượng bất kỳ các nucleotit 5' đối với gen khởi đầu mini tổng hợp này và kế tiếp với gen khởi đầu mini tổng hợp này. Theo một phương án, trình tự *EBE_{pthXo7}* chứa trình tự được nêu trong SEQ ID NO:5. Theo một phương án khác, trình tự *EBE_{pthXo1}* chứa trình tự được nêu trong SEQ ID NO:6. Theo một phương án bổ sung, trình tự *EBE_{AvrXa10}* chứa trình tự được nêu trong SEQ ID NO:7. Theo một phương án nữa, trình tự *EBE_{pthXo6}* chứa trình tự được nêu trong SEQ ID NO:8. Theo một phương án khác, trình tự *EBE_{AvrXa27}* chứa trình tự được nêu trong SEQ ID NO:9.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề xuất gen *Xa10* tổng hợp mà chứa gen khởi đầu tổng hợp theo sáng chế được liên kết có điều khiển với trình tự *Xa10* của cây lúa. Theo một phương án, codon bắt đầu của trình tự *Xa10* của cây lúa là kế tiếp với đầu 3' của gen khởi đầu tổng hợp này. Theo một phương án khác, trình tự *Xa10* của cây lúa là trình tự mã hoá protein *Xa10* của cây lúa. Theo một phương án nữa, trình tự *Xa10* này là trình tự hệ gen mã hoá protein *Xa10* của cây lúa. Theo một phương án khác, trình tự *Xa10* của cây lúa là trình tự mã hoá cùng với UTR đầu 3' chứa gen kết thúc. Theo một phương án nữa, gen kết thúc *Xa10* ở cây lúa (các nucleotit 382-759 của SEQ ID NO:15) có thể được thay bằng các gen kết thúc khác đã biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, như gen kết thúc NOS, gen kết thúc 35S và gen kết thúc *Xa27*. Theo một phương án, trình tự mã hoá chứa trình tự mã hoá được

nêu trong SEQ ID NO:13. Theo một phương án khác, trình tự hệ gen mã hoá protein *Xa10* của cây lúa chứa trình tự được nêu trong SEQ ID NO:15 mà bao gồm trình tự mã hoá (các nucleotit 1-381) và gen kết thúc (các nucleotit 382-759). Theo một phương án nữa, trình tự hệ gen mã hoá protein *Xa10* của cây lúa chứa trình tự được nêu trong SEQ ID NO:16 mà bao gồm trình tự mã hoá (các nucleotit 1-381), gen kết thúc (các nucleotit 382-759) và UTR đầu 3' nữa (các nucleotit 760-1193). Theo một phương án khác, trình tự hệ gen mã hoá protein *Xa10* của cây lúa chứa trình tự được nêu trong SEQ ID NO:17 mà bao gồm trình tự mã hoá (các nucleotit 1-381), gen kết thúc (các nucleotit 382-759) và UTR đầu 3' nữa (các nucleotit 760-2215). Theo một phương án khác, trình tự *Xa10* của cây lúa chứa trình tự được nêu trong các nucleotit 1-759 của SEQ ID NO:17 thêm một số lượng bất kỳ các nucleotit 3' của gen kết thúc trong SEQ ID NO:17 mà là kế tiếp với gen kết thúc. Theo một phương án, trình tự của gen *Xa10* tổng hợp được nêu trong SEQ ID NO:11. Theo một phương án khác, trình tự của gen *Xa10* tổng hợp được nêu trong SEQ ID NO:12.

Theo khía cạnh thứ ba, sáng chế đề xuất vật truyền chứa gen *Xa10* tổng hợp được mô tả trong bản mô tả này. Sáng chế còn đề xuất tế bào thực vật chứa vật truyền và thực vật chuyển gen có tính đề kháng phổ rộng với bệnh bạc lá do vi khuẩn chứa tế bào thực vật này. Theo một phương án, tế bào thực vật này là tế bào cây lúa. Theo một phương án khác, thực vật chuyển gen là cây lúa chuyển gen.

Theo khía cạnh thứ tư, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra thực vật chuyển gen có tính đề kháng phổ rộng với bệnh bạc lá do vi khuẩn. Theo sáng chế, phương pháp này bao gồm bước chuyển nạp gen *Xa10* tổng hợp được mô tả trong bản mô tả này hoặc vật truyền chứa gen *Xa10* tổng hợp được mô tả trong bản mô tả này vào tế bào thực vật hoặc vào các tế bào thực vật và tạo ra thực vật chuyển gen từ tế bào thực vật đã được chuyển nạp hoặc các tế bào thực vật đã được chuyển nạp này. Theo sáng chế, gen *Xa10* tổng hợp này được biểu hiện ở thực vật chuyển gen. Chuyển nạp gen *Xa10* tổng hợp này hoặc vật truyền vào tế bào thực vật hoặc vào các tế bào thực vật đôi khi còn được đề cập đến trong bản mô tả này là biến nạp tế bào thực vật hoặc các tế bào thực vật bằng gen *Xa10* tổng hợp này hoặc vật truyền. Theo một phương án, tế bào thực vật này hoặc các tế bào là tế bào hoặc các tế bào cây lúa.

Theo khía cạnh thứ năm, sáng chế đề xuất thực vật chuyển gen có ít nhất một bản sao của gen *Xa10* tổng hợp được mô tả trong bản mô tả này được hợp nhất ổn định

vào hệ gen của nó. Theo một phương án, thực vật chuyển gen chứa hai bản sao của gen *Xa10* tổng hợp này. Theo một phương án khác, thực vật chuyển gen chứa ba bản sao của gen *Xa10* tổng hợp này. Theo một phương án bổ sung, thực vật chuyển gen chứa bốn bản sao của gen *Xa10* tổng hợp này. Theo một phương án nữa, thực vật chuyển gen chứa năm bản sao của gen *Xa10* tổng hợp này. Theo một phương án khác, thực vật chuyển gen chứa sáu bản sao của gen *Xa10* tổng hợp này. Theo một phương án, thực vật này là cây lúa. Theo một phương án khác, cây lúa chuyển gen được đề cập đến trong bản mô tả này là thực vật L2 hoặc dòng L2. Sáng chế còn đề xuất thực vật chứa gen *Xa10* tổng hợp được mô tả trong bản mô tả này được hợp nhất ổn định vào hệ gen của nó mà được tạo ra bằng cách lai thực vật chuyển gen được mô tả trong bản mô tả này hoặc thế hệ con của nó với thực vật thứ hai và chọn lọc thế hệ con mà có chứa gen *Xa10* tổng hợp này. Theo sáng chế, thực vật chuyển gen hoặc thực vật theo sáng chế có thể được sử dụng trong các chương trình nhân giống thông thường. Theo một phương án, thực vật chuyển gen được sử dụng trong chương trình nhân giống là cây lúa chuyển gen được đề cập đến trong bản mô tả này là thực vật L2 hoặc dòng L2 hoặc thế hệ con của nó.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Fig 1 thể hiện tổ chức gen của *Xa10*^{E5}. Trình tự các nucleotit của *EBE*_{pthXo7}, *EBE*_{pthXo1}, *EBE*_{AvrXa10}, *EBE*_{pthXo6} và *EBE*_{AvrXa27} trong gen khởi đầu của gen *Xa10* được chỉ ra bằng các chữ in đậm và in nghiêng. Trình tự các nucleotit của vùng không dịch mã đầu 5' của *Xa10*^{E5} được thể hiện bằng các chữ dưới. Các vị trí giới hạn của *Bam*HI, *Nru*I và *Xba*I, và kích thước của mảnh giới hạn ADN được chỉ ra. Việc lập bản đồ không được vẽ theo tỷ lệ. *Xa10* ORF, khung đọc mở của gen *Xa10*. Trình tự được thể hiện trên Fig 1 là như sau: trình tự có chiều dài đầy đủ: SEQ ID NO:1; gen khởi đầu mini *Xa10*^{E5} (không bao gồm *Xa10* ORF): SEQ ID NO:2; một phần ORF *Xa10* được thể hiện: SEQ ID NO:3; peptit một phần *Xa10* được thể hiện: SEQ ID NO:4; *EBE*_{pthXo7}: SEQ ID NO:5; *EBE*_{pthXo1}: SEQ ID NO:6; *EBE*_{AvrXa10}: SEQ ID NO:7; *EBE*_{pthXo6}: SEQ ID NO:8; *EBE*_{AvrXa27}: SEQ ID NO:9.

Các Fig. 2A-2C thể hiện phương pháp phân tích thẩm tách Nam (Southern blot) của thực vật chuyển gen dòng L2. Fig. 2A: phương pháp phân tích thẩm tách Nam của thực vật T₁ của L2 được phát hiện bằng mẫu dò *Hpt*. Fig. 2B: phương pháp phân tích thẩm tách Nam của thực vật T₂ L2 được phát hiện bằng mẫu dò *Hpt*. Fig. 2C:

phương pháp phân tích thẩm tách Nam của T₂-36 và thể hệ con T₃ của nó được phát hiện bằng mẫu dò *Xa10*. Khoảng 2 µg mẫu ADN được phân cắt bằng các enzym giới hạn *Bam*HI và *Xba*I. Các kiểu hình của thực vật được thể hiện sau đây các ảnh cả phương pháp phân tích thẩm tách Nam. Các mũi tên biểu thị các dải được đồng phân ly với kiểu hình có tính kháng. NB, Nipponbare.

Fig 3 thể hiện kiểu hình bệnh bạc lá do vi khuẩn của các thực vật L2. Các thực vật T₃ sáu tuần tuổi mang đồng hợp tử *Xa10*^{E5}, mà thu được từ thực vật T₂-36 của L2, được cấy chủng *X. oryzae* pv. *oryzae* 1947 biểu hiện các chất hiệu ứng TAL AvrXa10, AvrXa27, pthXo1, pthXo6 pthXo7 hoặc vật truyền trống pHM1. Ảnh được thu nhận vào 2 tuần sau khi tiêm chủng. Nipponbare (NB) được sử dụng làm mẫu đối chứng có tính nhạy cảm.

Các Fig. 4A và 4B thể hiện sự cảm ứng *Xa10* ở IRBB10A và các thực vật L2 khi tiêm chủng bằng chủng *X. oryzae* pv. *oryzae*. Fig. 4A: Biểu hiện tương đối của *Xa10* trong IRBB10A và các thực vật L2. Các sản phẩm phiên mã *Xa10* được xác định bằng qRT-PCR vào 24 hpi. Biểu hiện của *Xa10* trong IRBB10A được cấy 1947(pHM1avrXa10) được thiết lập ở mức “1”. Gen ubiquitin cây lúa 1 (*Ubi1*) được sử dụng làm mẫu đối chứng nội tại. Fig. 4B: các sản phẩm PCR sau khuếch đại bằng RT-PCR thời gian thực. Các mẫu trong các Fig. 4A và 4B: 1, thực vật IRBB10A được cấy với nước (cây giả); 2, thực vật IRBB10A được cấy với 1947; 3, thực vật IRBB10A được cấy với 1947(pHM1avrXa10); 4, các thực vật L2 được cấy với nước (cây giả); 5, các thực vật L2 được cấy với 1947; 6, các thực vật L2 được cấy với 1947(pHM1avrXa10); 7, các thực vật L2 được cấy với 1947(pHM1avrXa27); 8, các thực vật L2 được cấy với 1947(pHM1pthXo1); 9, các thực vật L2 được cấy với 1947(pHM1pthXo6); 10, các thực vật L2 được cấy với 1947(pHM1pthXo7).

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến gen khởi đầu tổng hợp và gen tổng hợp mà tạo ra tính đề kháng bệnh phổ rộng với *Xanthomonas* ở thực vật. Sáng chế còn đề cập đến thực vật chuyển gen chứa gen tổng hợp này và các thực vật thu được bằng cách lai thực vật với các thực vật chuyển gen như vậy. Cụ thể hơn, gen khởi đầu tổng hợp này là gen khởi đầu *Xa10* tổng hợp và gen tổng hợp này là gen *Xa10* tổng hợp mà chứa gen khởi

đầu *Xa10* tổng hợp. Tính đề kháng này là tính đề kháng bệnh bạc lá do vi khuẩn và thực vật này là cây lúa.

Cụm từ "được phân lập" dùng để chỉ phân tử sinh học được tách ra khỏi ít nhất một số hợp phần mà xuất hiện cùng nó trong tự nhiên.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "gen" dùng để chỉ trình tự axit nucleic mà bao gồm vùng gen khởi đầu 5' liên hệ với biểu hiện của sản phẩm gen, các vùng intron và exon bất kỳ và các vùng không dịch mã đầu 3' hoặc 5' liên quan đến biểu hiện của sản phẩm gen.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "kiểu gen" dùng để chỉ sự cấu thành di truyền của tế bào hoặc sinh vật.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "kiểu hình" dùng để chỉ các đặc tính có thể phát hiện được của tế bào hoặc sinh vật, mà các đặc tính này là biểu thị của biểu hiện gen.

Các thuật ngữ "polynucleotit," "trình tự nucleotit," và "axit nucleic" được dùng để chỉ polyme của các nucleotit (A, C, T, U, G, v.v. hoặc các chất tương tự nucleotit có trong tự nhiên hoặc nhân tạo), ví dụ, ADN hoặc ARN, hoặc dạng trình bày của chúng, ví dụ, đặc tính sợi, v.v., tùy thuộc vào ngữ cảnh liên quan. Một polynucleotit đã cho hoặc polynucleotit bổ trợ có thể được xác định từ trình tự nucleotit cụ thể bất kỳ.

Axit nucleic hoặc polypeptit được gọi là "tái tổ hợp" khi nó là dạng nhân tạo hoặc được thiết kế di truyền, hoặc thu được từ protein hoặc axit nucleic nhân tạo hoặc được thiết kế di truyền. Ví dụ, một polynucleotit mà là được cài xen vào vật truyền hoặc vị trí khác loài bất kỳ khác, ví dụ, trong hệ gen của sinh vật tái tổ hợp, sao cho nó không liên quan đến các trình tự nucleotit mà thường nằm bên sườn polynucleotit này như nó được tìm thấy ở dạng tự nhiên là polynucleotit tái tổ hợp. Một protein được biểu hiện *in vitro* hoặc *in vivo* từ polynucleotit tái tổ hợp là một ví dụ về polypeptit tái tổ hợp. Tương tự, một trình tự polynucleotit mà không xuất hiện trong tự nhiên, ví dụ một biến thể của gen có trong tự nhiên, là tái tổ hợp.

Thuật ngữ "cấu trúc của axit nucleic" hoặc "cấu trúc của polynucleotit" dùng để chỉ phân tử axit nucleic, hoặc sợi đơn hoặc sợi kép, mà được phân lập từ gen có trong tự nhiên hoặc đã được cải biến để chứa các đoạn axit nucleic theo cách không

giống như dạng tồn tại trong tự nhiên. Thuật ngữ cấu trúc của axit nucleic đồng nghĩa với thuật ngữ hoặc "caxet biểu hiện" khi cấu trúc của axit nucleic chứa các trình tự kiểm soát này là cần thiết cho sự biểu hiện của trình tự theo sáng chế. Một "vật truyền" là một dạng khác của cấu trúc của axit nucleic. Vật truyền có thể là vật truyền biểu hiện, vật truyền sao chép hoặc vật truyền biến nạp.

Thuật ngữ "các trình tự kiểm soát" như được xác định trong bản mô tả này dùng để chỉ bao gồm tất cả hợp phần, mà là cần thiết hoặc tốt hơn cho sự biểu hiện của polynucleotit theo sáng chế. Mỗi trình tự kiểm soát có thể là nguyên thể hoặc lạ đối với trình tự polynucleotit. Các trình tự kiểm soát này ít nhất bao gồm gen khởi đầu và các tín hiệu ngừng phiên mã. Các trình tự kiểm soát này có thể có các mối liên kết để đưa vào các vị trí giới hạn đặc hiệu tạo thuận lợi cho việc nối ghép các trình tự kiểm soát này với trình tự nucleotit.

Thuật ngữ "được liên kết có điều khiển" như được xác định trong bản mô tả này là cấu hình trong đó trình tự kiểm soát được đặt ở vị trí thích hợp so với trình tự nucleotit của cấu trúc của axit nucleic sao cho trình tự kiểm soát định hướng biểu hiện của polynucleotit theo sáng chế.

Trong sáng chế này, thuật ngữ "biểu hiện" bao gồm sự phiên mã của polynucleotit. Trong sáng chế này, thuật ngữ "vật truyền biểu hiện" bao hàm phân tử ADN, mạch thẳng hoặc mạch vòng, mà chứa polynucleotit theo sáng chế, và được liên kết có điều khiển với các đoạn bổ sung mà gây ra sự phiên mã của polynucleotit.

"Các cải biến protein" được đề xuất theo sáng chế bao gồm việc thay thế một hoặc nhiều axit amin. Các biến thể thay thế thường chứa thay đổi một axit amin bằng một axit amin khác ở một hoặc nhiều vị trí trong protein, và có thể được thiết kế để điều biến một hoặc nhiều đặc tính của polypeptit, như độ ổn định đối với sự phân hủy protein, mà không làm mất đi các chức năng hoặc đặc tính khác. Các thay thế axit amin có thể được tạo ra trên cơ sở sự tương tự về độ phân cực, điện tích, độ tan, mức độ kỵ nước, mức độ ưa nước, và/hoặc bản chất lưỡng cực của gốc liên quan. Các thay thế được ưu tiên là các thay thế mang tính bảo toàn, tức là, một axit amin được thay bằng một axit amin có hình dạng và điện tích tương tự. Các thay thế bảo toàn là đã biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này và thông thường bao gồm, cho dù cũng không phải là duy nhất, các thay thế trong các nhóm sau: glyxin, alanin;

valin, isoleuxin, loxin; axit aspartic, axit glutamic; asparagin, glutamin; serin, threonin; lysin, arginin; và tyrosin, phenylalanin.

Một số axit amin có thể được thay thế bằng axit amin khác trong cấu trúc protein mà không làm mất đáng kể khả năng gắn kết có tính tương tác với các cấu trúc như, ví dụ, vùng gắn kết với kháng nguyên của kháng thể hoặc các vị trí gắn kết trên các phân tử cơ chất hoặc các vị trí gắn kết trên protein tương tác với polypeptit. Vì chính khả năng tương tác và bản chất protein quyết định hoạt tính chức năng sinh học của protein, một số thay thế axit amin có thể được tạo ra trong trình tự protein, và trình tự ADN mã hoá nó, và tuy nhiên vẫn thu được protein với đặc tính tương tự. Khi thực hiện các thay đổi như vậy, chỉ số chữa bệnh trong nước của axit amin có thể được xem xét. Tầm quan trọng của chỉ số axit amin kỵ nước trong việc tạo ra chức năng sinh học có tính tương tác trên một protein thường đã được hiểu rõ trong lĩnh vực kỹ thuật. Theo cách khác, việc thay thế một axit amin tương tự có thể được tạo ra hiệu quả dựa trên mức độ ưa nước. Tầm quan trọng của mức độ ưa nước trong việc tạo ra chức năng sinh học có tính tương tác của một protein thường là đã được hiểu rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này (xem ví dụ Patent Mỹ số 4,554,101). Việc sử dụng chỉ số kỵ nước hoặc mức độ ưa nước trong việc thiết kế các polypeptit được bàn luận thêm trong Patent Mỹ số 5,691,198.

Thuật ngữ "thực vật" bao gồm toàn thể thực vật, cơ quan/cấu trúc sinh dưỡng ở chồi cây (ví dụ lá, thân cây và củ), rễ, hoa và các cơ quan/cấu trúc của hoa (ví dụ lá bắc, đài hoa, cánh hoa, nhị hoa, lá noãn, bao phấn và noãn), hạt (bao gồm phôi, nội nhũ, và vỏ hạt) và quả (noãn trưởng thành), mô thực vật (ví dụ mô có mạch, mô ở gốc, và các mô tương tự) và các tế bào (ví dụ các tế bào khí khổng, các tế bào trứng, các tế bào túi lông và các tế bào tương tự), và thể hệ con của chúng. Lớp thực vật mà có thể được sử dụng trong phương pháp theo sáng chế thường mở rộng bao gồm cả thực vật thuộc lớp cao hơn và thấp hơn mà để áp dụng các kỹ thuật biến nạp, bao gồm cây hạt kín (cây một lá mầm và cây hai lá mầm), cây hạt trần, cây dương xỉ, và đa bào tảo. Nó bao gồm cả thực vật thuộc nhiều mức bội thể, bao gồm cây lệch bội lẻ, thể đa bội, thể nhị bội, thể đơn bội và thể bán hợp tử.

Thuật ngữ "khác loài" như được sử dụng trong bản mô tả này dùng để chỉ mối liên hệ giữa hai hoặc nhiều phần tử mà thường là các phần tử không được tìm thấy gần nhau trong tự nhiên. Do đó, ví dụ, một trình tự polynucleotit là "khác loài" với sinh vật

hoặc trình tự polynucleotit thứ hai nếu như nó có nguồn gốc từ loài lạ, hoặc, nếu như từ cùng một loài, đã được cải biến từ dạng nguyên thể của nó. Ví dụ, gen khởi đầu được liên kết có điều khiển với trình tự mã hoá khác loài dùng để chỉ trình tự mã hoá từ loài khác với loài mà gen khởi đầu này có nguồn gốc từ đó, hoặc, từ cùng một loài, trình tự mã hoá là không có mối liên hệ tự nhiên với gen khởi đầu này (ví dụ trình tự mã hoá được điều khiển về mặt di truyền hoặc alen từ kiểu sinh thái hoặc giống khác nhau). Một ví dụ về polypeptit khác loài là polypeptit được biểu hiện từ polynucleotit tái tổ hợp trong sinh vật chuyển gen. Các polynucleotit và polypeptit khác loài là các dạng của phân tử tái tổ hợp.

Thuật ngữ “chuyển nạp” như được sử dụng trong bản mô tả này dùng để chỉ việc đưa có chủ ý axit nucleic vào trong tế bào. Chuyển nạp bao gồm phương pháp bất kỳ đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này dùng để đưa axit nucleic vào trong tế bào, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, việc gây nhiễm bằng *Agrobacterium*, dùng đạn bắn, phương pháp xung điện, vi tiêm và các biện pháp tương tự.

Thuật ngữ “tính đề kháng bệnh phổ rộng” như được sử dụng trong bản mô tả này dùng để chỉ tính đề kháng với nhiều chủng tác nhân là nguyên nhân gây bệnh. Ví dụ, nhiều chủng này có thể là các chủng của *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* và bệnh này là bệnh bạc lá do vi khuẩn ở cây lúa.

Các chất hiệu ứng TAL từ xanthomonads hướng đích các gen cơ thể chủ để thúc đẩy bệnh hoặc gây ra tính đề kháng bệnh. Chúng gắn kết với các yếu tố gắn kết chất hiệu ứng (EBE) trong gen khởi đầu của gen cơ thể chủ và gây ra biểu hiện của chúng. *Xa10* là gen *R* ở cây lúa mà tạo ra tính đề kháng đặc hiệu loài đối với *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, tác nhân gây bệnh bệnh bạc lá do vi khuẩn ở cây lúa. Sản phẩm của gen *Xa10*, XA10, đóng vai trò chức năng ở cả cây một lá mầm và cây hai lá mầm bằng cách gây ra sự chết tế bào tương ứng đáp ứng siêu miễn (HR).

Theo sáng chế, tính đặc hiệu của tính đề kháng mới và phổ đề kháng được tăng lên của gen *Xa10* được thực hiện bằng cách tổng hợp gen *Xa10* đã được cải biến bằng gen khởi đầu được điều khiển chứa 5 EBE được hướng đích bằng các chất hiệu ứng TAL độc hoặc không độc (được gọi là *Xa10*^{E5} trong bản mô tả này). Gen *Xa10*^{E5} được sinh ra và được sử dụng nhằm tạo ra cây lúa chuyển gen. Thu được dòng cây lúa

chuyển gen ổn định, L2. L2 có hai bản sao của gen *Xa10^{E5}* và mang lại tính đề kháng bệnh với bệnh bạc lá do vi khuẩn. Gen *Xa10^{E5}* ở các thực vật L2 được gây ra đặc hiệu bởi chủng *X. oryzae* pv. *oryzae* biểu hiện một trong số các chất hiệu ứng TAL tương ứng và mang lại tính đề kháng phổ rộng đối với 27 trong số 28 chủng *X. oryzae* pv. *oryzae* có trên cánh đồng được thử nghiệm.

Do đó, theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất gen khởi đầu tổng hợp chứa gen khởi đầu *Xa10* cây lúa đã được cải biến để chứa nhiều yếu tố gắn kết chất hiệu ứng (EBE) mỗi trong số đó gắn kết chất hiệu ứng giống chất hoạt hoá phiên mã (TAL) khác nhau. Theo một phương án, gen khởi đầu tổng hợp này chứa trình tự *EBE_{pthXo7}*. Theo một phương án khác, gen khởi đầu tổng hợp này chứa trình tự *EBE_{pthXo1}*. Theo một phương án bổ sung, gen khởi đầu tổng hợp này chứa trình tự *EBE_{AvrXa10}*. Theo một phương án nữa, gen khởi đầu tổng hợp này chứa trình tự *EBE_{pthXo6}*. Theo một phương án khác, gen khởi đầu tổng hợp này chứa trình tự *EBE_{AvrXa27}*. Theo một phương án bổ sung, gen khởi đầu tổng hợp này chứa tất cả năm trong số các trình tự EBE này. Theo một phương án, gen khởi đầu tổng hợp này là gen khởi đầu mini tổng hợp mà chứa một đến năm trình tự EBE này và một phần tối thiểu của gen khởi đầu *Xa10* cây lúa có hoạt tính gen khởi đầu. Theo một phương án khác, gen khởi đầu tổng hợp này là *Xa10* tổng hợp có chiều dài đầy đủ mà chứa một đến năm trình tự EBE này. Theo một phương án, gen khởi đầu có chiều dài đầy đủ tổng hợp này chứa gen khởi đầu mini tổng hợp. Theo một phương án nữa, gen khởi đầu tổng hợp này là mảnh bất kỳ của gen khởi đầu có chiều dài đầy đủ tổng hợp này mà là lớn hơn gen khởi đầu mini tổng hợp này, là kế tiếp với đầu 5' của gen khởi đầu mini tổng hợp, và có hoạt tính của gen khởi đầu.

Theo một phương án, gen khởi đầu mini tổng hợp này chứa trình tự được nêu trong SEQ ID NO:2. Theo một phương án khác, gen khởi đầu có chiều dài đầy đủ tổng hợp này chứa trình tự được nêu trong SEQ ID NO:10. Theo một phương án bổ sung, gen khởi đầu tổng hợp này chứa các nucleotit 2208-2456 của trình tự được nêu trong SEQ ID NO:10 và một số lượng bất kỳ các nucleotit kế tiếp và kế tiếp với nucleotit 2208. Theo một phương án, gen khởi đầu tổng hợp này chứa các nucleotit 2200-2456 của trình tự được nêu trong SEQ ID NO:10. Theo một phương án khác, gen khởi đầu tổng hợp này chứa các nucleotit 2100-2456 của trình tự được nêu trong SEQ ID NO:10. Theo một phương án bổ sung, gen khởi đầu tổng hợp này chứa các nucleotit

1950-2456 của trình tự được nêu trong SEQ ID NO:10. Theo một phương án nữa, gen khởi đầu tổng hợp này chứa các nucleotit 1500-2456 của trình tự được nêu trong SEQ ID NO:10. Theo một phương án khác, gen khởi đầu tổng hợp này chứa các nucleotit 1225-2456 của trình tự được nêu trong SEQ ID NO:10. Theo một phương án bổ sung, gen khởi đầu tổng hợp này chứa các nucleotit 1099-2456 của trình tự được nêu trong SEQ ID NO:10. Theo một phương án nữa, gen khởi đầu tổng hợp này chứa các nucleotit 1438-2456 của trình tự được nêu trong SEQ ID NO:10. Theo một phương án khác, gen khởi đầu tổng hợp này chứa các nucleotit 987-2456 của trình tự được nêu trong SEQ ID NO:10. Theo một phương án bổ sung, gen khởi đầu tổng hợp này chứa các nucleotit 542-2456 của trình tự được nêu trong SEQ ID NO:10. Theo một phương án nữa, gen khởi đầu tổng hợp này chứa các nucleotit 15-2456 của trình tự được nêu trong SEQ ID NO:10. Các ví dụ trên về gen khởi đầu tổng hợp chỉ là ví dụ và minh hoạ rằng các tác giả sáng chế dự tính gen khởi đầu tổng hợp bất kỳ chứa 250-2456 nucleotit kế tiếp mà phải bao gồm các nucleotit 2208-2246 of SEQ ID NO:10.

Theo một phương án, trình tự EBE_{pthXo7} chứa trình tự được nêu trong SEQ ID NO:5. Theo một phương án khác, trình tự EBE_{pthXo1} chứa trình tự được nêu trong SEQ ID NO:6. Theo một phương án bổ sung, trình tự $EBE_{AvrXa10}$ chứa trình tự được nêu trong SEQ ID NO:7. Theo một phương án nữa, trình tự EBE_{pthXo6} chứa trình tự được nêu trong SEQ ID NO:8. Theo một phương án khác, trình tự $EBE_{AvrXa27}$ chứa trình tự được nêu trong SEQ ID NO:9.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề xuất gen *Xa10* tổng hợp mà chứa gen khởi đầu tổng hợp theo sáng chế được liên kết có điều khiển với trình tự *Xa10* của cây lúa. Theo một phương án, codon bắt đầu của trình tự *Xa10* của cây lúa là kế tiếp với đầu 3' của gen khởi đầu tổng hợp này. Theo một phương án khác, trình tự *Xa10* của cây lúa là trình tự mã hoá protein Xa10 của cây lúa. Theo một phương án nữa, trình tự *Xa10* này là trình tự hệ gen mã hoá protein Xa10 của cây lúa. Theo một phương án khác, trình tự *Xa10* của cây lúa là trình tự mã hoá cộng thêm UTR đầu 3' chứa gen kết thúc. Theo một phương án nữa, gen kết thúc Xa10 ở cây lúa (các nucleotit 382-759 của SEQ ID NO:15) có thể được thay bằng các gen kết thúc khác đã biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, như gen kết thúc NOS, gen kết thúc 35S và gen kết thúc *Xa27*. Theo một phương án, trình tự mã hoá chứa trình tự mã hoá được nêu trong SEQ ID NO:13. Theo một phương án khác, trình tự hệ gen mã hoá protein

Xa10 của cây lúa chứa trình tự được nêu trong SEQ ID NO:15 mà bao gồm trình tự mã hoá (các nucleotit 1-381) và gen kết thúc (các nucleotit 382-759). Theo một phương án nữa, trình tự hệ gen mã hoá protein *Xa10* của cây lúa chứa trình tự được nêu trong SEQ ID NO:16 mà bao gồm trình tự mã hoá (các nucleotit 1-381), gen kết thúc (các nucleotit 382-759) và UTR đầu 3' nữa (các nucleotit 760-1193). Theo một phương án khác, trình tự hệ gen mã hoá protein *Xa10* của cây lúa chứa trình tự được nêu trong SEQ ID NO:17 mà bao gồm trình tự mã hoá (các nucleotit 1-381), gen kết thúc (các nucleotit 382-759) và UTR đầu 3' nữa (các nucleotit 760-2215). Theo một phương án khác, trình tự *Xa10* của cây lúa chứa trình tự được nêu trong các nucleotit 1-759 của SEQ ID NO:17 thêm một số lượng bất kỳ các nucleotit 3' của gen kết thúc trong SEQ ID NO:17 mà là kế tiếp với gen kết thúc. Theo một phương án, trình tự của gen *Xa10* tổng hợp được nêu trong SEQ ID NO:11. Theo một phương án khác, trình tự của gen *Xa10* tổng hợp được nêu trong SEQ ID NO:12.

Theo một phương án, trình tự *Xa10* của cây lúa chứa trình tự được nêu trong các nucleotit 1-381 của SEQ ID NO:17 thêm một số lượng bất kỳ các nucleotit 3' của codon kết thúc trong SEQ ID NO:17 kế tiếp với codon kết thúc. Theo một phương án, trình tự *Xa10* này chứa các nucleotit 1-420 của trình tự được nêu trong SEQ ID NO:17. Theo một phương án khác, trình tự *Xa10* này chứa các nucleotit 1-625 của trình tự được nêu trong SEQ ID NO:17. Theo một phương án bổ sung, trình tự *Xa10* này chứa các nucleotit 1-852 của trình tự được nêu trong SEQ ID NO:17. Theo một phương án nữa, trình tự *Xa10* này chứa các nucleotit 1-1178 của trình tự được nêu trong SEQ ID NO:17. Theo một phương án khác, trình tự *Xa10* này chứa các nucleotit 1-1643 của trình tự được nêu trong SEQ ID NO:17. Theo một phương án bổ sung, trình tự *Xa10* này chứa các nucleotit 1-2011 của trình tự được nêu trong SEQ ID NO:17. Theo một phương án nữa, trình tự *Xa10* này chứa các nucleotit 1-2211 của trình tự được nêu trong SEQ ID NO:17. Các ví dụ này về trình tự *Xa10* chỉ là các ví dụ và minh hoạ rằng các tác giả sáng chế dự tính trình tự *Xa10* bất kỳ chứa 382-2215 nucleotit kế tiếp của SEQ ID NO:17 mà phải bao gồm các nucleotit 1-381 của SEQ ID NO:17.

Theo một phương án, trình tự *Xa10* của cây lúa chứa trình tự được nêu trong các nucleotit 1-759 của SEQ ID NO:17 mà bao gồm trình tự mã hoá (các nucleotit 1-381) và gen kết thúc (các nucleotit 382-759) thêm một số lượng bất kỳ các nucleotit 3'

của gen kết thúc trong SEQ ID NO:17 mà là kế tiếp với gen kết thúc. Theo một phương án, trình tự *Xa10* này chứa các nucleotit 1-820 của trình tự được nêu trong SEQ ID NO:17. Theo một phương án khác, trình tự *Xa10* này chứa các nucleotit 1-1095 của trình tự được nêu trong SEQ ID NO:17. Theo một phương án bổ sung, trình tự *Xa10* này chứa các nucleotit 1-1587 của trình tự được nêu trong SEQ ID NO:17. Theo một phương án nữa, trình tự *Xa10* này chứa các nucleotit 1-2050 của trình tự được nêu trong SEQ ID NO:17. Các ví dụ này về trình tự *Xa10* chỉ là ví dụ minh họa và minh họa rằng các tác giả sáng chế dự tính trình tự *Xa10* bất kỳ chứa trình tự mã hoá *Xa10* và gen kết thúc mà chứa 760-2215 nucleotit kế tiếp của SEQ ID NO:17 mà phải bao gồm các nucleotit 1-759 của SEQ ID NO:17.

Theo khía cạnh thứ ba, sáng chế đề xuất vật truyền như được mô tả trong bản mô tả này chứa gen *Xa10* tổng hợp được mô tả trong bản mô tả này. Các vật truyền như vậy là đã biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này hoặc được mô tả thêm sau đây. Sáng chế còn đề xuất tế bào thực vật chứa vật truyền và thực vật chuyển gen có tính đề kháng phổ rộng với bệnh bạc lá do vi khuẩn chứa tế bào thực vật này. Theo một phương án, tế bào thực vật này là tế bào cây lúa. Theo một phương án khác, thực vật chuyển gen là cây lúa chuyển gen.

Theo khía cạnh thứ tư, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra thực vật chuyển gen có tính đề kháng phổ rộng với bệnh bạc lá do vi khuẩn. Theo sáng chế, phương pháp này bao gồm bước chuyển nạp gen *Xa10* tổng hợp được mô tả trong bản mô tả này hoặc vật truyền chứa gen *Xa10* tổng hợp được mô tả trong bản mô tả này vào tế bào thực vật hoặc vào các tế bào thực vật và tạo ra thực vật chuyển gen từ tế bào thực vật đã được chuyển nạp hoặc các tế bào thực vật đã được chuyển nạp này. Theo sáng chế, gen *Xa10* tổng hợp này được biểu hiện ở thực vật chuyển gen. Chuyển nạp gen *Xa10* tổng hợp này hoặc vật truyền vào tế bào thực vật hoặc vào các tế bào thực vật đôi khi còn được đề cập đến trong bản mô tả này là biến nạp tế bào thực vật hoặc các tế bào thực vật bằng gen *Xa10* tổng hợp hoặc vật truyền này. Theo một phương án, tế bào thực vật này hoặc các tế bào là tế bào hoặc các tế bào cây lúa. Các phương pháp như vậy là đã biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này hoặc được mô tả thêm sau đây.

Theo khía cạnh thứ năm, sáng chế đề xuất thực vật chuyển gen có ít nhất một bản sao của gen *Xa10* tổng hợp được mô tả trong bản mô tả này được hợp nhất ổn định

vào hệ gen của nó. Theo một phương án, thực vật chuyển gen chứa hai bản sao của gen *Xa10* tổng hợp này. Theo một phương án khác, thực vật chuyển gen chứa ba bản sao của gen *Xa10* tổng hợp này. Theo một phương án bổ sung, thực vật chuyển gen chứa bốn bản sao của gen *Xa10* tổng hợp này. Theo một phương án nữa, thực vật chuyển gen chứa năm bản sao của gen *Xa10* tổng hợp này. Theo một phương án khác, thực vật chuyển gen chứa sáu bản sao của gen *Xa10* tổng hợp này. Theo một phương án, thực vật này là cây lúa. Theo một phương án khác, cây lúa chuyển gen được đề cập đến trong bản mô tả này là thực vật L2 hoặc dòng L2. Sáng chế còn đề xuất thực vật chứa gen *Xa10* tổng hợp được mô tả trong bản mô tả này được hợp nhất ổn định vào hệ gen của nó mà được tạo ra bằng cách lai thực vật chuyển gen được mô tả trong bản mô tả này hoặc thế hệ con của nó với thực vật thứ hai và chọn lọc thế hệ con mà có chứa gen *Xa10* tổng hợp này. Theo sáng chế, thực vật chuyển gen hoặc thực vật theo sáng chế có thể được sử dụng trong các chương trình nhân giống thông thường. Theo một phương án, thực vật chuyển gen được sử dụng trong chương trình nhân giống là cây lúa chuyển gen được đề cập đến trong bản mô tả này là thực vật L2 hoặc dòng L2 hoặc thế hệ con của nó.

Thông thường, ngoài ra vật truyền hoặc caxet biểu hiện có thể có gen đánh dấu có tính chọn lọc để chọn lọc các tế bào được biến nạp. Các gen đánh dấu có tính chọn lọc được sử dụng để chọn lọc các tế bào hoặc các mô được biến nạp. Thông thường, gen đánh dấu có tính chọn lọc của thực vật sẽ mã hoá tính đề kháng chất kháng sinh, có các gen thích hợp bao gồm ít nhất một tập hợp gen mã hoá tính đề kháng chất kháng sinh spectinomycin, streptomycin phosphotransferaza (spt) gen mã hoá tính đề kháng streptomycin, gen neomycin phosphotransferaza (nptII) mã hoá tính đề kháng kanamycin hoặc geneticin, gen hygromycin phosphotransferaza (hpt hoặc aphiv) mã hoá tính đề kháng hygromycin, gen acetolactat synthaza (als). Theo cách khác, gen đánh dấu có tính chọn lọc của thực vật sẽ mã hoá tính đề kháng thuốc diệt cỏ như tính đề kháng các thuốc diệt cỏ thuộc dạng sulfonylure, glufosinat, glyphosat, amoni, bromoxynil, imidazolinon, và 2,4-điclophenoxyaxetat (2,4-D), bao gồm gen mã hoá tính đề kháng các thuốc diệt cỏ mà có tác dụng ức chế tác động của glutamin synthase như phosphinothricin hoặc basta (ví dụ, gen bar). Nói chung có thể tham khảo, các công bố đơn quốc tế WO 02/36782 và WO 2008/094127, Patent Mỹ số 7,205,453 và các đơn yêu cầu cấp Patent Mỹ số 2006/0218670, 2006/0248616, 2007/0143880 và

2009/0100536, và các tài liệu tham khảo được trích dẫn trong đó. Ngoài ra tham khảo, Jefferson et al. (1991); De Wet et al. (1987); Goff et al. (1990); Kain et al. (1995) và Chiu et al. (1996). Danh sách này của các gen đánh dấu có tính chọn lọc không có nghĩa là mang tính giới hạn. Gen đánh dấu có tính chọn lọc bất kỳ có thể được sử dụng. Gen đánh dấu có tính chọn lọc cũng nằm dưới sự kiểm soát của gen khởi đầu vận hành trong các loài thực vật sẽ được biến nạp. Các gen khởi đầu như vậy bao gồm các gen được mô tả trong công bố đơn quốc tế số WO 2008/094127, đơn yêu cầu cấp Patent Mỹ số 2012/0245339, và các tài liệu tham khảo được trích dẫn trong đó. Ngoài ra, xem các đơn yêu cầu cấp Patent Mỹ số 2008/0313773 và 2010/0199371 như là ví dụ về gen đánh dấu bổ sung mà có thể được sử dụng theo sáng chế.

Theo cách khác, vật truyền hoặc caxet biểu hiện ngoài ra có thể chứa hệ thống không có gen đánh dấu tái tổ hợp Cre-lox, như được mô tả trong bản mô tả này. Các hệ thống như vậy là hữu ích để tạo ra thực vật chuyển gen không có gen đánh dấu chọn lọc.

Để tạo ra vật truyền hoặc caxet biểu hiện, các mảnh ADN khác nhau có thể được xử lý, để tạo ra các trình tự ADN theo hướng thích hợp và, nếu thích hợp, trong khung đọc mở thích hợp. Để đạt được mục đích này, các chất làm thích ứng hoặc các mối liên kết có thể được sử dụng để kết nối các mảnh ADN hoặc các xử lý khác có thể tham gia vào để tạo ra các vị trí giới hạn thuận tiện, loại bỏ các ADN không cần, loại bỏ các vị trí giới hạn, hoặc các cách tương tự. Cho mục đích này, có thể thực hiện gây đột biến *in vitro*, sửa chữa đoạn môi, giới hạn, xử lý nhiệt, thay thế lại, ví dụ chuyển đổi và hoán chuyển.

Khi một axit nucleic, như gen *Xa10* tổng hợp được mô tả trong bản mô tả này, đã được tách dòng vào vật truyền hoặc vật truyền biểu hiện, nó có thể được đưa vào tế bào thực vật bằng cách sử dụng các phương pháp biến nạp thông thường. Thuật ngữ "tế bào thực vật" được dùng để chỉ bao gồm tế bào bất kỳ thu được từ thực vật bao gồm các mô chưa phân hóa như thể chai và các nuôi cấy dạng huyền phù, cũng như hạt giống thực vật, hạt phấn hoặc các phôi thực vật. Các mô thực vật thích hợp cho phép biến nạp bao gồm các mô lá, các mô rễ, các mô phân sinh, các thể nguyên sinh, trụ dưới lá mầm, các lá mầm, vảy cây, đỉnh chồi, rễ, các phôi chưa trưởng thành, hạt phấn, và bao phấn. "Biến nạp" bao gồm việc cải biến trực tiếp hệ gen của tế bào bằng cách đưa từ bên ngoài ADN tái tổ hợp từ tế bào khác có kiểu gen khác, dẫn đến sự hấp

thu và hợp nhất hệ gen này vào hệ gen của tế bào chủ. Theo cách này, có thể thu được thực vật, tế bào thực vật, mô thực vật, hạt giống, và các dạng tương tự được cải biến di truyền.

Axit nucleic, vật truyền hoặc các cấu trúc có thể được đưa vào hệ gen của thực vật chủ mong muốn bằng nhiều kỹ thuật thông thường. Các kỹ thuật dùng để biến nạp nhiều loài thực vật cao hơn là đã được biết rõ và được mô tả trong các tài liệu kỹ thuật và khoa học. Các phương pháp biến nạp có thể thay đổi tùy thuộc vào loại thực vật hoặc tế bào thực vật, tức là cây một lá mầm hoặc cây hai lá mầm, hướng đích cho sự biến nạp, là đã biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, cấu trúc ADN có thể được đưa trực tiếp vào ADN hệ gen của tế bào thực vật này bằng cách sử dụng các kỹ thuật như xung điện và vi tiêm các thể nguyên sinh tế bào thực vật, hoặc các cấu trúc ADN này có thể được đưa trực tiếp vào mô thực vật bằng cách sử dụng phương pháp dùng đạn bắn, như kỹ thuật bắn phá bằng hạt ADN. Theo cách khác, các cấu trúc ADN này có thể được kết hợp với vùng bên sườn T-ADN thích hợp và được đưa vào vật truyền cơ thể chủ *Agrobacterium tumefaciens* thông thường. Chức năng độc tính của vật chủ *Agrobacterium tumefaciens* sẽ định hướng việc xen cấu trúc và gen đánh dấu kề cận vào ADN tế bào thực vật khi tế bào này được nhiễm bởi vi khuẩn. Do đó, có thể sử dụng phương pháp bất kỳ mà tạo ra sự biến nạp/chuyển nạp hiệu quả. Tham khảo, ví dụ, các Patent Mỹ số 7,241,937, 7,273,966 và 7,291,765 và các đơn yêu cầu cấp Patent Mỹ số 2007/0231905 và 2008/0010704 và các tài liệu tham khảo được trích dẫn trong đó. Ngoài ra, tham khảo các công bố đơn quốc tế số WO 2005/103271, WO 2005/017158, WO 2008/094127, WO 2012/033462 và các tài liệu tham khảo được trích dẫn trong đó.

Các tế bào thực vật được biến nạp thu được từ các kỹ thuật biến nạp bất kỳ nêu trên có thể được nuôi cấy để tạo ra thực vật toàn bộ có kiểu gen được biến nạp và do đó có kiểu hình mong muốn, ví dụ, là thực vật chuyển gen. "Thực vật chuyển gen" là thực vật mà ADN lạ đã được đưa vào. "Thực vật chuyển gen" bao gồm tất cả các thế hệ con cháu, thế lai, và các cây lai của chúng, mà được tái sinh bằng con đường hữu tính hoặc vô tính, và mà vẫn tiếp tục mang ADN lạ. Các kỹ thuật tái tạo dựa trên việc xử lý của một số hormon thực vật trong môi trường sinh trưởng nuôi cấy mô, thông thường dựa trên chất đánh dấu có tính diệt khuẩn và/hoặc diệt cỏ đã được đưa vào

cùng với trình tự nucleotit mong muốn. Xem ví dụ, Công bố đơn quốc tế số WO 2008/094127 và các tài liệu tham khảo được trích dẫn trong đó.

Các phương pháp nêu trên dùng để biến nạp thường được dùng để tạo ra giống chuyển gen trong đó caxet biểu hiện được hợp nhất ổn định. Sau khi caxet biểu hiện được hợp nhất ổn định vào thực vật chuyển gen, nó có thể đưa vào thực vật khác bằng cách lai hữu tính. Theo một phương án, giống chuyển gen khi đó có thể được lai, với một giống khác (không được biến nạp hoặc được biến nạp), để tạo ra giống chuyển gen mới. Theo cách khác, tính trạng di truyền mà đã được điều khiển thành dòng cây bông cụ thể bằng cách sử dụng các kỹ thuật biến nạp nêu trên có thể được chuyển thành dòng khác bằng cách sử dụng các kỹ thuật lai ngược truyền thống đã biết rõ trong lĩnh vực nhân giống thực vật. Ví dụ, có thể áp dụng kỹ thuật lai ngược để chuyển một tính trạng được điều khiển từ giống không ưu tú của công cộng thành giống ưu tú, hoặc từ giống chứa gen ngoại lai trong hệ gen của nó thành giống hoặc các giống không chứa gen đó. Như được sử dụng trong bản mô tả này, "lai" dùng để chỉ phép lai đơn thuần X bằng Y, hoặc quá trình lai ngược, tùy thuộc vào ngữ cảnh. Có thể áp dụng kỹ thuật bất kỳ trong số các kỹ thuật nhân giống chuẩn, tùy thuộc vào loài được lai.

Khi tạo ra thực vật chuyển gen thuộc dạng này, thì chính các thực vật này có thể được trồng theo các kỹ thuật thông thường. Tất nhiên, có thể thu hồi hạt giống chuyển gen từ thực vật chuyển gen. Sau đó, các hạt giống này có thể đưa vào đất trồng và được trồng bằng cách sử dụng các quy trình thông thường để tạo ra thực vật chuyển gen. Thực vật chuyển gen được trồng này sẽ biểu hiện gen *Xa10* tổng hợp này để tạo ra tính đề kháng phổ rộng với bệnh bạc lá do vi khuẩn. Cũng có thể sử dụng thực vật chuyển gen được trồng này trong các chương trình nhân giống thông thường để tạo ra thêm các thực vật mà sẽ biểu hiện gen *Xa10* tổng hợp này để tạo ra tính đề kháng phổ rộng với bệnh bạc lá do vi khuẩn.

Trừ khi được quy định khác đi, thực hiện sáng chế sử dụng các kỹ thuật thông thường trong lĩnh vực hóa học, sinh học phân tử, vi sinh vật học, ADN tái tổ hợp, di truyền, miễn dịch, sinh học tế bào, nuôi cấy tế bào và sinh học chuyển gen, là các kỹ thuật trong phạm vi của người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Xem, ví dụ, Maniatis *et al.*, 1982, *Molecular Cloning* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York); Sambrook *et al.*, 1989, *Molecular Cloning*, 2nd Ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York);

Sambrook and Russell, 2001, *Molecular Cloning*, 3rd Ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York); Green and Sambrook, 2012, *Molecular Cloning*, 4th Ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York); Ausubel *et al.*, 1992, *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Sons, including periodic updates); Glover, 1985, *DNA Cloning* (IRL Press, Oxford); Russell, 1984, *Molecular biology of plants: a laboratory course manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.); Anand, *Techniques for the Analysis of Complex Genomes*, (Academic Press, New York, 1992); Guthrie and Fink, *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology* (Academic Press, New York, 1991); Harlow and Lane, 1988, *Antibodies*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York); *Nucleic Acid Hybridization* (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); *Transcription And Translation* (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); *Culture Of Animal Cells* (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987); *Immobilized Cells And Enzymes* (IRL Press, 1986); B. Perbal, *A Practical Guide To Molecular Cloning* (1984); the treatise, *Methods In Enzymology* (Academic Press, Inc., N.Y.); *Methods In Enzymology*, Vols. 154 and 155 (Wu et al. eds.), *Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology* (Mayer and Walker, eds., Academic Press, London, 1987); *Handbook Of Experimental Immunology*, Volumes I-IV (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds., 1986); Riott, *Essential Immunology*, 6th Edition, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1988; Fire et al., *RNA Interference Technology: From Basic Science to Drug Development*, Cambridge University Press, Cambridge, 2005; Schepers, *RNA Interference in Practice*, Wiley-VCH, 2005; Engelke, *RNA Interference (RNAi): The Nuts & Bolts of siRNA Technology*, DNA Press, 2003; Gott, *RNA Interference, Editing, and Modification: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology)*, Human Press, Totowa, NJ, 2004; Sohail, *Gene Silencing by RNA Interference: Technology and Application*, CRC, 2004.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế được mô tả bằng cách tham khảo các ví dụ sau, được đưa ra nhằm mục đích minh họa và chứ không nhằm mục đích giới hạn phạm vi sáng chế theo cách bất kỳ. Các kỹ thuật tiêu chuẩn là đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này hoặc các kỹ thuật cụ thể được mô tả sau đây được áp dụng.

Ví dụ 1

Vật liệu và phương pháp

Các chất hiệu ứng TAL và các chủng *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*): gen của chất hiệu ứng TAL, *avrXa10*, *avrXa27*, *pthXo1*, *pthXo6* và *pthXo7*, đã được mô tả trước đây (Hopkins et al., 1992; Gu et al., 2005; Yang et al., 2006; Sugio et al., 2007). Gen chất hiệu ứng TAL được tách dòng vào vật truyền pBluescript và được đặt dưới sự kiểm soát của gen khởi đầu lacZ. Sau đó, cấu trúc trung gian này được dung hợp với vật truyền cosmit pHM1 (GenBank Accession No. EF059993) ở vị trí *Hind* III. Các cấu trúc cosmit mang các chất hiệu ứng TAL được đưa vào chủng *X. oryzae* pv. *oryzae* 1947 bằng phương pháp xung điện. 28 chủng *X. oryzae* pv. *Oryzae* có trên cánh đồng, mà được gom từ 11 nước được sử dụng trong nghiên cứu này.

Thực vật và điều kiện phát triển: IRBB10A là dòng gần đẳng gen được cải thiện (near-isogenic line: NIL) của *Xa10* trong nền di truyền IR24 (Gu et al., 2008). Nipponbare là cây lúa japonica. Cây lúa, bao gồm thực vật chuyển gen, được trồng trong nhà kính ở nhiệt độ 32°C và 25°C tương ứng trong thời gian 12,5 giờ (ban ngày) và 11,5 giờ (ban đêm).

Cấu trúc kép: Cấu trúc kép pCXA10E5 mang *Xa10*^{E5} (Fig 1) được tạo ra trên cơ sở pCAS4671, mà gắn dòng hệ gen 4671-bp *AvrII-SacI* của *Xa10* vào vật truyền cấu trúc kép pC1300. Mảnh AND *BamHI-NruI* tổng hợp 661 bp chứa *EBE*_{pthXo7}, *EBE*_{pthXo1}, *EBE*_{AvrXa10}, *EBE*_{pthXo6} và *EBE*_{AvrXa27} được dùng để thay thế mảnh *BamHI-NruI* 657 bp trong gen khởi đầu nguyên thể của gen *Xa10*. pCXA10E5 được đưa vào chủng AGL1 *Agrobacterium tumefaciens* bằng phương pháp xung điện.

Biến nạp cây lúa: Biến nạp qua trung gian *Agrobacterium* cây lúa Nipponbare được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp được mô tả trước đây (Hiei et al., 1994) với biến đổi đôi chút. Nói ngắn gọn là, thể chai phát sinh phôi phát triển mạnh thu được từ vảy nhỏ của các phôi trưởng thành được đồng nuôi cấy với chủng *A. tumefaciens* gắn plasmit kép trong thời gian 2 ngày. Sau khi đồng nuôi cấy, các mô cây lúa được rửa và sau đó được nuôi cấy trên môi trường chọn lọc chứa môi trường cơ bản NB (môi trường NB₀; chứa vĩ chất dinh dưỡng được mô tả trong Chu (1975) và vĩ chất dinh dưỡng được mô tả trong Gamborg et al. (1968)) chứa 2 mg/L axit 2,4-điclophenoxyaxetic (2,4-D), 250 mg/L cefotaxime và 50 mg/L hygromycin ở nhiệt độ

26° C ở chỗ tối. Sau 4 tuần chọn lọc, các thể chai có tính kháng hygromycin được tách ra khỏi thể chai đồng nuôi cấy và đưa vào môi trường tái tạo chứa môi trường NB₀ chứa 2,0 mg/L kinetin (KT), 0,02 mg/L axit ỏ-naphtalenaxetic (NAA) và 50 mg/L hygromycin. Ba tuần sau đó, cây non được tái sinh có tính kháng hygromycin được đưa vào môi trường nuôi cấy non chứa môi trường cơ bản 1/2 nồng độ MS (môi trường 1/2MS₀; môi trường cơ bản MS như được định nghĩa trong Murashige và Skoog (1962)) chứa 50 mg/L hygromycin cho việc mọc dài chồi cây và rễ. Cây non được tái sinh sau đó được cấy vào đất trồng trong chậu và được cho phát triển trong nhà kính.

Gây bệnh bạc lá do vi khuẩn và đánh giá mức bệnh: Việc cấy vi khuẩn được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp cặp lá cây (Kauffman et al., 1973). Nói ngắn gọn là, chủng *X. oryzae* pv. *oryzae* được trồng trên môi trường PSA (10 g/l pepton, 10 g/l sucroza, 1 g/l axit glutamic, 16 g/l thạch bacto, và pH 7,0) trong thời gian 2 ngày ở nhiệt độ 28° C. Các tế bào vi khuẩn này được gom và được tái tạo huyền phù trong nước vô trùng ở mật độ quang 0,5 ở OD600. Huyền phù tế bào vi khuẩn được đưa lên hai cây non nhất, nhưng trải đều hoàn toàn, lá của mỗi chồi bằng cách xén 5–6 cm từ đầu lá cây bằng cách sử dụng một cặp kéo được nhúng trong chùng cấy. Đo chiều dài thương tổn (LL) 2 tuần sau khi cấy vi khuẩn. Các triệu chứng của bệnh được ghi điểm là có tính kháng (R, LL ≤ 3,0 cm), có tính kháng vừa phải (MR, 3,0 cm < LL ≤ 6,0 cm), có tính nhạy cảm vừa phải (MS, 6,0 cm < LL ≤ 9,0 cm) và có tính nhạy cảm (S, LL > 9,0 cm) (Gu et al., 2004).

Phân tích thâm tách Nam: ADN của hệ gen cây lúa được phân lập từ mô lá theo các quy trình được mô tả trước đây (Dellaporta et al., 1983). Khoảng 2 µg ADN được phân cắt bằng enzym giới hạn thích hợp, được tách riêng trên gel agarosa 0,8% và được thấm vào màng HybondTM-N + nylon (Amersham Biosciences, GE healthcare, USA). Việc lai ADN được thực hiện theo quy trình chuẩn (Sambrook et al., 1989). Các mẫu dò ADN được đánh dấu bằng hệ thống DIG (Roche Applied Science, USA). Mẫu dò ADN cho gen *Hpt* được khuếch đại bằng PCR bằng cách sử dụng các đoạn mồi ADN Hpt-F (5'AAAAAGCCTGAACTCACC GCG3'; SEQ ID NO:18) và Hpt-R (5'TACTTCTACACAGCCATCGGT3'; SEQ ID NO:19). Mẫu dò ADN cho gen *Xa10* được khuếch đại bằng PCR bằng cách sử dụng các đoạn mồi ADN Xa10-F (5'CACGGGCCCCCTCCTGTTTGC3'; SEQ ID NO:20) và Xa10-R

(5'CCTCGTCGTCTTCA CCAATGCAG3'; SEQ ID NO:21). Các đoạn mồi được dùng để thu hồi gen *Xa10^{E5}* từ dòng L2 là Seq F5 (5'CTAGGTTTATTGGCTGAGCAATG3'; SEQ ID NO:22); Seq R5 (5'TCTAACTGTCGCCGATCTGCTG3'; SEQ ID NO:23), Seq F4 (5'TTCTTCTTCCTTCCT CTCTCTAC3'; ; SEQ ID NO:24), Seq R4 (5'TCACTCGCCATGTCTCTACTTC3'; SEQ ID NO:25), Seq F3 (5'AGGAAAGGTGAGAAGGGAATTG3'; SEQ ID NO:26), Seq R3 (5'GTTT AGCTCGACTTTCGACCCAG3'; SEQ ID NO:27), 4686F (5'CTGGGTCGAAAGTCGAGCT AAAC3'; SEQ ID NO:28), Xa10H5R (5'CCATCGTGATATATATGGGCCTCAGACG3'; SEQ ID NO:29), Seq F1 (5'GCCATACTCTTCTACCTCTCTG3'; SEQ ID NO:30), Seq R1 (5'TTATTCTTTTCATATCATTTGATTTC3'; SEQ ID NO:31), Seq F2 (5'GTAAAACTATAT GTGTACATGG3'; SEQ ID NO:32) và Seq R2 (5'TCCTCGCTAAATTAAAGTGATG3'; SEQ ID NO:33).

PCR phiên mã ngược định lượng (qRT-PCR): qRT-PCR được thực hiện theo các quy trình được mô tả trước đây (Gu et al., 2011) bằng cách sử dụng hệ thống PCR thời gian thực CFX96 (Bio-Rad). Toàn bộ ARN được chiết từ lá lúa ở 24 giờ sau khi cấy (hpi) chủng *X. oryzae* pv. *oryzae*. Trước hết, toàn bộ các mẫu ARN được xử lý bằng DNase I, và sau đó được phiên mã ngược thành ADN bổ trợ sợi thứ nhất bằng cách sử dụng kit tổng hợp ADN bổ trợ iScript (Bio-Rad) theo chỉ dẫn của nhà sản xuất. Để đảm bảo tính đặc hiệu và hiệu quả tối đa trong quá trình PCR định lượng, các đoạn mồi oligo được thử nghiệm tiếp về mức tuyến tính bằng cách cấu trúc nên các đường cong chuẩn trên pha loãng 10 lần liên tiếp năm hoặc sáu lần. Hỗn hợp phản ứng chuẩn (15 µl) chứa 2 µl khuôn mẫu ADN bổ trợ, 1x siêu hỗn hợp SsoFast EvaGreen (Bio-Rad) và 500nM đoạn mồi xuôi và ngược dòng. Phản ứng PCR được thực hiện ở bước làm biến tính ban đầu 98° C trong thời gian 3 phút, tiếp đó là 40 chu trình ở nhiệt độ 98° C trong thời gian 5 giây, 55° C trong thời gian 5 giây. Sau đó, phản ứng đường cong nóng chảy được thực hiện trong thời gian 5 giây, bắt đầu ở 75° C với sự gia tăng 0,2° C. Tính đặc hiệu sản phẩm PCR được khẳng định bằng phân tích đường cong nóng chảy và tách trên 2% gel agarosa để đảm bảo rằng các phản ứng PCR không có đime đoạn mồi. Gen ubiquitin của cây lúa 1 (*Ubi1*) được sử dụng làm tham khảo nội tại để chuẩn hóa lượng tương đối của tổng ARN cho tất cả các mẫu.

Các thử nghiệm qRT-PCR được lặp lại ba lần. Gen *Ubi* cây lúa được sử dụng làm mẫu đối chứng nội tại. Đoạn mỗi đặc hiệu cho *Xa10* là 10RTF2 (5'GGCATCATCTTCTCCGGCG3'; SEQ ID NO:34) và 10RTR2 (5'GCAGCTATACGGGCATAAG3'; SEQ ID NO:35). Các đoạn mỗi đặc hiệu cho *Ubi1* là RBQ3 (5'CCAGTAAGTCCTCAGCCATG3'; SEQ ID NO:36) và RBQ4 (5'TTTC AGACACCATCAAACCAG3'; SEQ ID NO:37).

Ví dụ 2

Sản xuất dòng chuyển gen mang *Xa10*^{E5}

Cây lúa chuyển gen được tạo ra bằng cách biến nạp *Nipponbare* qua trung gian *Agrobacterium* (Hiei et al., 1994). Sau một tháng nuôi cấy phụ thể chai đồng nuôi cấy trên chọn lọc môi trường, thu được 1896 thể chai kháng hyromycin. Tuy nhiên, phần lớn thể chai kháng hyromycin chuyển màu nâu và cuối cùng bị chết sau khi được chuyển vào môi trường tái tạo và được nuôi cấy dưới ánh sáng. Chỉ có vài thể chai kháng hyromycin vẫn còn khỏe mạnh và cuối cùng được tái sinh thành cây con chuyển gen. Cuối cùng, thu được 8 dòng chuyển gen độc lập. Một số dòng có thể có nhiều hơn một thực vật T₀ thu được từ một tế bào được biến nạp. Các thực vật T₀ được đưa vào đất trồng và được cho phát triển trong nhà kính.

Các cây T₀ năm tuần tuổi được cấy chủng *X. oryzae* pv. *oryzae* 1947 biểu hiện AvrXa10. Các đánh giá bệnh ở thời điểm hai tuần sau khi truyền bệnh bạc lá do vi khuẩn cho thấy rằng chỉ có các thực vật T₀ từ hai dòng, L2 và L5, mang tính đề kháng hoàn toàn với 1947(pHM1AvrXa10). Các thực vật T₀ khác có tính nhạy cảm với chủng không tương thích *Xa10*. Thu được tám thực vật T₀ thuộc L2 và tất cả chúng thể hiện kiểu hình hình thái và thời gian phát triển thông thường so với các thực vật kiểu dại. Thu được một thực vật T₀ thuộc L5 và thực vật này cho thấy kiểu hình hơi liên quan đến stress, như lá cứng và thời gian phát triển lâu hơn, so với kiểu dại. Các kiểu hình liên quan đến stress là nghiêm trọng hơn ở các thể đồng hợp tử ở thế hệ T₂ hoặc T₃. L5 không được dùng cho nghiên cứu tiếp.

Có ít nhất 6 bản sao của T-ADN ở các thực vật T₀ của L2 được phát hiện bằng phương pháp phân tích thẩm tách Nam bằng cách sử dụng mẫu dò *Hpt*. Chúng có thể được tách riêng trong thế hệ T₁ (Fig 2A). Tuy nhiên, chỉ có một bản sao của T-ADN, mà thể hiện dải được lai ở khoảng 5,0 kb được phát hiện bởi mẫu dò *Hpt*, mang gen

Xa10^{E5} chức năng và được đồng phân ly cùng với kiểu hình có tính kháng. Thu được các thực vật T₂ chỉ mang gen *Xa10^{E5}* chức năng từ thế hệ con T₂ của T₁-80 (Fig 2B). Một thực vật T₂ plants, T₂-36 mang gen *Xa10^{E5}* đồng hợp tử. T₂-36 có hai bản sao của gen *Xa10^{E5}* với các dải lai lần lượt ở khoảng 5,2 kb và 7,4 kb, được phát hiện bởi mẫu dò *Xa10* (Fig 2C). Hai dải lai này là lớn hơn dải 2866 bp dự tính của mảnh *BamHI-XbaI* từ gen *Xa10^E* (Fig 1). Ngoài ra, hai bản sao của gen *Xa10^{E5}* được đồng phân ly ở thế hệ tiếp theo (Fig 2C). Các kết quả này cho thấy rằng hai bản sao của gen *Xa10^{E5}* là một phần của hai T-ADN bị cắt ngắn đã được hợp nhất vào hệ gen Nipponbare trong cùng vị trí hoặc vị trí rất giống sau quá trình hợp nhất không đúng luật T-ADN. Gen *Xa10^{E5}* nguyên vẹn, bao gồm vùng khởi đầu gen *Xa10^{E5}* (2456 bp), vùng mã hoá *Xa10* (381 bp), vùng kết thúc gen *Xa10* (378 bp) và vùng 3' 434 bp nằm bên sườn vùng kết thúc của gen *Xa10*, được thu hồi từ thực vật T₂-36 và thế hệ con của nó bằng khuếch đại PCR và tạo trình tự ADN. Trình tự hệ gen của *Xa10^{E5}* thu hồi từ L2 được nêu trong SEQ ID NO:12. Các vùng của trình tự hệ gen của *Xa10^{E5}* là như sau: các nucleotit 1-2456 là gen khởi đầu *Xa10^{E5}*; các nucleotit 2457-2837 là ORF của *Xa10*; các nucleotit 2838-3215 là gen kết thúc *Xa10*; và các nucleotit 3216-3649 là vùng 3' nằm bên sườn gen kết thúc *Xa10*. Thế hệ con T₂-36 vẫn được ký hiệu là L2 mang gen *Xa10^{E5}* chức năng cho các nghiên cứu tiếp.

Ví dụ 3

Xa10^{E5} Was được cảm ứng bởi các chủng *X. oryzae* pv. *oryzae* biểu hiện các chất hiệu ứng TAL tương ứng

Các thực vật L2 mang lại tính đề kháng với chủng *X. oryzae* pv. *oryzae* 1947(pHM1avrXa10), 1947(pHM1avrXa27), 1947(pHM1pthXo1), 1947(pHM1pthXo6) và 1947(pHM1pthXo7), trong khi đó các thực vật Nipponbare có tính nhạy cảm với tất cả các chủng này (Fig 3). Trong các thử nghiệm đối chứng, cả L2 và Nipponbare đều có tính nhạy cảm với chủng *X. oryzae* pv. *oryzae* 1947 (Fig 3).

Phân tích qRT-PCR cho thấy là gen *Xa10^{E5}* ở các thực vật L2 được hoạt hoá sau khi cấy các chủng *X. oryzae* pv. *oryzae* không tương thích (Fig 4). Mức biểu hiện của các sản phẩm phiên mã *Xa10* ở các thực vật L2 được cấy với 1947(pHM1avrXa27), 1947(pHM1pthXo1), 1947(pHM1pthXo6) hoặc 1947(pHM1pthXo7) là tương đương với mức của các sản phẩm phiên mã *Xa10* ở thực

vật IRBB10A được cấy 1947(pHM1avrXa10) (Fig 4). Mức biểu hiện của các sản phẩm phiên mã *Xa10* ở các thực vật L2 được cấy 1947(pHM1avrXa10) chia là 13% so với mức sản phẩm phiên mã *Xa10* ở thực vật IRBB10A được cấy 1947(pHM1avrXa10) (Fig 4), vẫn là đủ để tạo ra tính đề kháng hoàn toàn với các chủng không tương thích (Fig 3). Tương tự ở thực vật IRBB10A, không phát hiện được sản phẩm phiên mã *Xa10* ở các thực vật L2 sau khi cấy giả hoặc cấy 1947(pHM1) (Fig 4).

Ví dụ 4

Tính đề kháng phổ rộng do *Xa10^{E5}* mang lại với nhiều chủng trên cánh đồng được gom từ các nước khác nhau

Hai mươi tám chủng *X. oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) trên cánh đồng được gom từ các nước trồng lúa khác nhau trên khắp thế giới (Bảng 1) được dùng để thử nghiệm phổ kháng *Xa10^{E5}* ở các thực vật L2 với bệnh bạc lá do vi khuẩn bệnh. Các cây Nipponbare không chuyển gen có tính nhạy cảm hoặc có tính nhạy cảm trung bình với phần lớn các chủng *X. oryzae* pv. *oryzae* được thể hiện và chỉ thể hiện tính đề kháng vừa phải với GD1358 từ Trung quốc và CIAT1185 từ Columbia (Bảng 1). IRBB10A là dòng gần đẳng gen cải thiện của *Xa10* trong nền di truyền IR24 (Gu et al., 2008). IRBB10A chỉ cho tính kháng đầy đủ với PXO86(R2) và PXO112(R5), và tính đề kháng vừa phải với Aust-2031 và Aust-R3 (Bảng 1 và (Gu et al., 2008)). Các thực vật L2 mang lại tính đề kháng cao và phổ rộng với các chủng 27 *Xoo* được thử nghiệm chỉ trừ chủng 1947, là chủng *X. oryzae* pv. *oryzae* từ châu Phi (Bảng 1).

Bảng 1:

Phổ kháng của L2 *Xa10^{E5}* đối với các chủng *Xoo* được gom từ các nước khác nhau

Chủng <i>Xoo</i>	Nguồn gốc	Chiều dài thương tổn và điểm đánh giá tính đề kháng ^a			
		IR24	IRBB10A	NB	L2
1947	châu Phi	27,0±6,3 (S)	28,6±4,8 (S)	15,8±3,8(S)	10,1±0,9(S)
Aust-2031	Úc	5,5±1,4 (MR)	4,4±1,6 (MR)	9,4±1,8(S)	0,2±0,1(R)

Aust-R3	Úc	5,7±1,5 (MR)	6,8±2,0 (MR)	0,9±4,2 (S)	0,1±0,0 (R)
GD1358	Trung quốc	19,0±7,3 (S)	21,1±3,6 (S)	4,0±1,6 (MR)	0,1±0,0 (R)
HB17	Trung quốc	25,3±3,8 (S)	24,7±4,0 (S)	21,2±2,0 (S)	0,1±0,0 (R)
HB21	Trung quốc	19,6±2,6 (S)	15,2±3,5 (S)	20,8±1,7 (S)	0,1±0,0 (R)
HLJ72	Trung quốc	10,0±2,5 (S)	9,8±3,0 (S)	12,1±1,3 (S)	0,1±0,0 (R)
JS49-6	Trung quốc	24,6±3,6 (S)	21,6±4,0 (S)	18,3±2,6 (S)	0,1±0,0 (R)
LN57	Trung quốc	22,1±2,8 (S)	25,4±3,5 (S)	20,1±4,8 (S)	0,1±0,0 (R)
NX42	Trung quốc	23,3±4,7 (S)	23,2±4,8 (S)	20,6±2,2 (S)	0,1±0,0 (R)
ZHE173	Trung quốc	21,8±3,9 (S)	23,0±4,5 (S)	14,5±2,8 (S)	0,1±0,0 (R)
CIAT1185	Columbia	18,1±4,8 (S)	13,6±3,5 (S)	4,6±2,1(MR)	0,1±0,0 (R)
A3842	Ấn độ	22,4±3,8 (S)	21,5±3,9 (S)	16,6±3,4 (S)	0,1±0,0 (R)
A3857	Ấn độ	19,1±2,7 (S)	18,3±4,6 (S)	19,0±1,9 (S)	0,1±0,0 (R)
IXO56	Indonesia	24,1±5,2 (S)	23,9±3,6 (S)	13,3±2,5 (S)	0,1±0,0 (R)
H75373	Nhật	25,7±5,7 (S)	24,4±4,3 (S)	17,9±2,0 (S)	0,1±0,0 (R)
T7174	Nhật	23,3±3,6 (S)	19,1±3,0 (S)	19,7±2,1 (S)	0,2±0,1 (R)
JW89011	Hàn quốc	23,8±5,1 (S)	26,6±5,1 (S)	16,7±2,3 (S)	0,1±0,0 (R)

K202	Hàn quốc	25,6±3,9 (S)	26,3±4,3 (S)	12,3±2,3 (S)	0,1±0,0 (R)
NXO260	Nepal	22,4±3,4 (S)	22,4±4,5 (S)	16,6±2,0 (S)	0,1±0,0 (R)
PXO86(R2)	Philippines	21,9±3,1 (S)	0,2±0,1 (R)	12,7±2,1 (S)	0,1±0,0 (R)
PXO79(R3)	Philippines	23,1±4,3 (S)	20,2±4,1 (S)	6,7±2,3 (MS)	0,1±0,0 (R)
PXO71(R4)	Philippines	23,1±3,3 (S)	23,2±4,7 (S)	15,9±1,8 (S)	0,1±0,0 (R)
PXO112(R5)	Philippines	13,4±2,5 (S)	0,1±0,0 (R)	11,8±3,1 (S)	0,1±0,0 (R)
PXO113(R4)	Philippines	18,5±2,1 (S)	18,6±3,7 (S)	11,0±3,6 (S)	0,1±0,0 (R)
PXO99(R6)	Philippines	23,4±3,3 (S)	23,2±2,9 (S)	14,2±3,1 (S)	0,1±0,0 (R)
2	Thái lan	25,4±3,6 (S)	26,4±3,9 (S)	18,6±4,4 (S)	0,1±0,0 (R)
R7	Thái lan	10,0±6,5 (S)	6,9±2,7 (MS)	9,9±2,3 (S)	0,1±0,0 (R)

^a Cây lúa sáu tuần tuổi được cấy chủng *X. oryzae* pv. *oryzae*. Chiều dài thương tổn và kiểu hình bệnh của các cây được cấy được ghi vào thời điểm hai tuần sau khi cấy. Về điểm của bệnh: R, có tính kháng, chiều dài thương tổn ≤3,0 cm; MR, có tính kháng vừa phải, chiều dài thương tổn >3,0 cm và ≤6,0 cm; MS, có tính nhạy cảm vừa phải, chiều dài thương tổn >6,0 cm và ≤9,0 cm; S, có tính nhạy cảm, chiều dài thương tổn >9,0 cm.

Việc dùng các thuật ngữ “a” và “an” và “the” và các từ tương tự trong bản mô tả sáng chế (đặc biệt là trong Yêu cầu bảo hộ sau đây) được xem là bao hàm cả dạng số ít và số nhiều, trừ khi được chỉ ra khác đi trong bản mô tả này hoặc rõ ràng là mâu thuẫn với nội dung. Các thuật ngữ “chứa,” “có,” “bao gồm,” và “có chứa” được xem là các thuật ngữ mở (tức là có nghĩa “bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở,”) trừ khi

được quy định khác đi. Việc nêu các khoảng giá trị trong bản mô tả này chỉ dự định như là một cách viết tắt để cập đến từng giá trị riêng biệt nằm trong khoảng này, trừ khi được quy định khác đi trong bản mô tả này, và mỗi giá trị riêng biệt được đưa vào bản mô tả như được nêu riêng lẻ trong bản mô tả này. Ví dụ, nếu đề cập đến khoảng từ 10 đến 15, thì cũng bộc lộ 11, 12, 13, và 14. Tất cả các phương pháp được mô tả trong bản mô tả này có thể được thực hiện theo trình tự thích hợp bất kỳ trừ khi được lưu ý khác đi trong bản mô tả này hoặc rõ ràng là mâu thuẫn với nội dung. Việc sử dụng bất kỳ và tất cả ví dụ, hoặc ngôn ngữ chỉ ví dụ (ví dụ, “như”) được đưa ra trong bản mô tả này, chỉ dự định là để minh họa rõ hơn sáng chế và mà không nhằm giới hạn phạm vi sáng chế trừ khi được yêu cầu bảo hộ khác đi. Không có từ nào trong bản mô tả được hiểu là để chỉ thành phần không được yêu cầu bảo hộ bất kỳ là thiết yếu để thực hiện sáng chế.

Cần hiểu rằng các phương pháp và thành phần theo có thể được kết hợp ở dạng nhiều phương án, chỉ một số ít phương án là được bộc lộ trong bản mô tả này. Các phương án của sáng chế được mô tả trong bản mô tả này, bao gồm các phương án tốt nhất đã biết đối với các tác giả sáng chế để thực hiện sáng chế. Các thay đổi của các phương án này có thể trở nên rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực khi tham khảo phần mô tả trên đây. Các tác giả sáng chế cho rằng người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực có thể áp dụng các thay đổi như vậy khi thích hợp, và các tác giả sáng chế dự định rằng sáng chế có thể được thực hiện theo cách khác với cách được mô tả cụ thể trong bản mô tả này. Theo đó, sáng chế bao gồm tất cả các cải biến và biến đổi tương đương hợp lệ của đối tượng được nêu trong yêu cầu bảo hộ kèm theo đây. Ngoài ra, kết hợp bất kỳ của các yếu tố được mô tả trên đây ở tất cả các biến đổi có thể có của nó được tính đến trong sáng chế trừ khi được quy định khác đi trong bản mô tả này hoặc rõ ràng là mâu thuẫn với nội dung.

Alfano, J.R., and Collmer, A. (2004). Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense. *Annu Rev Phytopathol* 42, 385-414.

Antony, G., Zhou, J., Huang, S., Li, T., Liu, B., White, F., and Yang, B. (2010). Rice *xa13* recessive resistance to bacterial blight is defeated by induction of the disease susceptibility gene *Os-11N3*. *Plant Cell* 22, 3864-3876.

Boch, J., and Bonas, U. (2010). *Xanthomonas* AvrBs3 family-type III effectors: discovery and function. *Annu Rev Phytopathol* 48, 419-436.

Boch, J., Scholze, H., Schornack, S., Landgraf, A., Hahn, S., Kay, S., Lahaye, T., Nickstadt, A., and Bonas, U. (2009). Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science* 326, 1509-1512.

Bogdanove, A.J., Schornack, S., and Lahaye, T. (2010). TAL effectors: finding plant genes for disease and defense. *Curr Opin Plant Biol* 13, 394-401.

Bonas, U., Stall, R.E., and Staskawicz, B. (1989). Genetic and structural characterization of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Mol Gen Genet* 218, 127-136.

Chen, L.Q., Hou, B.H., Lalonde, S., Takanaga, H., Hartung, M.L., Qu, X.Q., Guo, W.J., Kim, J.G., Underwood, W., Chaudhuri, B., Chermak, D., Antony, G., White, F.F., Somerville, S.C., Mudgett, M.B., and Frommer, W.B. (2010). Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. *Nature* 468, 527-532.

Chu C.C. et al. (1975). Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Scientia Sinica* 18, 659-668.

Dellaporta, S.L., Wood, J., and Hicks, J.B. (1983). A plant DNA miniprep: version II. *Plant Molecular Biology Reporter* 1, 19-21.

Gamborg, O.L., Miller, R.A., Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* 50, 151-158.

Gu, K., Tian, D., Yang, F., Wu, L., Sreekala, C., Wang, D., Wang, G.L., and Yin, Z. (2004). High-resolution genetic mapping of *Xa27(t)*, a new bacterial blight resistance gene in rice, *Oryza sativa* L. *Theor Appl Genet* 108, 800-807.

Gu, K., Yang, B., Tian, D., Wu, L., Wang, D., Sreekala, C., Yang, F., Chu, Z., Wang, G.L., White, F.F., and Yin, Z. (2005). *R* gene expression induced by a type-III effector triggers disease resistance in rice. *Nature* 435, 1122-1125.

Gu, K., Sangha, J.S., Li, Y., and Yin, Z. (2008). High-resolution genetic mapping of bacterial blight resistance gene *Xa10*. *Theor Appl Genet* 116, 155-163.

Gu, K., Tian, D., Qiu, C., and Yin, Z. (2009). Transcription activator-like type III effector *AvrXa27* depends on *OstFIIAgamma5* for the activation of *Xa27* transcription in rice that triggers disease resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Mol Plant Pathol* 10, 829-835.

Gu, K., Chiam, H., Tian, D., and Yin, Z. (2011). Molecular cloning and expression of heteromeric ACCase subunit genes from *Jatropha curcas*. *Plant Sci* 180, 642-649.

Herbers, K., Conradsstrauch, J., and Bonas, U. (1992). Race-specificity of plant-resistance to bacterial spot disease determined by repetitive motifs in a bacterial avirulence protein. *Nature* 356, 172-174.

Heuer, H., Yin, Y.N., Xue, Q.Y., Smalla, K., and Guo, J.H. (2007). Repeat domain diversity of *avrBs3*-like genes in *Ralstonia solanacearum* strains and association with host preferences in the field. *Appl Environ Microbiol* 73, 4379-4384.

Hiei, Y., Ohta, S., Komari, T., and Kumashiro, T. (1994). Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J* 6, 271-282.

Hopkins, C.M., White, F.F., Choi, S.H., Guo, A., and Leach, J.E. (1992). Identification of a family of avirulence genes from *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Mol Plant Microbe Interact* 5, 451-459.

Iyer, A.S., and McCouch, S.R. (2004). The rice bacterial blight resistance gene *xa5* encodes a novel form of disease resistance. *Mol Plant Microbe Interact* 17, 1348-1354.

Kauffman, H.E., Reddy, A.P.K., Hsieh, S.P.Y., and Merca, S.D. (1973). An improved technique for evaluating resistance to rice varieties of *Xanthomonas oryzae*. Plant Dis Rep 57, 537-541.

Kay, S., and Bonas, U. (2009). How *Xanthomonas* type III effectors manipulate the host plant. Curr Opin Microbiol 12, 37-43.

Kay, S., Hahn, S., Marois, E., Hause, G., and Bonas, U. (2007). A bacterial effector acts as a plant transcription factor and induces tế bào size regulator. Science 318, 648-651.

Mew, T.W.V.C., C. M. Reyes, R. C. (1982). Interaction of *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* and a resistant rice cultivar. Phytopathology 72, 786-789.

Moscou, M.J., and Bogdanove, A.J. (2009). A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. Science 326, 1501.

Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15, 473-497.

Nino-Liu, D.O., Ronald, P.C., and Bogdanove, A.J. (2006). *Xanthomonas oryzae* pathovars: model pathogens of a model crop. Mol Plant Pathol 7, 303-324.

Romer, P., Hahn, S., Jordan, T., Strauss, T., Bonas, U., and Lahaye, T. (2007). Plant pathogen recognition mediated by promoter activation of the pepper *Bs3* resistance gene. Science 318, 645-648.

Romer, P., Recht, S., and Lahaye, T. (2009). A single plant resistance gene promoter engineered to recognize multiple TAL effectors from disparate pathogens. Proc Natl Acad Sci USA 106, 20526-20531.

Sambrook, J., Fritsch, E., and Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, (1989) 2nd edn Cold Spring Harbor. NY Cold Spring Harbor Laboratory.

Sugio, A., Yang, B., Zhu, T., and White, F.F. (2007). Two type III effector genes of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* control the induction of the host genes OsTFIIAgamma1 and OsTFX1 during bacterial blight of rice. Proc Natl Acad Sci USA 104, 10720-10725.

Tian, D., and Yin, Z. (2009). Constitutive heterologous expression of *avrXa27* in rice containing the *R* gene *Xa27* confers enhanced resistance to compatible *Xanthomonas oryzae* strains. *Mol Plant Pathol* 10, 29-39.

White, F.F., Potnis, N., Jones, J.B., and Koebnik, R. (2009). The type III effectors of *Xanthomonas*. *Mol Plant Pathol* 10, 749-766.

Yang, B., and White, F.F. (2004). Diverse members of the AvrBs3/PthA family of type III effectors are major virulence determinants in bacterial blight disease of rice. *Mol Plant Microbe Interact* 17, 1192-1200.

Yang, B., Sugio, A., and White, F.F. (2005). Avoidance of host recognition by alterations in the repetitive and C-terminal regions of AvrXa7, a type III effector of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Mol Plant Microbe Interact* 18, 142-149.

Yang, B., Sugio, A., and White, F.F. (2006). *Os8N3* is a host disease-susceptibility gene for bacterial blight of rice. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 10503-10508.

Yoshimura, A., Mew, T.W., Khush, G.S., and Moura, T. (1983). Inheritance of resistance to bacterial blight in rice cultivar Cas 209. *Phytopathology* 73, 1409-1412.

Yoshimura, S., Yoshimura, A., Iwata, N., McCouch, S.R., Abenes, M.L., Baraoidan, M.R., Mew, T.W., and Nelson, R.J. (1995). Tagging and combining bacterial blight resistance genes in rice using RAPD and RFLP markers. *Mol Breed* 1, 375-387.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Gen khởi đầu thực vật chọn từ nhóm chỉ bao gồm:
 - (a) gen khởi đầu thực vật chứa trình tự nucleotit được nêu trong SEQ ID NO:2;
 - (b) gen khởi đầu thực vật chỉ bao gồm trình tự nucleotit được nêu trong SEQ ID NO:2;
 - (c) gen khởi đầu thực vật chỉ bao gồm trình tự nucleotit được nêu trong SEQ ID NO:10; và
 - (d) gen khởi đầu thực vật chứa các nucleotit 2208-2456 được nêu trong SEQ ID NO:10 và từ 1-2207 nucleotit kế tiếp được nêu trong SEQ ID NO:10 nằm ở đầu 5' đối với và kế tiếp với nucleotit 2208.
2. Gen khởi đầu thực vật theo điểm 1, trong đó gen khởi đầu này chứa trình tự nucleotit được nêu trong SEQ ID NO:2.
3. Gen khởi đầu thực vật theo điểm 1, trong đó gen khởi đầu này chỉ bao gồm trình tự nucleotit được nêu trong SEQ ID NO:2.
4. Gen khởi đầu thực vật theo điểm 1, trong đó gen khởi đầu này chỉ bao gồm trình tự nucleotit được nêu trong SEQ ID NO:10.
5. Gen khởi đầu thực vật theo điểm 1, trong đó gen khởi đầu này chỉ bao gồm các nucleotit 2208-2456 được nêu trong SEQ ID NO:10 và từ 1-2207 nucleotit kế tiếp được nêu trong SEQ ID NO:10 nằm ở đầu 5' đối với và kế tiếp với nucleotit 2208.
6. Phân tử axit nucleic mã hoá tính đề kháng bệnh phổ rộng với bệnh bạc lá do vi khuẩn chứa gen khởi đầu thực vật theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6 được liên kết có điều khiển với trình tự nucleotit mã hoá protein Xa10 chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:14.
7. Phân tử axit nucleic theo điểm 6, trong đó trình tự nucleotit mã hoá protein Xa10 chứa trình tự nucleotit được nêu trong SEQ ID NO:13.
8. Phân tử axit nucleic theo điểm 6, trong đó trình tự nucleotit mã hoá protein Xa10 chỉ bao gồm trình tự nucleotit được nêu trong SEQ ID NO:15.

9. Phân tử axit nucleic theo điểm 6, trong đó trình tự nucleotit mã hoá protein Xa10 chỉ bao gồm trình tự nucleotit được nêu trong SEQ ID NO:16.
10. Phân tử axit nucleic theo điểm 6, trong đó trình tự nucleotit mã hoá protein Xa10 chứa các nucleotit 1-381 của trình tự nucleotit được nêu trong SEQ ID NO:17 và từ 1-1834 nucleotit kế tiếp được nêu trong SEQ ID NO:17 ở đầu 3' đối với và kế tiếp với nucleotit 381.
11. Phân tử axit nucleic theo điểm 6, trong đó trình tự nucleotit mã hoá protein Xa10 chứa các nucleotit 1-759 của trình tự nucleotit được nêu trong SEQ ID NO:17 và từ 1-1456 các nucleotit kế tiếp được nêu trong SEQ ID NO:17 ở đầu 3' đối với và kế tiếp với nucleotit 759.
12. Phân tử axit nucleic theo điểm 7, trong đó trình tự nucleotit mã hoá protein Xa10 chỉ bao gồm trình tự nucleotit được nêu trong SEQ ID NO:17.
13. Vật truyền chứa phân tử axit nucleic theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 6 đến 12.
14. Tế bào thực vật chuyển gen chứa phân tử axit nucleic theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 6 đến 12 được hợp nhất ổn định trong hệ gen của nó.
15. Tế bào thực vật chuyển gen theo điểm 14, trong đó thực vật này là cây lúa.
16. Thực vật chuyển gen chứa phân tử axit nucleic theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 6 đến 12 được hợp nhất ổn định trong hệ gen của nó.
17. Thực vật chuyển gen theo điểm 16, trong đó thực vật này là cây lúa.
18. Thực vật chuyển gen theo điểm 16, trong đó thực vật chuyển gen có tính đề kháng bệnh phổ rộng với bệnh bạc lá do vi khuẩn.
19. Thực vật chuyển gen theo điểm 18, trong đó thực vật này là cây lúa và tác nhân là nguyên nhân gây bệnh bạc lá do vi khuẩn là *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*.
20. Thế hệ con của thực vật chuyển gen theo điểm 16, 18 hoặc 19, trong đó thế hệ con này được tạo ra bằng cách tự lai thực vật chuyển gen này hoặc nhân giống thực vật thứ hai với thực vật chuyển gen này và thu hồi thế hệ con của phép tự lai hoặc phép nhân giống, trong đó thế hệ con này chứa axit nucleic.

21. Phương pháp tạo ra thực vật chuyển gen có tính đề kháng phổ rộng với bệnh bạc lá do vi khuẩn bao gồm việc đưa phân tử axit nucleic theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 6 đến 12 hoặc vật truyền theo điểm 13 vào thực vật, trong đó thực vật chuyển gen có phân tử axit nucleic được hợp nhất ổn định trong hệ gen của nó.
22. Phương pháp tạo ra thực vật chuyển gen có tính đề kháng phổ rộng với bệnh bạc lá do vi khuẩn bao gồm bước chuyển nạp phân tử axit nucleic theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 6 đến 12 hoặc vật truyền theo điểm 13 vào tế bào thực vật hoặc các tế bào thực vật và tái sinh thực vật chuyển gen từ tế bào thực vật đã được chuyển nạp hoặc các tế bào thực vật đã được chuyển nạp này, trong đó thực vật chuyển gen có phân tử axit nucleic được hợp nhất ổn định trong hệ gen của nó.
23. Phương pháp theo điểm 21 hoặc 22, trong đó thực vật này là cây lúa.

Danh mục trình tự

<110> Temasek Life Sciences Laboratory

<120> Gen khởi đầu thực vật, thực vật chuyển gen và phương pháp tạo ra thực vật chuyển gen có tính đề kháng phổ rộng với bệnh bạc lá do vi khuẩn

<130> FP6168

<160> 37

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 279

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự tổng hợp

<400> 1

cttattgatg tcgcaatcac ttcaattact tattgatgtc gcaatcacgt tcaccctata 60

taatccccaa atccccctcct ccgcatatgc atctccccct actgtacacc accttatata 120

tacacacggt cactcctata aaaggccctc accaaccat ccttatatat agaagaagag 180

acccatagag agcatcagca cagccgaaac tcgcgagaga tcctcctccc tcctctttca 240

ttcttcgaga tgcagctgat gctcacattc tgcacgggc 279

<210> 2

<211> 249

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự gen khởi đầu tổng hợp

<400> 2

cttattgatg tcgcaatcac ttcaattact tattgatgtc gcaatcacgt tcaccctata 60

taatccccaa atccccctcct ccgcatatgc atctccccct actgtacacc accttatata 120

tacacacggt cactcctata aaaggccctc accaaccat ccttatatat agaagaagag 180

acccatagag agcatcagca cagccgaaac tcgcgagaga tcctcctccc tcctctttca 240

ttcttcgag 249

<210> 3

<211> 30

<212> ADN

<213> Oryza sativa

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(30)

<400> 3

atg cag ctg atg ctc aca ttc tgc acg ggc

30

Met Gln Leu Met Leu Thr Phe Cys Thr Gly
1 5 10

<210> 4
<211> 10
<212> PRT
<213> Oryza sativa

<400> 4

Met Gln Leu Met Leu Thr Phe Cys Thr Gly
1 5 10

<210> 5
<211> 23
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Yếu tố gắn kết chất hiệu ứng TAL

<400> 5
tataatcccc aaatcccctc ctc

23

<210> 6
<211> 25
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Yếu tố gắn kết chất hiệu ứng TAL

<400> 6
tgcactctccc cctactgtac accac

25

<210> 7
<211> 17
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Yếu tố gắn kết chất hiệu ứng TAL

<400> 7
tatatacaca cgttcac

17

<210> 8
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Yếu tố gắn kết chất hiệu ứng TAL

<400> 8
tataaaaggc cctcaccaac ccat

24

<210> 9

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

<220>
 <223> Yếu tố gắn kết chất hiệu ứng TAL

<400> 9
 tagaagaaga gaccata

18

<210> 10
 <211> 2456
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> trình tự gen khởi đầu tổng hợp

<400> 10

ctaggtttat tggctgagca atgcccaatt ccacaaagac atgctggcgt gctgctgctt	60
gggcagttgg gctatgttga tctacattat atattaaagg taaaaggata aacctttgct	120
cattgataac actcaacatg attagatcta aaagtaaaga tgaagccatg aacacgtttt	180
ttaacagagt aaatccaatc cttcaaaaca caaaagaaaa aaaaaagagc aatgatgaaa	240
cacggtattg ttagagtttg tcttgatgga ccactagact agactcgatg gagcaaacca	300
caatcatcgg ataggcccta caacagaaga actctcatcc actctttacc tcaccgaatc	360
tcctcacgaa attgaaagggt gggaattgag aaacaaacgt tgaaacatat cttgatctga	420
ggcaccagc gtctctcaaa aaaaactaca gattacatca acaaagaatc tttttcttct	480
tccttcctct ctctacctct tcttgagcct aattctttct taccaacaaa aactacgttt	540
tgaccatgat taccactac tactacatga ttgtgccgca accgcaacca ccaccaccga	600
gcagcaaagc agcagatcgg cgacagttag atcaggcggg ggcctgaact tggcaagaga	660
ggagaagaaa gcaaagagag gggaggagat gagacctcga atcggatggt cttgaagacg	720
acctcctcga cgttgctgcc gatggtgggt ggcgcggtga cggcctcgcc gaggtggagc	780
ttgtagagcg tgggtgtctt gccggcggtg tcgagcccca cgacgacgat cttgtactcc	840
ttcgcgggga acatcaagaa ccacaccctc gacatccacg ccccatctt cttcctctct	900
gtctcctcct caagcaacca agaaaacacc gaatctgaat ctgcgcgcgc ggcggctggc	960
ggctggcgggt ggatggatct ccgcgggagg aagtggactg cgagtttggg ggatcggatc	1020
ggcgaatggg gtggaggagg aagaacaaga ggaggtcgga tttggaggag gaaaggtgag	1080
aagggaattg ggggtgtgat attcgtgcga agctttcctc tctcatggcc agccgagggg	1140
gatttgggct gggcctcctg tgggctttgg gctgtggaag tagagacatg gcgagtgagc	1200
cggaataagt ctactaatct tccctcgttt ttacgtagag tttaatcgac atccctaaac	1260
cgcaatacca ggaatcttca cttttcatct ttgcaaaacc gtttgactta ggtccgatag	1320

cagtatggat aggtgttttc gctgatgtgg cattctagtt agaaaaaaaa aacatgaggg 1380
 ggtccacatg taactgagcc catgtattaa ttgggcccac atgtcagggc tttcttcttc 1440
 ctctcctcta ttcccatttc tctccccaat ctccacctat ccccttttcc ccagtttata 1500
 attgatcata tttatcattt aaactactca atatcgacat taatttgatt gaaaaagaaa 1560
 ttagaaaaaa taaaatagaa aatagaaaa aacggtacgg tcgaaaatag tacctcttaa 1620
 acggaaacgg cgtccggtcg attgagaatt tccgtgaccg ttttcagctg ccataggctt 1680
 gggccaagcg acaacacttt gggccaagct aaaaacgtct tgggcttttc tgggtcgaaa 1740
 gtcgagctaa actcatatgg atccaagtgg ctccaggtgt aaatattagt aggattaatc 1800
 ccacatagat agcttacgaa ggttgagagc aatatataaa tccttgcgtc ctaacgacag 1860
 tatatgggga aaaaaatttt gtgggggtgt tcgttatata tgcataaata tatatacata 1920
 tatatcttat tatctccccg ggaagcccaa tctctctccc cgggaagccc aatctctctc 1980
 aggaatttca agaacttcaa ttgatgaatt tatatttata actaagtcaa ttggtgatcc 2040
 tattaccgga acccaaggtc ggttataagt caattggtga tcctattacc ggaagggtta 2100
 gtcaattggt gatcctatta ccggaaggtc caaggtaaag aataaccagt tacacaagg 2160
 ccaaggtaaa gaataaccag ttacaccaa aggtccaaca ccaaaaactt attgatgtcg 2220
 caatcacttc aattacttat tgatgtcgca atcacgttca ccctatataa tccccaaatc 2280
 cctcctccc gatatgcac tcctccctact gtacaccacc ttatatatac acacgttcac 2340
 tcctataaaa ggccctcacc aaccctcct tatatataga agaagagacc catagagagc 2400
 atcagcacag ccgaaactcg cgagagatcc tcctccctcc tctttcattc ttogag 2456

<210> 11
 <211> 4671
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> trình tự hệ gen của gen tổng hợp

<400> 11
 ctaggtttat tggctgagca atgccaatt ccacaaagac atgctggcgt gctgctgctt 60
 gggcagttgg gctatgttga tctacattat atattaaagg taaaaggata aacctttgct 120
 cattgataac actcaacatg attagatcta aaagtaaaga tgaagccatg aacacgtttt 180
 ttaacagagt aaatccaatc cttcaaaaca caaaagaaaa aaaaaagagc aatgatgaaa 240
 cacggtattg ttagagtttg tcttgatgga ccactagact agactcgatg gagcaaacca 300
 caatcatcgg ataggcccta caacagaaga actctcatcc actctttacc tcaccgaatc 360
 tcctcacgaa attgaaagggt gggaattgag aaacaaacgt tgaaacatat cttgatctga 420
 ggcaccacgc gtctctcaaa aaaaactaca gattacatca acaaagaatc tttttcttct 480

tccttctctct ctctacctct tcttgagcct aattctttct taccaacaaa aactacgttt	540
tgaccatgat taccactac tactacatga ttgtgccgca accgcaacca ccaccaccga	600
gcagcaaagc agcagatcgg cgacagttag atcagggcggg ggcctgaact tggcaagaga	660
ggagaagaaa gcaaagagag gggaggagat gagacctcga atcggatggt cttgaagacg	720
acctcctcga cgttgctgcc gatggtgggt gcggcggtga cggcctcgcc gaggtggagc	780
ttgtagagcg tgggtgtctt gccggcggtg tcgagcccca cgacgacgat cttgtactcc	840
ttcgccggga acatcaagaa ccacaccctc gacatccacg ccccatctt cttcctctct	900
gtctcctcct caagcaacca agaaaacacc gaatctgaat ctgcgcgcgc ggcggctggc	960
ggctggcgggt ggatggatct ccgcgggagg aagtggactg cgagtttggg ggatcggatc	1020
ggcgatgggg gtggaggagg aagaacaaga ggaggtcgga tttggaggag gaaaggtgag	1080
aagggaattg ggggtgtggat attcgtgcga agctttcctc tctcatggcc agccgagggg	1140
gatttgggct gggcctcctg tgggctttgg gctgtggaag tagagacatg gcgagtgagc	1200
cggaataagt ctactaatct tccctcgttt ttacgtagag tttaatcgac atccctaaac	1260
cgcaatacca ggaatcttca cctttcatct ttgcaaaacc gtttgactta ggtccgatag	1320
cagtatggat aggtgttttc gctgatgtgg cattctagtt agaaaaaaaa aacatgaggg	1380
ggtccacatg taactgagcc catgtattaa ttgggcccac atgtcagggc tttcttcttc	1440
ctctcctcta ttccatttc tctcccaat ctccacctat ccccttttcc ccagtttata	1500
attgatcata tttatcattt aaactactca atatcgacat taatttgatt gaaaaagaaa	1560
ttagaaaaaa taaaatagaa aaatagaaaa aacgggtacgg tcgaaaatag tacctcttaa	1620
acggaaacgg cgtccggctg attgagaatt tccgtgaccg ttttcagctg ccataggctt	1680
gggccaaagc acaacacttt gggccaagct aaaaacgtct tgggcttttc tgggtcgaaa	1740
gtcgagctaa actcatatgg atccaagtgg ctcacggtgt aaatattagt aggattaatc	1800
ccacatagat agcttacgaa ggttgagagc aatatataaa tccttgcgtc ctaacgacag	1860
tatatgggga aaaaaatttt gtgggggtgt tcgttatata tgcataata tatatacata	1920
tatatcttat tatctccccg ggaagcccaa tctctctccc cggaagccc aatctctctc	1980
aggaatttca agaacttcaa ttgatgaatt tatatttata actaagtcaa ttggtgatcc	2040
tattaccgga acccaaggtc ggttataagt caattggtga tcctattacc ggaagggtta	2100
gtcaattggt gatcctatta ccggaaggtc caaggtaaag aataaccagt tacacaaggt	2160
ccaaggtaaa gaataaccag ttacaccaa aggtccaaca caaaaactt attgatgtcg	2220
caatcacttc aattacttat tgatgtcgca atcacgttca ccctatataa tccccaaatc	2280
ccctcctccc gatatgcac tccccctact gtacaccacc ttatatatac acacgttcac	2340
tcctataaaa ggcctcacc aaccatcct tatatataga agaagagacc catagagagc	2400

atcagcacag ccgaaactcg cgagagatcc tectcctcc tctttcatte ttcgagatgc	2460
agctgatgct cacattctgc acgggcccc tctgtttgc cgtcctccta ctgatggtat	2520
acctcaagca actcgccgcc gcggcctgcg tcgacgtgct catcatctac ctctgccgct	2580
tctcctcct cgcggcatc atcttctcgg gcgacggcaa gctacgattc cgcgtcaagg	2640
tagcgatcgg gttcctctac atctccctct cggccatact cttctacctc tctgccgctg	2700
tcatggcggt gccgcggtg ggtgcggtg ccatgtgggg aatggcgctc gtcgccactg	2760
agcttggtta ctctttctta tgcccgtata gctgccgctg cattggtgaa gacgacgagg	2820
agatttcccc cgtctgaggg ccatatatat cacgatggat aaacatatta catactccct	2880
ccgtttcaaa atgtttgaca ccattgactt ttcagcacat gtttgaccgt tcgtttcatt	2940
caaaaaaat tgtgaaatat gtaaaactat atgtgtacat ggaaatatat ttaacaatga	3000
atcaaagat atgaaaagaa taaataatta cttaaatttt ttgaataaga cgaatggtga	3060
aacacgtact aaaaagtcaa tgggtgtcaa ctttttgaaa cggagggagt attaattggt	3120
ttgttagttt gtgttcattc atatatagct gttgtatttt tacggttaat aaagagaaac	3180
cggcgagcgc ctagcagccg gctagtttag tcaaatttgc actatatgta tgttgatact	3240
tgattcatca ttcatatcga tcagggtgtc ctagctagct cgtgtttata tttacgcttg	3300
atgtatgttg atacttgatt tcatcatcca aatttgcact agcttacgtg ttgttccagt	3360
ttgttggggg ccacgtcaa atcaccctta atttcttgta ccattttggc acgtactaca	3420
catgtatccc tccatccttg tagtttgatt atcacttaag taaaggacgt tgacaccaag	3480
tacaacgaaa cctctatggt tcgaaaatta atttgcacg atcaaagatg tgttttgctg	3540
cttcatgtca tacggattgt atcatgcttg ctttaaatat tgcattggagt tacacaaacg	3600
aaaaataatt ttagctgtag ttgtatgcat cactttaatt tagcgaggaa taatatggat	3660
ctgaccacgt actacgcgat tctgtctatc gtcgaggctg tcttcgcctt cttcttcta	3720
ccgtacagct gcggcagcga cgtcgtggac gagaatatcc cacatgtctg accaggggaa	3780
cgacatcctc tgacgagaga cgtgttcgct gacacgtggg ctccactccc cttaaactca	3840
catgtcagaa attcacgtca cagagcatat actccatcag tcctattata taagggtttt	3900
agatggatga gaagtactac gaatatagat aaaaaatgtc tcgtcgttta tctaaaatct	3960
tttatatttt gggacagagg aaatatatga tcaacttaga tcattttcaaa accaaaacaa	4020
aaactaaaaa gcacggtgaa ctttgtgtgc taccagacca aaatttcctt tggtttgtgt	4080
tagttaatta cctaagtgtg atttcttcat gtcaattagt tagttgatcc atttggctct	4140
aaactaattt ccacgttcgc aaataaagca gcagcttgct ggctagctag gccttcatgt	4200
tgctcatgta tgcgcacttg tgcagtatga tcaatcaggt caatttaatt atcttattaa	4260
ttatgatgta tatatactcc ctccgtccca aaaaagtga .tataaaactg aatgtgacat	4320

atgcatatcc agattcattg tcacatccag tattatgttg gttttttata gaacagaggg 4380
 agtatgtcac ttcaaattgt tttcaaattct ttaatttatt tcttcttatt tctcgagatc 4440
 tacaacggaa gtaacaaata aaacctctaa aaatgatcgt aattctgaaa tttaaaatcg 4500
 tattatgtcc aagatctcga tatactagcc agtactcgat ccttatttca taccgtatga 4560
 aatccaagga tcagcccagc ccagaccata cagcccaccc cggcccgcgt acggaaacca 4620
 acggtctaga atcgctcgac cgaaaaacgc caggtgtcaa ccgcacgagc t 4671

<210> 12

<211> 3649

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự hệ gen của gen tổng hợp

<400> 12

ctaggtttat tggctgagca atgcccatt ccacaaagac atgctggcgt gctgctgctt 60
 gggcagttgg gctatgttga tctacattat atattaaagg taaaaggata aacctttgct 120
 cattgataac actcaacatg attagatcta aaagtaaaga tgaagccatg aacacgtttt 180
 ttaacagagt aaatccaatc cttcaaaaca caaaagaaaa aaaaaagagc aatgatgaaa 240
 cacggtattg ttagagtttg tcttgatgga ccactagact agactcgatg gagcaaacca 300
 caatcatcgg ataggcccta caacagaaga actctcatcc actctttacc tcaccgaatc 360
 tcctcacgaa attgaaagggt gggaattgag aaacaaacgt tgaaacatat cttgatctga 420
 ggcaccacgc gtctctcaaa aaaaactaca gattacatca acaaagaatc tttttcttct 480
 tccttctctct ctctacctct tcttgagcct aattctttct taccaacaaa aactacgttt 540
 tgaccatgat taccactac tactacatga ttgtgccgca accgcaacca ccaccaccga 600
 gcagcaaagc agcagatcgg cgacagttag atcaggcggg ggcctgaact tggcaagaga 660
 ggagaagaaa gcaaagagag gggaggagat gagacctga atcggatgtt cttgaagacg 720
 acctcctcga cgttgctgcc gatggtgggt gcggcggtga cggcctcgcc gaggtggagc 780
 ttgtagagcg tgggtggtctt gccggcggtg tcgagcccca cgacgacgat cttgtactcc 840
 ttcgccggga acatcaagaa ccacaccctc gacatccacg ccccatctt ctctctctct 900
 gtctcctcct caagcaacca agaaaacacc gaatctgaat ctgcgcgccg gcgggctggc 960
 ggctggcggg ggatggatct ccgcgggagg aagtggactg cgagtttggg ggatcggatc 1020
 ggcgatgggg gtggaggagg aagaacaaga ggaggtcgga tttggaggag gaaaggtag 1080
 aagggatttg ggggtgtggat attcgtgcga agctttcctc tctcatggcc agccgagggg 1140
 gatttgggct gggcctcctg tgggcttttg gctgtggaag tagagacatg gcgagtgagc 1200
 cggaataagt ctactaatct tccctcgttt ttacgtagag tttaatcgac atccctaaac 1260

cgcaatacca ggaatcttca cctttcatct ttgcaaaacc gtttgactta ggtccgatag	1320
cagtatggat aggtgttttc gctgatgtgg cattctagtt agaaaaaaaa aacatgaggg	1380
ggtccacatg taactgagcc catgtattaa ttggggccac atgtcagggc tttcttcttc	1440
ctctcctcta ttcccatttc tctccccaat ctccacctat ccccttttcc ccagtttata	1500
attgatcata tttatcattt aaactactca atatcgacat taatttgatt gaaaaagaaa	1560
ttagaaaaaa taaaatagaa aaatagaaaa aacggtacgg tcgaaaatag tacctcttaa	1620
acggaaacgg cgtccggtcg attgagaatt tccgtgaccg ttttcagctg ccataggctt	1680
gggccaagcg acaacacttt gggccaagct aaaaacgtct tgggcttttc tgggtcgaaa	1740
gtcgagctaa actcatatgg atccaagtgg ctcacgggtg aaatattagt aggattaatc	1800
ccacatagat agcttacgaa ggttgagagc aatatataaa tccttgcgtc ctaacgacag	1860
tatatgggga aaaaaatttt gtgggggtgt tcggttatata tgcataata tatatacata	1920
tatatcttat tatctccccg ggaagcccaa tctctctccc cggaagccc aatctctctc	1980
aggaatttca agaacttcaa ttgatgaatt tatatttata actaagtcaa ttggtgatcc	2040
tattaccgga acccaaggtc ggttataagt caattggtga tcctattacc ggaagggtta	2100
gtcaattggt gatcctatta ccggaaggtc caaggtaaag aataaccagt tacacaaggt	2160
ccaaggtaaa gaataaccag ttacaccaaa aggtccaaca caaaaactt attgatgtcg	2220
caatcacttc aattacttat tgatgtcgca atcacgttca ccctatataa tccccaaatc	2280
ccctcctccc gatatgcac tcctccctact gtacaccacc ttatatatac acacgttcac	2340
tcctataaaa ggccctcacc aaccctcct tatatataga agaagagacc catagagagc	2400
atcagcacag ccgaaactcg cgagagatcc tcctccctcc tctttcattc ttcgagatgc	2460
agctgatgct cacattctgc acggggcccc tcctgtttgc cgtcctccta ctgatggtat	2520
acctcaagca actcgccgcc gcggcctgcg tcgacgtgct catcatctac ctctgccgct	2580
tcctcctcct ccgcggcatc atcttctccg gcgacggcaa gctacgattc cgcgtcaagg	2640
tagcgatcgg gttcctctac atctccctct cgccataact cttctacctc tctgccgctg	2700
tcattggcgtt gccgcgctgg ggtgcggtgg ccattgtggg aatggcgctc gtcgccactg	2760
agcttggtta ctcttctta tgcccgata gctgccgctg cattggtgaa gacgacgagg	2820
agatttcccc cgtctgaggc ccatatatat cacgatggat aaacatatta catactccct	2880
ccgtttcaaa atgtttgaca ccattgactt ttcagcacat gtttgaccgt tcgtttcatt	2940
caaaaaaaaa tgtgaaatat gtaaaactat atgtgtacat ggaaatatat ttaacaatga	3000
atcaaatgat atgaaaagaa taaataatta cttaaatttt ttgaataaga cgaatggtga	3060
aacacgtact aaaaagtcaa tgggtgtcaa catthtgaaa cggagggagt attaattggt	3120
ttgttagttt gtgttcattc atatatagct gttgtattht tacggttaat aaagagaaac	3180

```

cggcgagcgc ctagcagccg gctagtttag tcaaatttgc actatatgta tgttgatact      3240
tgattcatca ttcatatcga tcagggtgtc ctagctagct cgtgtttata tttagcgttg      3300
atgtatgttg atacttgatt tcatcatcca aatttgcact agcttacgtg ttgttccagt      3360
ttgttggggg ccatcgtcaa atcaccctta atttcttgta ccattttggc acgtactaca      3420
catgtatccc tccatccttg tagtttgatt atcacttaag taaaggacgt tgacaccaag      3480
tacaacgaaa cctctatggt tcgaaaatta atttgcacgc atcaaagatg tgttttgtcg      3540
cttcatgtca tacggattgt atcatgcttg ctttaaatat tgcattggagt tacacaaacg      3600
aaaaataatt ttagctgtag ttgtatgcat cactttaatt tagcgagga      3649

```

```

<210> 13
<211> 381
<212> ADN
<213> Oryza sativa

```

```

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(381)

```

```

<400> 13
atg cag ctg atg ctc aca ttc tgc acg ggc ccc ctc ctg ttt gcc gtc      48
Met Gln Leu Met Leu Thr Phe Cys Thr Gly Pro Leu Leu Phe Ala Val
1          5          10          15

ctc cta ctg atg gta tac ctc aag caa ctc gcc gcc gcg gcc tgc gtc      96
Leu Leu Leu Met Val Tyr Leu Lys Gln Leu Ala Ala Ala Cys Val
20          25          30

gac gtg ctc atc atc tac ctc tgc cgc ttc ctc ctc ctc cgc ggc atc      144
Asp Val Leu Ile Ile Tyr Leu Cys Arg Phe Leu Leu Leu Arg Gly Ile
35          40          45

atc ttc tcc ggc gac ggc aag cta cga ttc cgc gtc aag gta gcg atc      192
Ile Phe Ser Gly Asp Gly Lys Leu Arg Phe Arg Val Lys Val Ala Ile
50          55          60

ggg ttc ctc tac atc tcc ctc tcg gcc ata ctc ttc tac ctc tct gcc      240
Gly Phe Leu Tyr Ile Ser Leu Ser Ala Ile Leu Phe Tyr Leu Ser Ala
65          70          75          80

gct gtc atg gcg ttg ccg ccg tgg ggt gcg gtg gcc atg tgg gga atg      288
Ala Val Met Ala Leu Pro Pro Trp Gly Ala Val Ala Met Trp Gly Met
85          90          95

gcg ctc gtc gcc act gag ctt ggc tac tcc ttc tta tgc ccg tat agc      336
Ala Leu Val Ala Thr Glu Leu Gly Tyr Ser Phe Leu Cys Pro Tyr Ser
100         105         110

tgc cgc tgc att ggt gaa gac gac gag gag att tcc ccc gtc tga      381
Cys Arg Cys Ile Gly Glu Asp Asp Glu Glu Ile Ser Pro Val
115         120         125

```

```

<210> 14
<211> 126
<212> PRT

```

<213> Oryza sativa

<400> 14

Met Gln Leu Met Leu Thr Phe Cys Thr Gly Pro Leu Leu Phe Ala Val
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Met Val Tyr Leu Lys Gln Leu Ala Ala Ala Ala Cys Val
 20 25 30

Asp Val Leu Ile Ile Tyr Leu Cys Arg Phe Leu Leu Leu Arg Gly Ile
 35 40 45

Ile Phe Ser Gly Asp Gly Lys Leu Arg Phe Arg Val Lys Val Ala Ile
 50 55 60

Gly Phe Leu Tyr Ile Ser Leu Ser Ala Ile Leu Phe Tyr Leu Ser Ala
 65 70 75 80

Ala Val Met Ala Leu Pro Pro Trp Gly Ala Val Ala Met Trp Gly Met
 85 90 95

Ala Leu Val Ala Thr Glu Leu Gly Tyr Ser Phe Leu Cys Pro Tyr Ser
 100 105 110

Cys Arg Cys Ile Gly Glu Asp Asp Glu Glu Ile Ser Pro Val
 115 120 125

<210> 15

<211> 759

<212> ADN

<213> Oryza sativa

<400> 15

atgcagctga tgctcacatt ctgcacgggc cccctcctgt ttgccgtcct cctactgatg 60
 gtatacctca agcaactcgc cgccgcggcc tgcgtcgacg tgctcatcat ctacctctgc 120
 cgcttctctcc tctctcgcgg catcatcttc tccggcgacg gcaagctacg attccgcgtc 180
 aaggtagcga tcgggttcct ctacatctcc ctctcggcca tactcttcta cctctctgcc 240
 gctgtcatgg cgttgccgcc gtgggggtgcg gtggccatgt ggggaatggc gctcgtcgcc 300
 actgagcttg gctactcctt cttatgccg tatagctgcc gctgcattgg tgaagacgac 360
 gaggagattt ccccgctctg aggcccatat atatcacgat ggataaacat attacatact 420
 cctccgttt caaatgttt gacaccattg acttttcagc acatgtttga ccgttcgttt 480
 cattcaaaaa aaattgtgaa atatgtaaaa ctatatgtgt acatggaaat atatttaaca 540
 atgaatcaaa tgatatgaaa agaataaata attacttaaa ttttttgaat aagacgaatg 600
 gtgaaacacg tactaaaaag tcaatggtgt caaacatttt gaaacggagg gagtattaat 660

tggtttgtta gtttgtgttc attcatatat agctgttgta tttttacggt taataaagag 720

aaaccggcga gcgcctagca gccggctagt ttagtcaaa 759

<210> 16

<211> 1193

<212> ADN

<213> Oryza sativa

<400> 16

atgcagctga tgctcacatt ctgcacgggc cccctcctgt ttgccgtcct cctactgatg 60

gtatacctca agcaactcgc cgccgcggcc tgcgtcgacg tgctcatcat ctacctctgc 120

cgtttcctcc tcctccgcgg catcatcttc tccggcgacg gcaagctacg attccgcgtc 180

aaggtagcga tcgggttcct ctacatctcc ctctcgcca tactcttcta cctctctgcc 240

gctgtcatgg cgttgccgcc gtgggggtgcg gtggccatgt ggggaatggc gctcgtcgcc 300

actgagcttg gctactcctt cttatgcccg tatagctgcc gctgcattgg tgaagacgac 360

gaggagattt ccccgctctg aggcccatat atatcacgat ggataaacat attacatact 420

ccctccgttt caaaatgttt gacaccattg acttttcagc acatgtttga ccgttcgttt 480

cattcaaaaa aaattgtgaa atatgtaaaa ctatatgtgt acatggaaat atatttaaca 540

atgaatcaaa tgatatgaaa agaataaata attacttaaa ttttttgaat aagacgaatg 600

gtgaaacacg tactaaaaag tcaatggtgt caaacatttt gaaacggagg gagtattaat 660

tggtttgtta gtttgtgttc attcatatat agctgttgta tttttacggt taataaagag 720

aaaccggcga gcgcctagca gccggctagt ttagtcaaat ttgcactata tgtatgttga 780

tacttgattc atcattcata tcgatcaggg tgtcctagct agctcgtgtt tatatttacg 840

cttgatgtat gttgatactt gatttcatca tccaaatttg cactagctta cgtgttggtc 900

cagtttggtg ggggccatcg tcaaatcacc cttaatttct tgtaccattt tggcacgtac 960

tacacatgta tccctccatc cttgtagttt gattatcact taagtaaagg acgttgacac 1020

caagtacaac gaaacctcta tggttcgaaa attaatttgc atcgatcaaa gatgtgtttt 1080

gtcgtttcat gtcatacggg ttgtatcatg cttgctttta atattgcatg gagttacaca 1140

aacgaaaaat aatttttagct gtagttgtat gcatcacttt aatttagcga gga 1193

<210> 17

<211> 2215

<212> ADN

<213> Oryza sativa

<400> 17

atgcagctga tgctcacatt ctgcacgggc cccctcctgt ttgccgtcct cctactgatg 60

gtatacctca agcaactcgc cgccgcggcc tgcgtcgacg tgctcatcat ctacctctgc 120

cgtttcctcc tcctccgcgg catcatcttc tccggcgacg gcaagctacg attccgcgtc 180

aaggtagcga	tcgggttcct	ctacatctcc	ctctcggcca	tactcttcta	cctctctgcc	240
gctgtcatgg	cgttgccgcc	gtgggggtgcg	gtggccatgt	ggggaatggc	gctcgtcgcc	300
actgagcttg	gctactcctt	cttatgcccg	tatagctgcc	gctgcattgg	tgaagacgac	360
gaggagatth	cccccgctcg	aggcccatat	atatcacgat	ggataaacat	attacatact	420
ccctccgthh	caaaatgthh	gacaccattg	acttttcagc	acatgthtga	ccgttcgthh	480
cattcaaaaa	aaattgtgaa	atatgtaaaa	ctatatgtgt	acatggaaat	atatttaaca	540
atgaatcaaa	tgatatgaaa	agaataaata	attacttaaa	ttttttgaat	aagacgaatg	600
gtgaaacacg	tactaaaaag	tcaatggtgt	caaacatthh	gaaacggagg	gagtattaat	660
tggthtgtta	gtthtgtthc	attcatatat	agctgttgta	tttttacggg	taataaagag	720
aaaccggcga	gcgcctagca	gccggctagt	ttagtcaaat	ttgcactata	tgtatgttga	780
tacttgattc	atcattcata	tcgatcaggg	tgtcctagct	agctcgtgth	tatatttacg	840
cttgatgtat	gttgatactt	gatttcatca	tccaaatthg	cactagctta	cgtgttgthc	900
cagthtgttg	ggggccatcg	tcaaatcacc	cttaatthct	tgtaccatth	tggcacgtac	960
tacacatgta	tccctccatc	cttgtagthh	gattatcact	taagtaaagg	acgttgacac	1020
caagtacaac	gaaacctcta	tggttcgaaa	attaatthgc	atcgatcaaa	gatgtgtthh	1080
gtcgtthcat	gtcatacgga	ttgtatcatg	cttgctthta	atattgcatg	gagttacaca	1140
aacgaaaaat	aatthtagct	gtagttgtat	gcatcactth	aatthtagcga	ggaataatat	1200
ggatctgacc	acgtactacg	cgattctgct	catcgctcag	gtcgtcttcg	ccttcttctt	1260
cctaccgtac	agctgcggca	gcgacgtcgt	ggacgagaat	atcccacatg	tctgaccagg	1320
ggaacgacat	cctctgacga	gagacgtgth	cgctgacacg	tgggctccac	tccccttaaa	1380
ctcacatgtc	agaaattcac	gtcacagagc	atatactcca	tcagtcctat	tatataaggg	1440
ttthtagatg	atgagaagta	ctacgaatat	agataaaaaa	tgtctcgtcg	tttatctaaa	1500
atctthttata	ttthgggaca	gaggaaatat	atgatcaact	tagatcatth	caaaaccaa	1560
acaaaaacta	aaaagcacgg	tgaactthgt	gtgctaccag	acaaaaatth	cctthggthh	1620
gtgttagtta	attacctaag	tgtgattthc	tcatgtcaat	tagttagttg	atccatttg	1680
tcttaaaacta	atthccacgt	tcgcaaataa	agcagcagct	tgctggctag	ctaggccttc	1740
atgttgctca	tgtatgcgca	cttggtcagt	atgatcaatc	aggtcaatth	aattatctta	1800
ttaattatga	tgtatatata	ctccctccgt	cccaaaaaag	tgaatataaa	actgaatgtg	1860
acatatgcat	atccagattc	attgtcacat	ccagtattat	gttggtthh	tatagaacag	1920
agggagtatg	tcacttcaaa	ttgtthtcaa	atctthtaatt	tatttcttct	tatttctcga	1980
gatctacaac	ggaagtaaca	aataaaacct	ctaaaaatga	tcgtaattct	gaaatthaaa	2040
atcgtattat	gtccaagatc	tcgatatact	agccagtact	cgatccttat	ttcataccgt	2100

atgaaatcca aggatcagcc cagcccagac catacagccc accccggccc gcgtacggaa 2160

accaacgggtc tagaatcgct cgaccgaaaa acgccagggtg tcaaccgcac gagct 2215

<210> 18
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> trình tự đoạn mỗi

<400> 18
 aaaaagcctg aactcaccgc g 21

<210> 19
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> trình tự đoạn mỗi

<400> 19
 tactttctaca cagccatcgg t 21

<210> 20
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> trình tự đoạn mỗi

<400> 20
 cacggggcccc ctctgtttg c 21

<210> 21
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> trình tự đoạn mỗi

<400> 21
 cctcgtcgtc ttcaccaatg cag 23

<210> 22
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> trình tự đoạn mỗi

<400> 22
 ctaggtttat tggtgagca atg 23

<210> 23
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> trình tự đoạn mỗi

<400> 23
 tctaactgtc gccgatctgc tg 22

<210> 24
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> trình tự đoạn mỗi

<400> 24
 ttctttcttcc ttctctcttc tac 23

<210> 25
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> trình tự đoạn mỗi

<400> 25
 tcactcgcca tgtctctact tc 22

<210> 26
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> trình tự đoạn mỗi

<400> 26
 aggaaaggtg agaagggat tg 22

<210> 27
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> trình tự đoạn mỗi

<400> 27
 gtttagctcg actttcgacc cag 23

<210> 28
 <211> 23
 <212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự đoạn mỗi

<400> 28

ctgggtcgaa agtcgagcta aac

23

<210> 29

<211> 28

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự đoạn mỗi

<400> 29

ccatcgtgat atatatgggc ctcagacg

28

<210> 30

<211> 22

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự đoạn mỗi

<400> 30

gccatactct tctacctctc tg

22

<210> 31

<211> 25

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự đoạn mỗi

<400> 31

ttattctttt catatcattt gattc

25

<210> 32

<211> 22

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự đoạn mỗi

<400> 32

gtaaaactat atgtgtacat gg

22

<210> 33

<211> 22

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự đoạn mỗi

<400> 33
tcctcgctaa attaaagtga tg

22

<210> 34
<211> 19
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> trình tự đoạn mỗi

<400> 34
ggcatcatct tctccggcg

19

<210> 35
<211> 19
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> trình tự đoạn mỗi

<400> 35
gcagctatac gggcataag

19

<210> 36
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> trình tự đoạn mỗi

<400> 36
ccagtaagtc ctcagccatg

20

<210> 37
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> trình tự đoạn mỗi

<400> 37
tttcagacac catcaaacca g

21

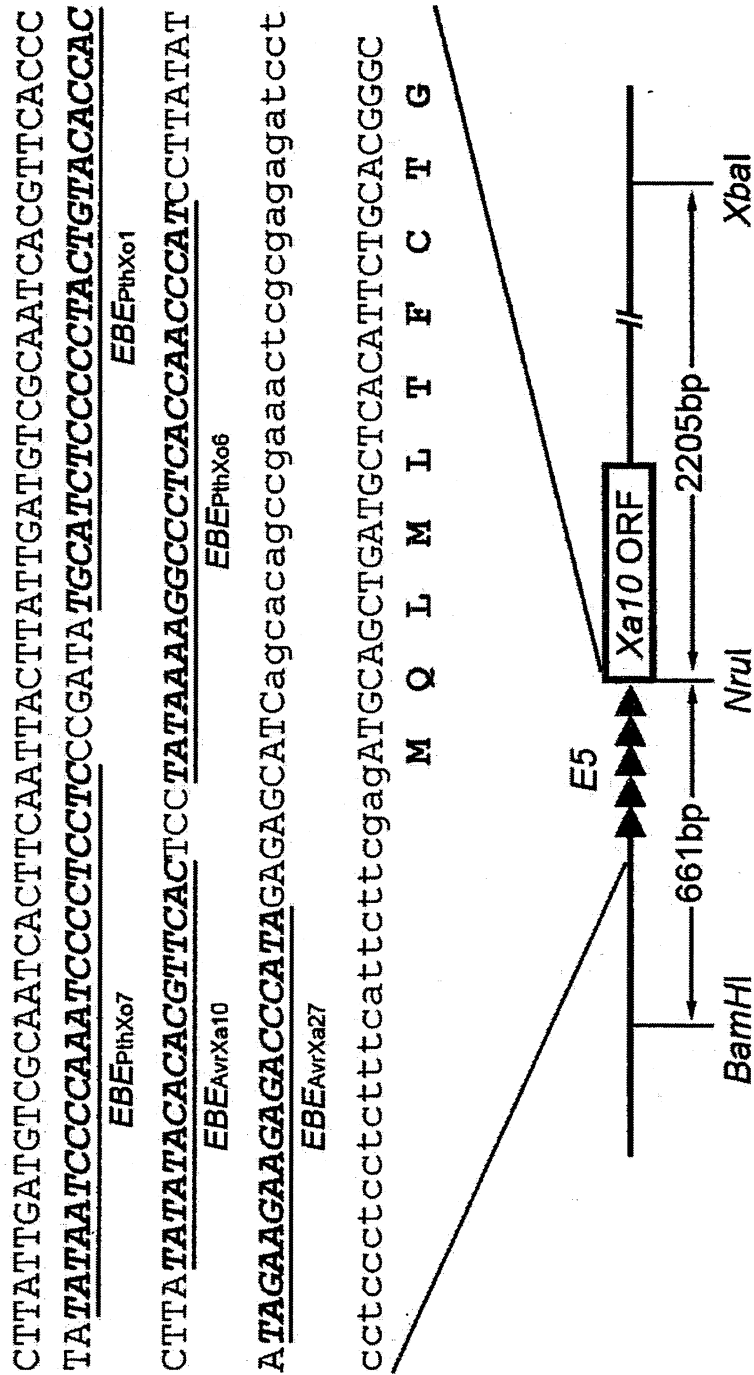


Fig. 1

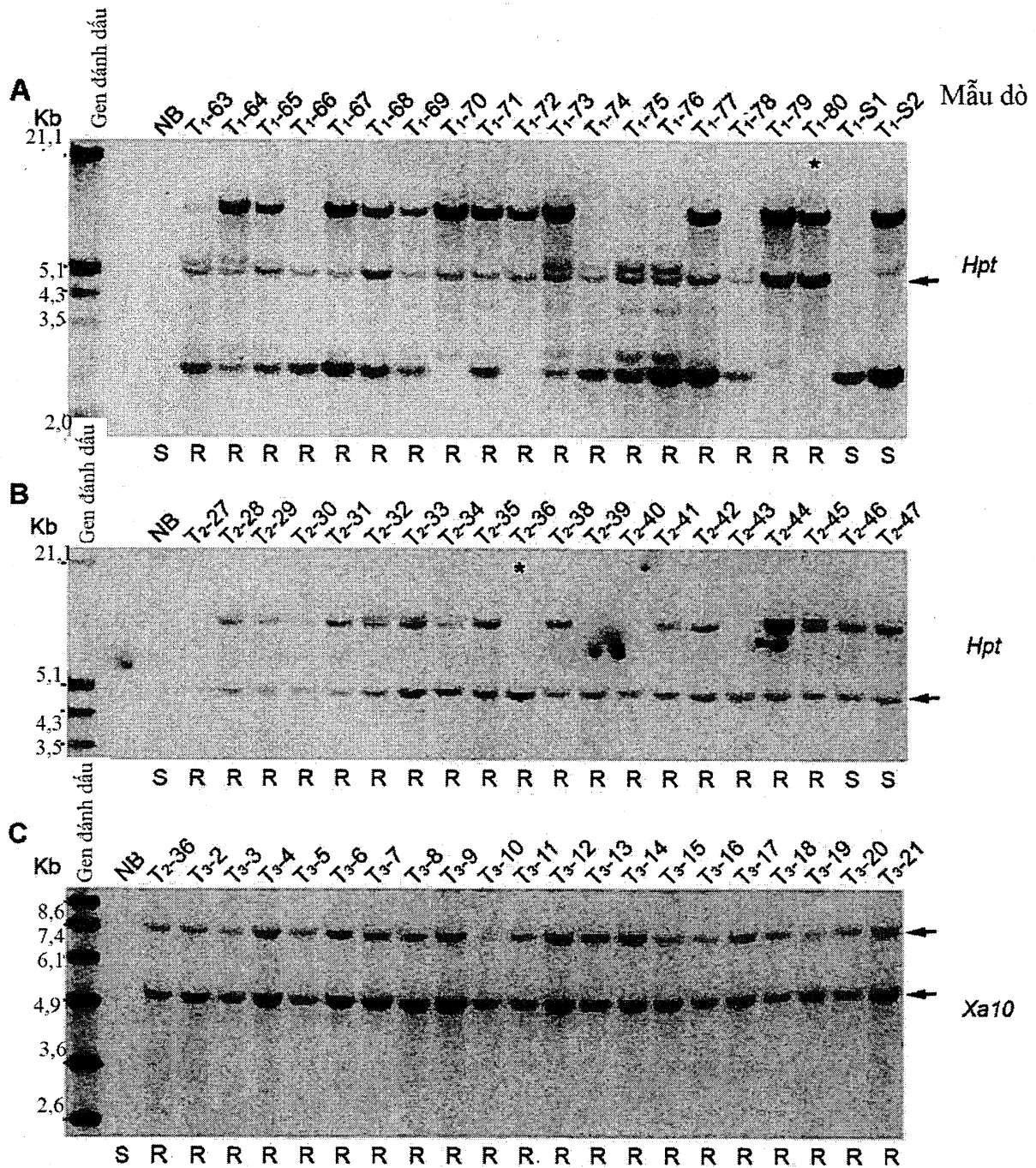


Fig. 2

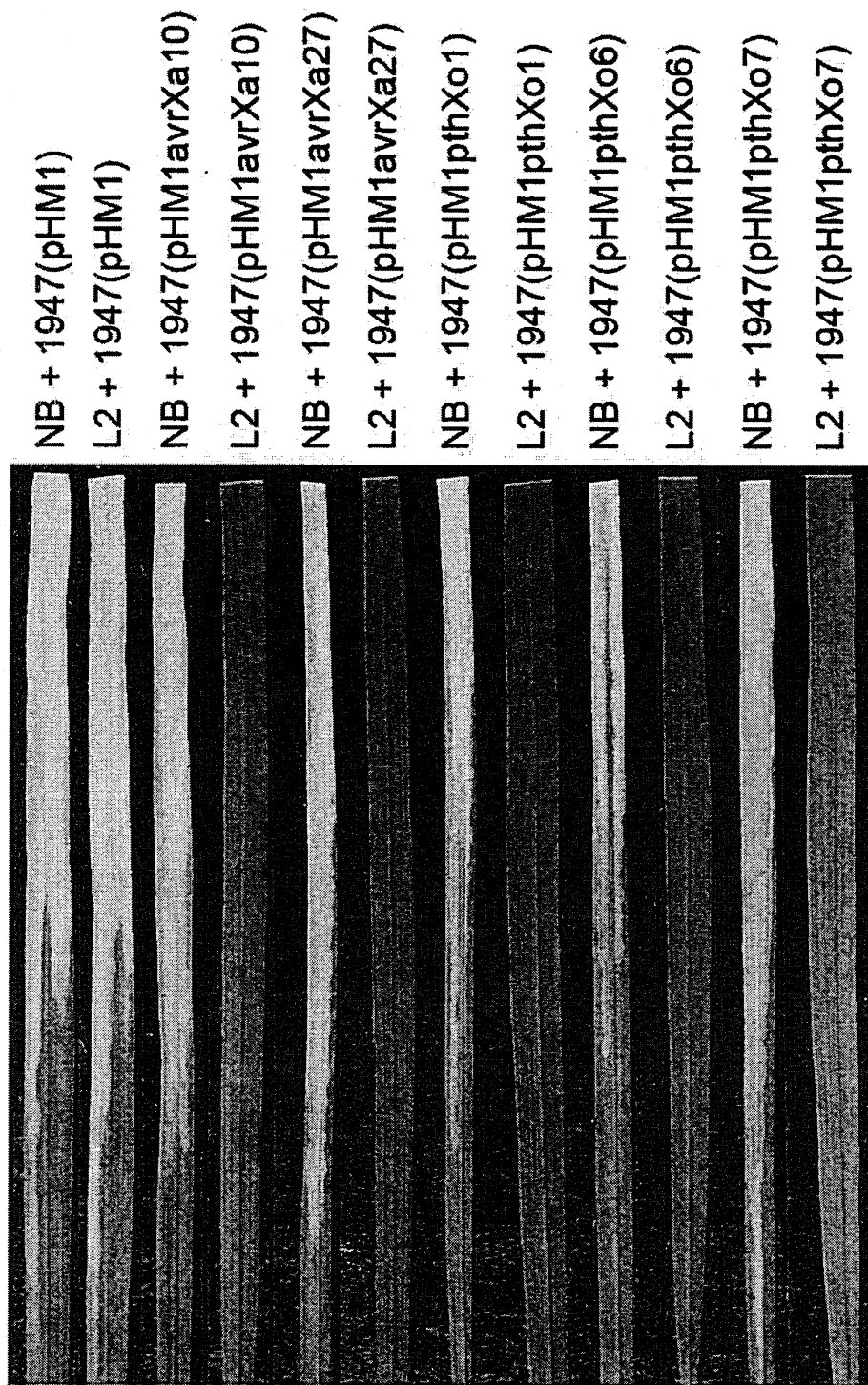


Fig.3

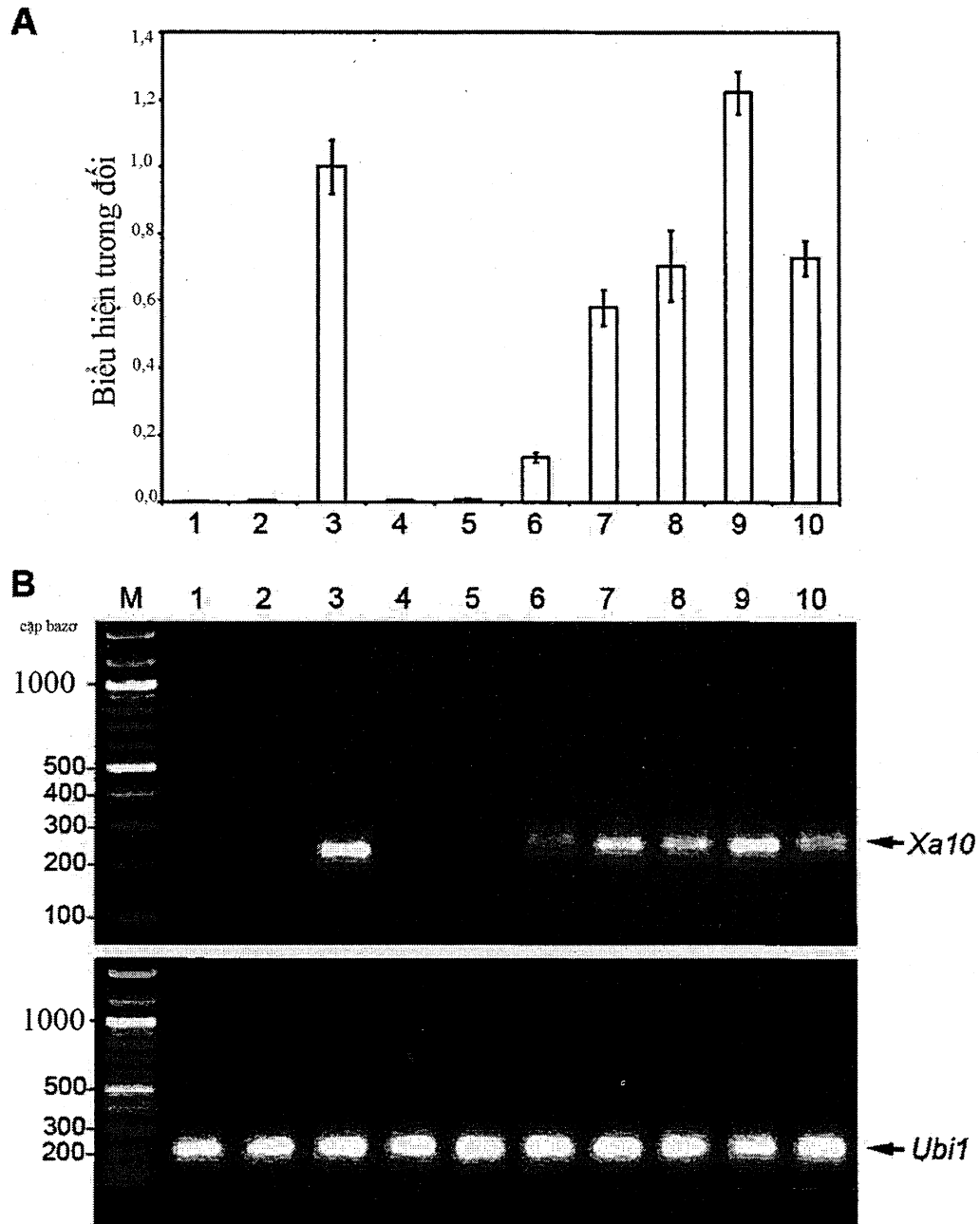


Fig. 4