



(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)



1-0029545

(51)⁷ C12N 15/82

(13) B

(21) 1-2017-00985

(22) 24/08/2016

(86) PCT/JP2016/075375 24/08/2016

(87) WO/2017/038835 09/03/2017

(30) 2015-169817 28/08/2015 JP; 2016-054448 17/03/2016 JP

(45) 25/09/2021 402

(43) 25/07/2018 364A

(73) HONDA MOTOR CO., LTD. (JP)

1-1, Minami-Aoyama 2-chome, Minato-ku, Tokyo, 1078556, Japan

(72) YAMAGUCHI, Asuka (JP); OKUMA, Jiro (JP); KONDO, Yasuhiro (JP); HIROSE, Yoshitsugu (JP).

(74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

(54) PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT THỂ BIẾN NẠP LẠP THỂ

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất thể biến nạp lap thể bao gồm các bước sau; bước (a), trong đó vectơ được chèn vào mô sẹ non của cỏ kê Mỹ bằng phương pháp bắn hạt; và bước (b) trong đó mô sẹ non của cỏ kê Mỹ sau bước (a) được nuôi cấy trong môi trường chứa nitơ nitrit ở nồng độ ức chế sinh trưởng tế bào thực vật thể đại hoặc nồng độ ức chế tái sinh thực vật thể đại, và thể biến nạp lap thể thu được bằng cách chèn gen nitrit reductaza vào bộ gen lap thể được sàng lọc, trong đó vectơ này là vectơ trong đó vùng trnI của trình tự tái tổ hợp tương đồng bộ gen lap thể có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3, vùng khởi đầu rrn và trình tự điều khiển dịch mã T7g10 được liên kết với đoạn nằm sau của nó, gen chỉ thị chọn lọc, vùng kết thúc psbA, vùng khởi đầu psbA, vị trí đa tách dòng, vùng kết thúc rps16, và vùng trnA của trình tự tái tổ hợp tương đồng bộ gen lap thể có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.4 được bố trí từ đầu 5' đến đầu 3' trong vectơ này, và gen chỉ thị chọn lọc là polynucleotit mã hóa gen nitrit reductaza có nguồn gốc từ giống lúa có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất thể biến nạp lap thể, cụ thể hơn sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất thể biến nạp lap thể, trong đó gen ngoại sinh được chèn vào mô thực vật có lap thể biệt hóa, và gen mã hóa protein trung hòa độc tính nitrit, như gen nitrit reductaza được sử dụng làm gen chỉ thị chọn lọc để sàng lọc thể biến nạp.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Lap thể (thể nhiễm sắc) của thực vật là cơ quan chứa sắc tố trong tế bào thực vật, có bộ gen riêng, và tự sinh trưởng. Lục lap là lap thể có đặc tính phân biệt nhất của tế bào thực vật và thực hiện quang hợp, chuyển hóa cacbon, nitơ và lưu huỳnh và các quá trình tương tự. Lục lap chứa các gen mã hóa khoảng 50% protein hòa tan tổng số trong bộ gen lục lap, và có khả năng tổng hợp protein rất cao. Cụ thể, ở thực vật bậc cao, có nhiều lục lap trong tế bào và số lượng bộ gen lục lap nằm trong khoảng từ 5000 đến 10000 tương đương với bộ gen nhân. Khi gen ngoại sinh được chèn vào lục lap có nhiều trong thực vật, do có thể sản sinh nhiều protein mã hóa bởi gen ngoại sinh trong thực vật, nên phương pháp chuyển gen lap thể được xem là phương pháp sản xuất protein giá thành thấp.

Phương pháp chuyển gen lap thể ở thực vật bậc cao được thực hiện bằng cách chèn vector được thiết kế để chèn xen các gen quan tâm và gen chỉ thị chọn lọc kháng được chất nằm giữa các trình tự tương đồng vào bộ gen lap thể. Vector được chèn vào tế bào thực vật bằng phương pháp bắn hạt, sau đó tế bào bao gồm bộ gen lap thể đã chuyển gen bằng phương pháp tái tổ hợp tương đồng được nuôi cấy lặp lại trên môi trường trường sàng lọc chứa được chất chọn lọc, và tế bào bao gồm lap thể đã chuyển gen được sàng lọc. Trong phương pháp này, quần thể tế bào ở trạng thái dị bào chất, trong đó lap thể thể đại và lap thể đã chuyển gen tổ hợp với nhau được biến đổi sang trạng thái đồng bào chất, trong đó toàn bộ các tế bào giữ lại lap thể đã chuyển gen, thực vật được tái sinh từ tế bào chuyển gen đồng bào chất được sàng lọc, do đó thu được phương pháp chuyển gen lap thể thực vật. Tức là, phương pháp chuyển gen lap thể chủ yếu bao gồm bước chuyển gen, trong đó gen ngoại sinh được chèn vào bộ gen lap thể và bước, trong đó tế bào và thực vật chứa bộ gen lap thể đã chuyển gen được sàng lọc.

Phương pháp chuyển gen lap thể ở thực vật bậc cao này đã được thực hiện trên

hiều thực vật. Tuy nhiên, hệ chuyển gen ổn định chỉ được thiết lập ở cây thuốc lá, tức là thực vật hai lá mầm. Trong phương pháp chuyển gen lập thể thuốc lá, gen được chèn vào mảnh mô lá bằng hệ tái sinh từ lục lạp. Lạp thể đã chuyển gen sau khi chèn gen được sàng lọc bằng cách sàng lọc tính kháng spectinomycin sử dụng gen bất hoạt spectinomycin/streptomycin (aminoglycosit-3'-adenyltransferaza; *aadA*) làm gen chỉ thị chọn lọc (Tài liệu phi sáng chế 1), sàng lọc tính kháng kanamycin sử dụng gen kháng kanamycin làm gen chỉ thị chọn lọc (Tài liệu phi sáng chế 2 và 3), sàng lọc tính kháng chất diệt cỏ phosphinothricin sử dụng gen *bar*, hoặc gen tương tự làm gen chỉ thị chọn lọc (Tài liệu phi sáng chế 4).

Mặt khác, phương pháp sàng lọc thành công ở thực vật hai lá mầm đã được sử dụng để sản xuất thể biến nạp lạp thể ở thực vật một lá mầm. Ví dụ, Tài liệu phi sáng chế 5, 6, và 7 đề cập đến phương pháp chuyển gen lạp thể trong mô sẹo (nhóm tế bào khử biệt hóa) của cây lúa được thực hiện bằng cách sàng lọc gen *aadA*/streptomycin hoặc sàng lọc gen *bar*/PPT tương tự như ở cây thuốc lá. Tuy nhiên, theo toàn bộ các tài liệu này sản phẩm thu được là thể biến nạp dị bào chất, và không thu được thể biến nạp đồng bào chất. Hơn nữa, hiệu suất của thể biến nạp này là thấp. Trong khi đó theo Tài liệu sáng chế 1, thể biến nạp lạp thể có thể được sản xuất bằng cách sàng lọc gen *aadA* sử dụng vật liệu chèn gen là cụm chồi ngô, nhưng nguyên lý cụ thể của phương pháp theo tài liệu này là chưa biết rõ.

Theo cách này, khó chuyển gen lạp thể ở thực vật một lá mầm. Nguyên nhân chính là do thực tế phương pháp sàng lọc thành công ở thực vật hai lá mầm không thành công ở thực vật một lá mầm. Do độ nhạy với dược chất và hệ đáp ứng trong tế bào là khác biệt giữa các loài, nên cần cải biến phương pháp sàng lọc đã biết hoặc phát triển hệ sàng lọc thể hệ mới theo các loài đích. Thực tế, do thực vật một lá mầm kháng spectinomycin được sử dụng nhiều trong cây thuốc lá và thực vật tương tự, nên không thể loại bỏ hoàn toàn thể không biến nạp bằng cách sàng lọc gen *aadA*/spectinomycin.

Để sàng lọc hiệu quả thể biến nạp cho thực vật một lá mầm, phương pháp sàng lọc, trong đó một số gen kháng dược chất được sử dụng làm gen chỉ thị chọn lọc để chuyển gen vào nhân đã được phát triển. Phương pháp sàng lọc sử dụng kháng sinh hygromycin và gen kháng hygromycin được sử dụng nhiều nhất. Phương pháp sàng lọc sử dụng chất diệt cỏ phosphinothricin hoặc glyphosat cũng được sử dụng hữu hiệu. Tuy nhiên, do hệ biểu hiện protein nhân thật của bộ gen nhân khác biệt với hệ biểu hiện protein của bộ gen

lập thể nhân sơ, nên hygromycin chỉ hữu hiệu trong hệ nhân thật và không thích hợp để chuyển gen lập thể. Một số phương pháp sàng lọc sử dụng gen kháng được chất được sử dụng để chuyển gen vào nhân có thể được sử dụng để chuyển gen lập thể của thực vật một lá mầm, nhưng tác dụng của phương pháp sàng lọc này bị hạn chế và không ổn định (Tài liệu phi sáng chế 7). Ngoài ra, ở cây lúa, phương pháp chuyển gen nhân sử dụng gen chỉ thị chọn lọc là gen nitrit reductaza được sử dụng làm phương pháp sàng lọc để chuyển gen vào nhân (Tài liệu sáng chế 2 và 8).

Mặt khác, trong số các phương pháp chuyển gen, Tài liệu sáng chế 3 đề cập đến phương pháp tăng cường chèn gen vào lập thể, trong đó gen ngoại sinh được chèn vào mô sẹo có lập thể được biệt hóa và khả năng tái sinh không bị giảm. Trong phương pháp này, mô sẹo non được cảm ứng từ lúa chuyển gen, trong đó yếu tố phiên mã tăng cường phát triển lục lập được biểu hiện quá mức được sử dụng làm vật liệu chèn gen. Phương pháp này có hiệu suất chèn gen cao hơn phương pháp sử dụng vật liệu chèn là lập thể được chèn vào mô sẹo màu trắng vàng nhạt chưa phát triển. Tuy nhiên, trong phương pháp này, cần sản xuất chủng tạo ra mô sẹo non một cách thích hợp bằng cách chuyển gen vào bộ gen nhân trước, và có thể áp dụng cho các thực vật một lá mầm khác hay không là chưa biết ngoài việc tăng số bước phương pháp.

Khi gen nitrit reductaza theo Tài liệu sáng chế 2 và gen tương tự được sử dụng làm gen chỉ thị chọn lọc để chuyển gen nhân, thì có thể tạo ra thể biến nạp nhân của cây lúa với hiệu suất sàng lọc cao. Tuy nhiên, chưa biết phương pháp sàng lọc này có thể áp dụng để chuyển gen lập thể hay không.

Tài liệu viện dẫn

Tài liệu sáng chế 1: Công bố Đơn Patent Mỹ số 2005/0198704.

Tài liệu sáng chế 2: WO2005/012520.

Tài liệu sáng chế 3: Patent Nhật Bản số 5320782.

Tài liệu phi sáng chế 1: Svab and Maliga, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1993, vol. 90, p. 913-917.

Tài liệu phi sáng chế 2: Carrer *et al.*, *Molecular Genetics and Genomics*, 1993, vol. 241, p. 49-56.

Tài liệu phi sáng chế 3: Hunag *et al.*, *Molecular Genetics and Genomics*, 2002, vol.

268, p. 19-27.

Tài liệu phi sáng chế 4: Ye *et al.*, *Plant Physiology*, 2003, vol. 133, p. 402-410.

Tài liệu phi sáng chế 5: Khan and Maliga, *Nature Biotechnology*, 1999, vol. 17, p. 910-915.

Tài liệu phi sáng chế 6: Lee *et al.*, *Molecules and Cells*, 2006, vol. 21, p. 401-410.

Tài liệu phi sáng chế 7: Li *et al.*, *Agricultural Sciences in China*, 2009, vol. 8, p. 643-651.

Tài liệu phi sáng chế 8: Nishimura *et al.*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, vol. 102, p. 11940-11944.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất thể biến nạp lap thể có hiệu suất cao thích hợp cho nhiều loài thực vật rất khó chèn gen, bao gồm thực vật một lá mầm và rất khó sàng lọc thể biến nạp bằng cách sử dụng gen kháng dược chất.

Các tác giả sáng chế đã thực hiện nghiên cứu để giải quyết vấn đề nêu trên và phát hiện thấy rằng khi thể biến nạp lap thể được sản xuất, chứa gen mã hóa protein có chức năng trung hòa độc tính nitrit, như gen nitrit reductaza được chèn làm gen chỉ thị chọn lọc, thì có thể cải thiện đáng kể hiệu suất sàng lọc, và thu được thể biến nạp lap thể của nhiều loài thực vật, bao gồm thực vật một lá mầm với hiệu suất cao, và hoàn thành sáng chế này.

Cụ thể, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất thể biến nạp lap thể, thể biến nạp lap thể, và phương pháp sản xuất protein theo các phương án sau.

1. Phương pháp sản xuất thể biến nạp lap thể, bao gồm các bước sau:

bước (a), trong đó gen mã hóa protein có chức năng trung hòa độc tính nitrit được chèn vào mô thực vật; và

bước (b), trong đó mô thực vật đã chèn gen thu được ở bước (a) được nuôi cấy trong môi trường chứa nito nitrit ở nồng độ ức chế sinh trưởng tế bào thực vật thể đại hoặc nồng độ ức chế tái sinh thực vật thể đại, và thể biến nạp lap thể thu được bằng cách chèn gen vào bộ gen lap thể được sàng lọc.

2. Phương pháp sản xuất thể biến nạp lap thể theo phương án 1, trong đó gen được

chèn vào là gen nitrit reductaza.

3. Phương pháp sản xuất thể biến nạp lap thể theo phương án 1 hoặc 2, trong đó lap thể bao gồm ít nhất một lap thể được chọn từ nhóm bao gồm lục lap, vô sắc lap, lap bột, tiền lục lap, lap dầu, lap đậm, và tiền lap thể.

4. Phương pháp sản xuất thể biến nạp lap thể theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 3, trong đó bước (a) còn bao gồm việc chèn các gen ngoại sinh khác của một hoặc hai hoặc nhiều loài vào mô thực vật.

5. Phương pháp sản xuất thể biến nạp lap thể theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 4, trong đó bước (b) còn bao gồm việc tạo ra thực vật từ thể biến nạp lap thể đã sàng lọc.

6. Thể biến nạp lap thể, chứa gen mã hóa protein có chức năng trung hòa độc tính nitrit được chèn vào bộ gen lap thể.

7. Thể biến nạp lap thể theo phương án 6, trong đó gen được chèn vào là gen nitrit reductaza.

8. Phương pháp sản xuất protein, bao gồm bước thu nhận protein mã hóa bởi gen ngoại sinh từ thể biến nạp lap thể thu được bằng phương pháp sản xuất thể biến nạp lap thể theo phương án 4 hoặc thực vật được tạo ra từ thể biến nạp lap thể.

Phương pháp sản xuất thể biến nạp lap thể theo sáng chế có hiệu suất sàng lọc rất cao. Do đó, có thể tạo ra thể biến nạp lap thể với hiệu suất cao ở cả thực vật hai lá mầm lẫn thực vật một lá mầm. Cụ thể, phương pháp sàng lọc theo sáng chế, trong đó gen mã hóa protein có chức năng trung hòa độc tính nitrit được sử dụng làm gen chỉ thị chọn lọc rất thích hợp để sàng lọc nhiều thực vật.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là hình vẽ thể hiện cấu trúc vector chuyển gen lap thể có nguồn gốc từ cỏ kê Mỹ.

Fig.2A là biểu đồ thể hiện tỷ lệ sinh trưởng mô sẹo của cỏ kê Mỹ ở nồng độ khác nhau của natri nitrit theo ví dụ 1.7.

Fig.2B là biểu đồ thể hiện tỷ lệ tái sinh chồi của cỏ kê Mỹ ở nồng độ khác nhau của natri nitrit theo ví dụ 1.7.

Fig.3 là hình ảnh thể hiện kết quả điện di của sản phẩm khuếch đại PCR thu được trong phản ứng PCR được thực hiện để kiểm chứng việc chèn vectơ chuyển gen vào năm cá thể cỏ kê Mỹ đã nuôi cấy cấp hai theo ví dụ 1.8.

Mô tả chi tiết sáng chế

Phương pháp sản xuất thể biến nạp lap thể theo sáng chế bao gồm bước (a), trong đó gen mã hóa protein có chức năng trung hòa độc tính nitrit được chèn vào mô thực vật, và bước (b), trong đó mô thực vật đã chèn gen thu được ở bước (a) được nuôi cấy trong môi trường chứa nitor nitrit ở nồng độ ức chế sinh trưởng tế bào thực vật thể đại hoặc nồng độ ức chế tái sinh thực vật thể đại, và thể biến nạp lap thể thu được bằng cách chèn gen vào bộ gen lap thể được sàng lọc.

Theo một khía cạnh khác, bước (a) có thể còn bao gồm việc chèn các gen ngoại sinh khác của một hoặc hai hoặc nhiều loài vào mô thực vật; và bước (b) có thể còn bao gồm việc tạo ra thực vật từ thể biến nạp lap thể đã được sàng lọc.

Thuật ngữ “mô thực vật” được dùng trong bản mô tả để chỉ mô thực vật có lap thể hoặc tiền lap thể, bao gồm mô thực vật biệt hóa, mô sẹo biệt hóa cho đến khi lap thể phát triển, và mô sẹo chưa biệt hóa.

Ví dụ về “môi trường chứa nitor nitrit ở nồng độ ức chế sinh trưởng tế bào thực vật thể đại hoặc nồng độ ức chế tái sinh thực vật thể đại” bao gồm môi trường chứa natri nitrit ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,5 đến 2,0g/L, tốt hơn nữa nếu nằm trong khoảng từ 0,8 đến 2,0g/L.

Thuật ngữ “làm trung hòa độc tính nitrit” và “trung hòa độc tính nitrit” có nghĩa là lượng dư nitrit trong thực vật được chuyển hóa, do đó độc tính với tế bào do nitrit được trung hòa.

Trong phương pháp sản xuất thể biến nạp lap thể theo sáng chế, “gen mã hóa protein có chức năng trung hòa độc tính nitrit” (sau đây gọi tắt là “gen trung hòa độc tính nitrit”) được sử dụng làm gen chỉ thị chọn lọc. Trong thực vật, nitrit là chất chuyển hóa trung gian của nitor diễn ra bên trong lap thể và gây độc tế bào. Nhìn chung, do nitrit được chuyển hóa nhanh thành amoniac bởi nitrit reductaza, nên tác dụng gây độc tế bào không xảy ra. Tuy nhiên, khi quá trình nuôi cấy được thực hiện trong các điều kiện có lượng nitrit vượt quá khả năng chuyển hóa riêng của nitrit reductaza, thì quá trình sinh trưởng

mô sẹo và tái sinh thực vật bị ức chế đáng kể. Khi gen trung hòa độc tính nitrit được chèn vào lap thể bằng phương pháp chuyển gen lap thể, thì lượng dư nitrit trong thực vật được chuyển hóa bởi protein trung hòa độc tính nitrit trong thể biến nạp. Do đó, mô thực vật có thể sống sót trong các điều kiện có lượng nitrit vượt quá khả năng chuyển hóa riêng của nitrit reductaza.

Tốt hơn nếu gen trung hòa độc tính nitrit là gen nitrit reductaza. Không có giới hạn cụ thể về gen nitrit reductaza miễn là gen này mã hóa protein có hoạt tính nitrit reductaza. Gen nitrit reductaza có thể có nguồn gốc từ các loài thực vật đóng vai trò là vật chủ hoặc gen nitrit reductaza có thể có nguồn gốc từ các loài sinh vật khác biệt với vật chủ. Ngoài ra, gen nitrit reductaza có thể là gen mã hóa nitrit reductaza tự nhiên chứa trong các sinh vật ban đầu, hoặc có thể là gen mã hóa protein, trong đó nitrit reductaza tự nhiên được cải biến thích hợp. Ví dụ về protein cải biến bao gồm protein, trong đó ít nhất một axit amin được loại bỏ, thay thế hoặc bổ sung mà không làm giảm hoạt tính nitrit reductaza và protein, trong đó nhiều trình tự đánh dấu được bổ sung vào đầu tận cùng N hoặc đầu tận cùng C của nitrit reductaza. Ví dụ về trình tự đánh dấu bao gồm trình tự đánh dấu được sử dụng nhiều để biểu hiện và tinh chế protein tái tổ hợp, như trình tự đánh dấu His, trình tự đánh dấu hemagglutinin (HA), trình tự đánh dấu Myc, và trình tự đánh dấu Flag. Ví dụ về gen mã hóa nitrit reductaza tự nhiên bao gồm gen nitrit reductaza tự nhiên và gen nitrit reductaza có bộ ba mã hóa thoái biến được thay thế bằng bộ ba mã hóa có tần suất sử dụng cao trong thực vật chủ.

Ví dụ cụ thể về gen nitrit reductaza là gen mã hóa ferredoxin-nitrit reductaza (sau đây gọi tắt là “gen NiR”). Ferredoxin-nitrit reductaza là nitrit reductaza sử dụng ferredoxin làm chất nhường điện tử, và biến đổi ion nitrit thành ion amoniac. Ví dụ về gen nitrit reductaza bao gồm gen nitrit reductaza có nguồn gốc từ thực vật một lá mầm, như gen NiR có nguồn gốc từ *Oryza sativa* (D50556.1, Tài liệu phi sáng chế 8), gen NiR có nguồn gốc từ *Zea mays* (EU957616.1, XP_008648080.1, Lahners K. *et al.*, *Plant Physiol.* 1988, vol. 88, p741-746), gen NiR có nguồn gốc từ *Triticum* (FJ527909.1), gen NiR có nguồn gốc từ *Hordeum vulgare* (AK371794.1, S78730.1), và gen NiR có nguồn gốc từ *Sorghum bicolor* (XM_002454557.1); gen nitrit reductaza có nguồn gốc từ thực vật hai lá mầm, như gen nitrit reductaza có nguồn gốc từ *Nicotiana tabacum* (AB093533.1, AB245431.1, Kronenberger J. *et al.*, *Mol. Gen. Gent.*, 1993, vol. 236, p. 203-208.), gen nitrit reductaza có nguồn gốc từ *Arabidopsis thaliana* (NM_127123.2), gen nitrit reductaza có nguồn gốc

từ *Cucumis sativus* (EF397679.1), gen nitrit reductaza có nguồn gốc từ *Solanum tuberosum* (U76701.1), gen nitrit reductaza có nguồn gốc từ *Medicago polymorpha* (XM_003614772.1), gen nitrit reductaza có nguồn gốc từ *Camellia sinensis* (JX987133.1), gen nitrit reductaza có nguồn gốc từ *Pyrus calleryana* (KC545876.1), gen nitrit reductaza có nguồn gốc từ *Prunus persica* (AB061671.1), gen nitrit reductaza có nguồn gốc từ *Selaginella* (XM_002987367.1), và gen nitrit reductaza có nguồn gốc từ *Spinacia oleracea* (Back E. et al., *Mol. Gen. Gent.*, 1988, vol. 212, p. 20-26.); và gen nitrit reductaza có nguồn gốc từ tảo hoặc rêu, như gen nitrit reductaza có nguồn gốc từ *Physcomitrella patens* (XM_001776973.1), gen nitrit reductaza có nguồn gốc từ *Chlamydomonas* (XM_001696735.1), và gen nitrit reductaza có nguồn gốc từ *Chlorella vulgaris* (XM_005844460.1) (các chữ số thể hiện mã truy cập NCBI).

Tốt hơn nếu gen nitrit reductaza được chèn vào mô thực vật ở bước (a) là gen NiR có nguồn gốc từ thực vật họ hòa thảo (*Poaceae*). Ví dụ, gen mã hóa polypeptit có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO:1, hoặc gen có trình tự axit amin, trong đó ít nhất một axit amin của trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO:1 được loại bỏ, thay thế hoặc bổ sung và mã hóa polypeptit có hoạt tính nitrit reductaza.

Thuật ngữ “có hoạt tính nitrit reductaza” có nghĩa là có tác dụng làm giảm nồng độ nitrit trong thực vật đến nồng độ có thể sinh trưởng bình thường.

Thuật ngữ “có hoạt tính nitrit reductaza” có nghĩa là tế bào thực vật có thể sinh trưởng hoặc thực vật có thể tái sinh ngay cả khi quá trình nuôi cấy được thực hiện trên môi trường có nồng độ natri nitrit bằng 0,7g/L hoặc cao hơn.

Gen mã hóa protein làm giảm nồng độ nitrit trong thực vật hoặc protein có chức năng trung hòa độc tính do nitrit có thể được sử dụng làm gen trung hòa độc tính nitrit thay cho gen nitrit reductaza. Ví dụ, trong tế bào thực vật, quá trình khử nitrit thành nitric oxit bởi nitrat reductaza đã biết. Nitrit oxidaza chuyển hóa nitrit thành nitrat có ở một số vi khuẩn. Các enzym này có thể trung hòa trực tiếp độc tính nitrit bằng cách khử lượng dư nitrit tương tự như gen nitrit reductaza. Mặt khác, độc tính với tế bào do nitrit được cho là do nitơ đioxit được tạo ra khi nitrit phản ứng với peroxidaza và hemoglobin cảm ứng oxy hóa hoặc nitrat hóa protein, peroxy hóa lipid màng, đột biến ADN, và các phản ứng tương tự. Do đó, bằng cách điều hòa lượng dư peroxidaza và hemoglobin phản ứng với nitrit hoặc cơ chế của nó, độc tính nitrit có thể được trung hòa gián tiếp. Do đó, gen

mã hóa protein làm giảm lượng dư peroxidaza phản ứng với nitrit, và gen mã hóa protein ức chế nitơ dioxit được tạo ra bởi peroxidaza và hemoglobin từ cảm ứng oxy hóa protein cũng có thể được sử dụng làm gen trung hòa độc tính nitrit.

Cụ thể, “gen trung hòa độc tính nitrit” là ít nhất một gen được chọn từ nhóm bao gồm gen trung hòa trực tiếp độc tính với tế bào do nitrit và gen trung hòa gián tiếp độc tính với tế bào do nitrit.

Ví dụ, ít nhất một gen trung hòa độc tính nitrit được chọn từ nhóm bao gồm gen nitrit reductaza, gen nitrat reductaza, gen nitrit oxidaza, gen mã hóa protein làm giảm lượng dư peroxidaza phản ứng với nitrit, và gen mã hóa protein ức chế nitơ dioxit được tạo ra bởi peroxidaza và hemoglobin từ cảm ứng oxy hóa protein.

Trong phương pháp sản xuất thể biến nạp lập thể theo sáng chế, bước (a) bao gồm việc chèn gen trung hòa độc tính nitrit được sử dụng làm gen chỉ thị chọn lọc của thể biến nạp vào mô thực vật. Cụ thể, bước (a) bao gồm việc chèn vector tích hợp gen trung hòa độc tính nitrit vào mô thực vật.

Không có giới hạn cụ thể về vector tích hợp gen trung hòa độc tính nitrit miễn là gen ngoại sinh này được tích hợp vào vector có thể được biểu hiện bên trong lập thể của mô thực vật. Vector này có thể được sản xuất như sau: vector plasmid pBluescript (do Stratagen cung cấp), vector pUC hoặc vector tương tự được sử dụng làm khung vector. Ở các vị trí đã tách dòng của vector này, hai trình tự đích tái tổ hợp tương đồng liền kề nằm trong bộ gen lập thể được tách dòng. Tiếp theo, cat-xet biểu hiện mang ADN có vùng khởi đầu, vùng điều hòa đầu 5', polynucleotit mã hóa gen trung hòa độc tính nitrit, và ADN có vùng kết thúc được bố trí từ phía trước được tích hợp nằm giữa hai trình tự đích tái tổ hợp tương đồng để thu được vector biểu hiện gen trung hòa độc tính nitrit bên trong lập thể.

Ngoài ra, cat-xet biểu hiện có ít vùng khởi đầu, trong đó vùng khởi đầu không được tích hợp vào đoạn nằm trước của gen trung hòa độc tính nitrit, và vùng khởi đầu của gen nội sinh trong bộ gen lập thể hoặc đoạn nằm sau của nó được sử dụng làm một trình tự đích tái tổ hợp tương đồng, và vùng điều hòa đầu 5', polynucleotit mã hóa gen trung hòa độc tính nitrit, vùng kết thúc, và trình tự đích tái tổ hợp tương đồng của đoạn còn lại lần lượt được bao gồm có thể được tích hợp vào đoạn nằm sau của nó. Do đó, thu được vector biểu hiện gen trung hòa độc tính nitrit bên trong lập thể. Để tích hợp polynucleotit

vào vector biểu hiện, các phương pháp tái tổ hợp gen đã biết và kit tổng hợp vector biểu hiện có bán trên thị trường có thể được sử dụng.

Trong vector, không có giới hạn cụ thể về vùng khởi đầu nằm trước gen trung hòa độc tính nitrit và biểu hiện gen trung hòa độc tính nitrit miễn là vùng khởi đầu này đóng vai trò làm vùng khởi đầu bên trong lặp thể. Tốt hơn nếu vùng khởi đầu này là vùng khởi đầu của sinh vật nhân sơ.

Ví dụ về vùng khởi đầu biểu hiện gen trung hòa độc tính nitrit bên trong lặp thể bao gồm vùng khởi đầu operon phiên mã ARN ribosom (*Prrn*), vùng khởi đầu của gen *psbA* (*PpsbA*) mã hóa protein D1 của hệ quang hóa II, vùng khởi đầu của gen *rbcL* (*PrbcL*) mã hóa tiểu đơn vị mạch dài của ribuloza-1,5-diphosphat carboxylaza.

Ngoài ra, ví dụ về trình tự vùng điều hòa đầu 5' được bổ sung vào đoạn nằm trước của gen trung hòa độc tính nitrit bao gồm vùng không dịch mã đầu 5' của thực khuẩn thể coli T7, vùng không dịch mã đầu 5' của gen *rbcL*, vùng không dịch mã đầu 5' của gen *psbA*, vùng không dịch mã đầu 5' của gen tiểu đơn vị H^+ -ATPaza β (gen *atpB*), trình tự nằm sau bộ ba mã hóa hoạt hóa dịch mã (hộp nằm sau: hộp DB) của gen *psbA*, hộp DB của mảnh độc tính gây bệnh uốn ván C (gen *TetC*), hộp DB của gen mã hóa protein phát huỳnh quang màu xanh (*GFP*), và hộp DB của gen neomycin phosphotransferaza loại II (*NPTII*).

Ở bước (a), vector có thể được chèn vào mô thực vật bằng nhiều phương pháp đã biết trong lĩnh vực này, như phương pháp bắn hạt, phương pháp polyetylen glycol, phương pháp xung điện, phương pháp liposom, phương pháp liposom cation, phương pháp kết tủa canxi phosphat, phương pháp chuyển nhiễm liposom, hoặc phương pháp vi tiêm.

Ở bước (a), không có giới hạn cụ thể về mô thực vật đóng vai trò làm vật liệu chèn gen trung hòa độc tính nitrit miễn là mô này có nguồn gốc từ thực vật. Ví dụ, gen trung hòa độc tính nitrit có thể được chèn vào vật liệu chèn là mô sẹo chưa biệt hóa khi thể biến nạp thực vật được sản xuất. Mô sẹo chưa biệt hóa có thể được sản xuất bằng phương pháp thông thường.

Trong quá trình chuyển gen ở bước (a), mô thực vật có cùng mức độ nhạy cảm với nitrit nito như mô thực vật thể đại có thể được sử dụng làm vật liệu chèn gen trung hòa độc tính nitrit, và không có giới hạn cụ thể về kiểu gen của nó. Tức là, vật liệu chèn có

thể là mô thực vật thể đại hoặc mô thực vật đột biến gen.

Trong quá trình chuyển gen ở bước (a), mô thực vật có lap thể đã phát triển có thể được sử dụng làm vật liệu chèn gen trung hòa độc tính nitri. Lap thể không được phát triển trong mô sẹo chưa biệt hóa và vẫn là tiền lap thể chưa biệt hóa (tức là, lap thể ban đầu). Tuy nhiên, khi mô thực vật có lap thể đã phát triển được sử dụng làm vật liệu chèn, thì có thể cải thiện hiệu suất chuyển gen vào bộ gen lap thể.

Mô thực vật được sử dụng làm vật liệu chèn và có lap thể đã phát triển có thể là mô thực vật biệt hóa hoặc mô sẹo tức là biệt hóa cho đến khi lap thể được phát triển. Để cảm ứng biệt hóa lap thể, điều kiện nuôi cấy mô sẹo có thể được điều chỉnh hoặc hormone thực vật có thể được xử lý. Ví dụ về lap thể bao gồm lap bột, lục lap, tiền lục lap, lap dầu, lap đậm, lap sắc, vô sắc lap, và tiền lap thể. Theo sáng chế, tốt hơn nếu ít nhất một lap thể được chọn từ nhóm bao gồm lục lap, lap bột, tiền lục lap, vô sắc lap, và tiền lap thể, và tốt hơn nữa nếu ít nhất một lap thể được chọn từ nhóm bao gồm tiền lap thể và lục lap.

Ví dụ, khi lap thể là lục lap, các mảnh lá hoặc thân của thực vật có thể được sử dụng làm vật liệu chèn, quá trình biệt hóa lục lap có thể được cảm ứng từ mô sẹo non hoặc mô sẹo có cụm chồi. Trong mô sẹo non, tiền lap thể trong mô sẹo được cảm ứng biệt hóa thành lục lap. Ngoài ra, trong cụm chồi, mô sẹo được biệt hóa và mô có cụm chồi tích tụ được tạo ra. Mô sẹo non hoặc cụm chồi có thể được cảm ứng từ mô sẹo khi mô sẹo được nuôi cấy trên môi trường có nồng độ cân bằng của hormone thực vật góp phần biệt hóa và khử biệt khóa, như auxin và xytokinin được điều chỉnh. Ví dụ, nồng độ của auxin trong môi trường nuôi cấy mô sẹo được giảm và nồng độ của xytokinin được tăng, quá trình hình thành lục lap được cảm ứng và thu được mô sẹo non. Ngoài ra, cụm chồi có thể thu được bằng cách nuôi cấy mô sẹo trên môi trường chỉ chứa xytokinin ở nồng độ thấp từ môi trường nuôi cấy mô sẹo.

Ví dụ về mô sẹo cảm ứng biệt hóa lục lap bao gồm mô sẹo thu được bằng cách khử biệt hóa tế bào mô chứa lượng lớn lục lap của lá hoặc mô sẹo (mô sẹo có nguồn gốc từ mô không có màu xanh) thu được bằng cách khử biệt hóa tế bào mô không có màu xanh, như hạt trưởng thành, phôi chưa trưởng thành, và rễ có thể được sử dụng. Mô sẹo có thể được tạo ra bởi phương pháp thông thường, ví dụ, nuôi cấy mô thực vật trên môi trường chứa hormone thực vật, như auxin và xytokinin.

Mô thực vật có lập thể đã phát triển có thể thu được bằng cách biểu hiện quá mức gen mã hóa protein tăng cường biệt hóa lập thể trong mô sẹo. Ngoài ra, mô sẹo có nguồn gốc từ thể biến nạp, trong đó gen mã hóa protein tăng cường biệt hóa lập thể được biểu hiện quá mức có thể được cảm ứng và biệt hóa để tạo thành lập thể. Ví dụ về gen mã hóa protein cảm ứng biệt hóa bao gồm gen GLK đóng vai trò là yếu tố phiên mã (Rossini et al., *Plant Cell*, 2001, vol. 13, p. 1231-1244.) và gen CES 101 của *Arabidopsis thaliana* (họ RLK: Niwa et al., *Plant Cell Physiology*, 2006, vol. 47, p. 319-331.) (Tài liệu sáng chế 3). Gen mã hóa protein tăng cường biệt hóa lập thể có thể được chèn vào mô sẹo hoặc thực vật bằng phương pháp chuyển gen thực vật thông thường.

Bước (b) bao gồm việc sàng lọc tế bào đã chuyển gen lập thể (được gọi là thể biến nạp lập thể) thu được bằng cách chèn gen trung hòa độc tính nitrit vào bộ gen lập thể bằng cách nuôi cấy mô thực vật đã chèn gen trung hòa độc tính nitrit ở bước (a) trên môi trường chứa ít nhất một nitrit nito có nồng độ ức chế sinh trưởng của tế bào thực vật thể đại hoặc nồng độ ức chế tái sinh thực vật thể đại.

Hơn nữa, bước (b) có thể bao gồm việc tạo ra thực vật từ thể biến nạp lập thể đã được sàng lọc.

Ngoài ra, tốt hơn nếu nồng độ ức chế sinh trưởng tế bào thực vật thể đại hoặc nồng độ của nitrit nito ức chế tái sinh thực vật thể đại trên môi trường bằng 0,5g/L hoặc cao hơn, và tốt hơn nữa nếu bằng 0,8g/L hoặc cao hơn.

Trong thực vật, trước tiên nito nitrat hấp thu từ môi trường được khử thành nitrit bởi nitrat reductaza trong tế bào chất. Nitrit nito độc tính thu được được tích hợp vào lập thể, sau đó chuyển hóa nhanh thành amoniac bởi protein mã hóa bởi gen trung hòa độc tính nitrit là nitrit reductaza, và sử dụng để sinh trưởng tế bào và tái sinh thực vật dưới dạng nguồn nito. Khi thực vật được nuôi cấy trên môi trường chứa lượng dư nitrit, tế bào chỉ chứa lập thể thể đại bị chết do độc tính của nitrit tức là gây ra bởi các chất chuyển hóa nitrit tích tụ. Mặt khác, trong tế bào chứa lập thể đã tích hợp cat-xet biểu hiện quá mức gen trung hòa độc tính nitrit bằng phương pháp chuyển gen lập thể, do quá trình chuyển hóa nitrit được hoạt hóa, nên tế bào có thể sinh trưởng và thực vật có thể tái sinh. Tức là, ở bước (b), mặc dù thể biến nạp lập thể thu được bằng cách chèn gen trung hòa độc tính nitrit vào bộ gen lập thể có thể sinh trưởng hoặc biệt hóa, sự sinh trưởng của thể không biến nạp bị ức chế và cuối cùng thể không biến nạp bị chết.

Hệ chuyển hóa nitrit, trong đó nitor nitrat hấp thu từ môi trường được khử thành nitrit bởi nitrat reductaza, sau đó nitrit nitor thu được được chuyển hóa nhanh thành amoniac bởi protein mã hóa bởi gen trung hòa độc tính nitrit-bên trong lập thể là hệ chuyển hóa có ở hầu hết các thực vật (Krapp A. *Current Opinion in Plant Biology*, 2015, vol. 25, p. 115-122.). Tức là, phương pháp sản xuất thể biến nạp lập thể theo sáng chế, trong đó gen trung hòa độc tính nitrit được sử dụng làm gen chỉ thị chọn lọc có thể được thực hiện trên nhiều thực vật. Thực tế, trong nhiều loài thực vật có gen nitrit reductaza là gen NiR, gen nitrat reductaza có trong nhiều thực vật, ví dụ, *Oryza sativa* (X15819.1, Hamat HB et al., *Mol. Gen. Gent.*, 1989, vol. 218, p. 93-98.), *Zea mays* (NM_001305856.1, Morrison KM. et al., *Physiologia Plantarum*, 2010, vol. 140, p. 334-341.), *Hordeum vulgare* (X57844.1, Schnorr KM et al., *Mol. Gen. Gent.*, 1991, vol. 227, p. 411-416.), *Sorghum bicolor* (XM_002444445.1), *Setaria italic* (XM_004973598.2), *Brachypodium distachyon* (XM_003570500.2), *Nicotiana tabacum* (AB245431.1), *Arabidopsis thaliana* (J03240.1, Crawford NM. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1988, vol. 85, p. 5006-5010.), *Capsella rubella* (XM_006300626.1), *Brassica napus* (D38220.1), *Camelina* (XM_010473671.1), castor oil plant (AF314093.1), *Beta vulgaris ssp.* (EU163265.1), *Raphanus sativus var. sativus* (KM272859.1), *Daucus carota subsp* (HQ402930.1), *Glycine max* (NM_001251221.1, Wu S., et al., *Plant Mol. Biol.*, 1995, vol. 29, p. 491-506.), *Phaseolus vulgaris* (XM_007141046.1), *Fragaria* (XM_004300392.2), *Medicago polymorpha* (HQ840748.1), *Solanum lycopersicum* (XM_004250307.2), *Solanum tuberosum* (NM_001288022.1), *Cucumis sativus L.* (HM755943.1), *Cucumis melo* (XM_008462231.1), *Cucurbita* (M33154.1), *Spinacia oleracea* (M32600.1), *Sesamum indicum* (XM_011099324.1), *Gossypium spp* (XM_012612465.1), *Nelumbo nucifera* (XM_010247609.1), *Vitis vinifera* (JF796047.1), *Amygdalus persica* (AB061670.1), *Citrus unshiu* (XM_006434048.1), *Pyrus calleryana* (KC545876.1), *Theobroma cacao* (XM_007018888.1), *Elaeis guineensis* (XM_010910909.1), *Phoenix dactylifera* (XM_008796303.1), *Jatropha curcas* (XM_012222767.1), *Populus* (XM_011013830.1), *Eucalyptus* (XM_010065034.1), *Betula platyphylla* (X54097.1), *Tilia platyphyllos* (AY138811.1), *Morus alba* (KF992020.1), *Musa acuminata* (XM_009419369.1), *Physcomitrella patens* (AB231618.1), *Chlorella* (U39930.1), *Volvox* (XM_002955110.1), và *Dunaliella salina* (KC108654.1).

Thực vật có thể được tạo ra từ tế bào đã chuyển gen nạp thể được sàng lọc ở bước (b). Cụ thể, tế bào đã chuyển gen nạp thể được sàng lọc (thể biến nạp lặp thể) được cấy chuyển trên môi trường chứa nitrit có nồng độ cân bằng của hormon tăng cường tái sinh được điều chỉnh, và nuôi cấy trong điều kiện chiếu sáng. Do đó, thực vật được tạo ra.

Trong phương pháp sản xuất thể biến nạp lặp thể theo sáng chế, ở bước (a), các gen ngoại sinh khác của một hoặc hai hoặc nhiều loài cũng được chèn vào mô thực vật ngoài gen trung hòa độc tính nitrit. Theo đó, có thể tạo ra thể biến nạp được chèn gen trung hòa độc tính nitrit và các gen ngoại sinh khác. Ví dụ, khi cat-xet biểu hiện mã hóa các gen ngoại sinh khác và cat-xet biểu hiện mã hóa gen trung hòa độc tính nitrit được tích hợp vào cùng vectơ, có thể tạo ra thể biến nạp lặp thể, trong đó cả hai gen trung hòa độc tính nitrit và gen ngoại sinh khác được tích hợp vào bộ gen lặp thể. Không có giới hạn cụ thể về gen ngoại sinh khác, và tốt hơn nếu gen ngoại sinh khác là gen cấu trúc, và tốt hơn nữa nếu gen ngoại sinh khác là gen cấu trúc mã hóa protein hữu ích làm được chất hoặc nguyên liệu công nghiệp.

Ví dụ về gen ngoại sinh bao gồm xenluloza.

Khi thể biến nạp đã chèn gen trung hòa độc tính nitrit và gen ngoại sinh được sinh trưởng và tăng sinh, thì thu được thể biến nạp trong đó protein mã hóa bởi gen ngoại sinh được biểu hiện và tích tụ bên trong lặp thể của thể biến nạp. Do đó, khi protein mã hóa bởi gen ngoại sinh được thu nhận từ thể biến nạp, có thể tạo ra một số protein. Thể biến nạp có thể sinh trưởng và tăng sinh tương tự như thực vật chủ trước khi chuyển gen. Ngoài ra, protein có thể được thu nhận từ thể biến nạp bằng cùng phương pháp như khi protein đặc trưng được thu nhận từ mô thực vật thông thường theo đặc tính của protein. Ví dụ, thể biến nạp được phân giải, sau đó đồng nhất hóa, dịch chiết mô thu được được phân đoạn bằng phương pháp sắc ký hoặc phương pháp tương tự, và phân đoạn chứa protein đích được cô có thể được thu hồi.

Tức là, theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất protein. Phương pháp này bao gồm bước, trong đó các gen ngoại sinh khác của một hoặc hai hoặc nhiều loài được chèn vào mô thực vật cùng với gen mã hóa protein có chức năng trung hòa độc tính nitrit; bước, trong đó mô thực vật đã chèn gen trung hòa độc tính nitrit được nuôi cấy trên môi trường chứa ít nhất một nitrit nito có nồng độ ức chế sinh trưởng của tế bào thực vật thể đại hoặc nồng độ ức chế tái sinh thực vật thể đại, và thể biến nạp

lập thể thu được bằng cách chèn gen vào bộ gen lập thể được sàng lọc; bước, trong đó thực vật được tạo ra từ thể biến nạp lập thể đã được sàng lọc; và bước, trong đó protein mã hóa bởi gen ngoại sinh được thu nhận từ thực vật.

Cụ thể, tốt hơn nếu phương pháp sản xuất thể biến nạp lập thể theo sáng chế được sử dụng để sản xuất thể biến nạp lập thể của thực vật một lá mầm khó chuyển gen và sàng lọc thể biến nạp. Phương pháp này được sử dụng để sản xuất thể biến nạp lập thể của thực vật *Poaceae*, như lúa, lúa miến, ngô, lúa mỳ, lúa mạch, yến mạch, bo bo, cỏ kê Mỹ, cỏ hắc mạch, cỏ hắc mạch lâu năm, cỏ đuôi mèo, cỏ đuôi trâu, kê, kê đuôi cáo, mía đường, và kê ngọc trai. Ví dụ, trong thực vật sinh khối lớn của thực vật sinh trưởng nhanh, như thực vật họ hòa thảo (*Poaceae*), khi gen mã hóa protein hữu ích được tích hợp vào bộ gen lập thể, thì thu được thể biến nạp lập thể sản sinh protein hữu ích trên quy mô lớn.

Ví dụ, trong thể biến nạp lập thể của cây lúa, gen nitrit reductaza được chèn vào bộ gen lập thể bằng cách sử dụng phương pháp tái tổ hợp tương đồng trong ADN bộ gen lập thể của cây lúa, sau đó nuôi cấy trên môi trường chứa nitrit để sàng lọc. Theo đó, thể biến nạp lập thể của cây lúa có thể thu được. Khi gen nitrit reductaza được chèn vào bộ gen lập thể của cây lúa, thì gen nitrit reductaza có nguồn gốc từ giống lúa Kasalath được sử dụng trong ví dụ sau có thể được sử dụng. Quá trình tái tổ hợp tương đồng ADN bộ gen lập thể có thể được thực hiện bằng phương pháp mô tả trong Tài liệu sáng chế 3. Ví dụ, vector tức là nằm xen giữa các vùng tái tổ hợp tương đồng đích của ADN bộ gen lập thể của cây lúa và tích hợp gen nitrit reductaza có thể được chèn vào mô sẹo của cây lúa hoặc mô sẹo, trong đó lập thể được biệt hóa. Không có giới hạn cụ thể về phần ADN bộ gen lập thể tích hợp gen nitrit reductaza, tốt hơn nếu được chèn nằm giữa gen trnI và gen trnA. Ngoài ra, để sàng lọc thể biến nạp tích hợp gen nitrit reductaza, tương tự như Tài liệu sáng chế 2, tốt hơn nếu quá trình nuôi cấy được thực hiện trên môi trường có nồng độ nitrit ức chế sinh trưởng hoặc tái sinh thực vật, như cây lúa thể đại.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn thông qua các ví dụ sau. Tuy nhiên, sáng chế không chỉ giới hạn ở các ví dụ này.

Ví dụ 1.

1. Sản xuất chủng cỏ kê Mỹ tái sinh

Vỏ lụa của hạt trưởng thành của giống cỏ kê Mỹ “Alamo” được loại bỏ bằng xử lý bề mặt 60% (thể tích/thể tích), và chất diệt nấm dùng cho hạt được sử dụng để vô trùng. Các hạt đã vô trùng tiếp tục được vô trùng bề mặt bằng axit hypoclorơ, và duy trì trên môi trường cảm ứng mô sẹo (môi trường PVC: Muối MS và vitamin, 30g/L maltoza, 22,6 μ M axit 2,4-điclophenoxaxetic, 4,4 μ M BAP, 2,5mM MES, 3g/L gôm gelatin, độ pH = 5,7). Các hạt được nuôi cấy trong vài tháng trong bóng tối ở nhiệt độ 28°C. Sau đó, các mô sẹo sinh trưởng được phân loại thành các chủng độc lập đối với mỗi hạt thu được. Các chủng, trong đó khối mô sẹo có khả năng tái sinh đã sinh trưởng được chọn lọc và nuôi cấy. Ngoài ra, khối mô sẹo của các chủng được chọn được duy trì trên môi trường tái sinh (môi trường PVS: Muối MS và vitamin, 30g/L maltoza, 1,4 μ M Gibberelin A₃, 2,5mM MES, 3g/L gôm gelatin, pH 5,7) và nuôi cấy trong 4 tuần trong điều kiện ánh sáng ở nhiệt độ 28°C, sau đó khả năng tái sinh của cỏ kê Mỹ được kiểm chứng. Mô sẹo của các chủng được kiểm chứng có khả năng tái sinh cao được nuôi cấy cấp hai và sinh trưởng làm vật liệu thử nghiệm.

2. Sàng lọc các được chất chọn lọc

Để phát triển phương pháp sàng lọc thích hợp để chuyển gen lặp thể, mô sẹo của các chủng tái sinh được sản xuất trong phần 1 nêu trên được sử dụng để đánh giá độ nhạy cảm của tế bào cỏ kê Mỹ thể đại với nhiều được chất. Độ nhạy cảm của tế bào với các được chất được kiểm chứng mô sẹo cỏ kê Mỹ có sinh trưởng hay không khi nuôi cấy trên môi trường PVC chứa nồng độ được chất khác nhau. Hơn nữa, đối với một số được chất, mô sẹo cỏ kê Mỹ được duy trì trên môi trường PVS chứa nồng độ được chất khác nhau, và tác dụng ức chế tái sinh cỏ kê Mỹ cũng được kiểm chứng.

Bảng 1 thể hiện kết quả đánh giá độ nhạy cảm. Trong bảng 1, “A” có nghĩa là quá trình sinh trưởng mô sẹo và tái sinh cỏ kê Mỹ bị ức chế, “B” có nghĩa là quá trình sinh trưởng mô sẹo và tái sinh cỏ kê Mỹ không bị ức chế, và “-” có nghĩa là thử nghiệm không được thực hiện.

Bảng 1

Được chất	Sinh trưởng mô sẹo	Tái sinh chồi	Sinh trưởng mô sẹo	Tái sinh chồi
	Nồng độ thử nghiệm	Nồng độ ức chế sinh trưởng	Nồng độ thử nghiệm	Nồng độ ức chế tái sinh
Sectinomycin	0 đến 800mg/L	B	0 đến 800mg/L	B
Streptomycin	0 đến 800mg/L	B	0 đến 800mg/L	A (>400mg/L)
G418	0 đến 100mg/L	A (>25mg/L)	0 đến 100mg/L	A (>25mg/L)
Kanamycin	0 đến 200mg/L	A (>200mg/L)	0 đến 300mg/L	A (>100mg/L)

Gentamicin	0 đến 100mg/L	B	-	-
Neomycin	0 đến 100mg/L	B	-	-
Ribostamycin	0 đến 100mg/L	B	-	-
Paromomycin	0 đến 100mg/L	B	-	-
Cloramphenicol	0 đến 45mg/L	A (>30mg/L)	0 đến 50mg/L	A (>15mg/L)
Tetracycline	0 đến 60mg/L	A (>40mg/L)	0 đến 100mg/L	A (>60mg/L)
Troleandomycin	0 đến 200mg/L	B	0 đến 200mg/L	B
Erythromycin	0 đến 200mg/L	B	0 đến 200mg/L	B
Bleocin	0 đến 75mg/L	A (>25mg/L)	0 đến 25mg/L	A (>10mg/L)
Zeocin	0 đến 1000mg/L	B	0 đến 10mg/L	B
Bleomycin	0 đến 30mg/L	B	-	-
Puromycin	0 đến 100mg/L	B	-	-
Glyphosat	0 đến 2mM	A (>0,1mM)	0 đến 2mM	A (>0,1mM)
Fluazifop-butyl	0 đến 10µM	A (>1,0µM)	0 đến 10µM	A (>0,1µM)
Xycloxydim	0 đến 10µM	A (>1,5µM)	0 đến 2µM	A (>0,1µM)
Clethodim	0 đến 2µM	B	-	-
Clodinafop	0 đến 2µM	A (>1,0µM)	-	-
Sethoxydim	0 đến 2µM	B	-	-
Haloxypop	0 đến 2µM	A (>1,0µM)	-	-
Fosfomycin	0 đến 75µM	B	-	-
Pinoxaden	0 đến 2µM	A (>1,0µM)	-	-
Metylviologen	0 đến 50µM	A (>1,0µM)	0 đến 7µM	A (>1,0µM)
Butafenacil	0 đến 0,5µM	B	-	-
Natri nitrit	0 đến 1000µM	A (>800mg/L)	0 đến 1000mg/L	A (>800mg/L)

3. Tổng hợp vector chuyển gen lặp thể, trong đó nhiều gen kháng được chất được sử dụng làm gen chỉ thị chọn lọc.

Các vector chuyển gen lặp thể chứa gen kháng kanamycin, cloramphenicol, bleomycin, xycloxydim, fluazifop-butyl, và natri nitrit có tác dụng ức chế tăng sinh tế bào bình thường được kiểm chứng trong phần 2 nêu trên được sử dụng làm gen chỉ thị chọn lọc được sản xuất. Cụ thể, AphA-6 (gen kháng kanamycin), CAT (gen kháng cloramphenicol), Ble (gen kháng bleomycin), mCT (gen kháng xycloxydim và fluazifop-butyl: vùng CT đột biến của enzym ACCaza), và PSR1 (vùng không bao gồm peptit tín hiệu của đoạn kết thúc đầu 5' từ ADN bổ sung của gen nitrit reductaza có nguồn gốc từ giống lúa Kasalath) (SEQ ID NO.2) được sử dụng làm gen chỉ thị chọn lọc. Gen chỉ thị chọn lọc được phân lập hoặc tổng hợp nhân tạo bằng phương pháp PCR được sử dụng. Vùng tái tổ hợp tương đồng với bộ gen lặp thể, vùng kết thúc và trình tự điều khiển dịch mã được chọn lọc và thiết kế để biểu hiện mạnh protein ngoại sinh đã biết (Daniell et al., *Methods in Molecular Biology*, 2005, Vol,286, p,111-138; Verma and Daniell, *Plant Physiology*, 2007, Vol,145, p,1129-1143). Các trình tự thành phần được khuếch đại bằng phương pháp PCR và liên kết bằng trình tự enzym giới hạn, hoặc phương pháp dung hợp trong khung (Clontech), do đó vector được sản xuất.

Fig.1 là hình vẽ thể hiện vector cấu trúc chuyển gen lặp thể. Trong Fig.1, “HR1” là trình tự tái tổ hợp tương đồng bộ gen lặp thể (vùng trnI) (SEQ ID NO.3), “HR2” là trình tự tái tổ hợp tương đồng bộ gen lặp thể (vùng trnA) (SEQ ID NO.4), “P1” là vùng khởi đầu rrn và trình tự điều khiển dịch mã (T7g10) được liên kết với đoạn nằm sau của nó, “SM” là gen chỉ thị chọn lọc, “T₁” là vùng kết thúc psBA, “P2” là vùng khởi đầu psBA, “MCS” là vị trí đa tách dòng để chèn một số gen, và “T₂” là vùng kết thúc rps16.

4. Sản xuất mô sẹo non và cụm chồi

Mô sẹo non và cụm chồi được sản xuất từ chủng cỏ kê Mỹ tái sinh sản xuất trong phần 1 nêu trên.

Cụ thể, trong số các mô sẹo được sản xuất và nuôi cấy cấp hai trong phần 1 nêu trên, các mô sẹo được nuôi cấy trong 3 đến 4 tuần sau khi nuôi cấy cấp hai được duy trì trên môi trường cảm ứng cụm chồi và mô sẹo non (môi trường ML1R3: Ahmadabadi et al., (2007) *Transgenic Research*, vol,16, p,437-448), và nuôi cấy trong khoảng 4 tuần trong điều kiện ánh sáng ở nhiệt độ 28°C để thu được mô sẹo non và cụm chồi.

5. Chèn gen vào lặp thể của cỏ kê Mỹ và sàng lọc tế bào chuyển gen

Vector chuyển gen lặp thể được sản xuất trong phần 3 nêu trên được chèn vào mô sẹo non của cỏ kê Mỹ và cụm chồi và tế bào chuyển gen được sàng lọc. Mô sẹo nuôi cấy cấp hai trước khi cảm ứng thành mô sẹo non được sử dụng làm nhóm đối chứng để so sánh hiệu suất chèn gen.

Trước tiên, mô sẹo non và cụm chồi của cỏ kê Mỹ được sản xuất trong phần 4 nêu trên được cắt bằng dao thành mảnh mô có kích cỡ khoảng 2mm, và nằm trong vòng tròn có đường kính bằng 35mm ở phần trung tâm của môi trường PVC. Một cách riêng biệt, vector chuyển gen lặp thể được sản xuất trong phần 3 nêu trên được tinh chế bằng kit Hispeed Plasmid Midi (do QIAGEN cung cấp) và bao bằng hạt vàng có kích cỡ 0,6µm. Vector chuyển gen lặp thể được bao bằng hạt vàng được chèn vào mảnh mô nằm trong môi trường PVC bằng phương pháp bắn hạt. Dung dịch hạt vàng bao ADN và quá trình chèn gen bằng phương pháp bắn hạt được điều chỉnh bằng phương pháp mô tả trong tài liệu Okuzaki et al. (Okuzaki and Tabei, *Plant Biotechnology*, 2012, vol. 29, p. 307-310).

Mô sau khi chèn gen được cấy trải nhiều lần trên môi trường PVC, và nuôi cấy trong 4 đến 7 ngày trong bóng tối ở nhiệt độ 28°C. Mô sau khi chèn gen và nuôi cấy được

nuôi cấy thêm trong các điều kiện sàng lọc được thể hiện trong Bảng 2 đối với mỗi loại vectơ chuyển gen lặp thể, và lặp thể đã chuyển gen và tế bào chứa lặp thể đã chuyển gen được sàng lọc. Mô sau khi sàng lọc nuôi cấy được duy trì trên môi trường PVS chứa các dược chất chọn lọc khác nhau và quá trình tái sinh cỏ kê Mỹ được cảm ứng trong điều kiện ánh sáng ở nhiệt độ 28°C.

Bảng 2

Gen chỉ thị có thể chọn lọc	Dược chất có thể chọn lọc	Nồng độ dược chất có thể chọn lọc
AphA-6	Kanamycin	100 đến 200mg/L
CAT	Cloramphenicol	15 đến 30mg/L
Ble	Bleomycin	5 đến 75mg/L
mCT	Xycloxydim	0,5 đến 2,0µM
	Fluazifop-butyl	
PSR1	Natri nitrit	800 đến 1000mg/L

6. Kiểm chứng chèn gen

Sau khi sàng lọc nuôi cấy, mảnh mô có kích cỡ khoảng 2mm được lấy mẫu từ cỏ kê Mỹ tái sinh. Dựa trên sự có mặt của các mảnh ADN khuếch đại sử dụng cặp mồi khuếch đại đặc hiệu các mảnh vectơ chuyển gen bằng kit PCR Phire Plant Direct (do Thermo Fisher Scientific cung cấp), vectơ chuyển gen chèn vào được kiểm chứng. Sau khi thu nhận và tinh chế, các mảnh ADN khuếch đại được giải trình tự và các mảnh này được kiểm chứng là các mảnh ADN đích. Các cỏ kê Mỹ này được kiểm chứng là thể biến nạp lặp thể đích.

Ngoài ra, Bảng 3 thể hiện số lượng đĩa môi trường được kiểm chứng chèn gen bằng nhiều phương pháp sàng lọc và số lượng chủng biến nạp, trong đó vectơ chuyển gen chèn vào được kiểm chứng. Khi phương pháp sàng lọc bằng natri nitrit không được sử dụng, thì ở toàn bộ các cỏ kê Mỹ tái sinh sau khi sàng lọc, các mảnh ADN khuếch đại có nguồn gốc từ vectơ chuyển gen không được kiểm chứng và không thu được thể biến nạp lặp thể. Mặt khác, khi phương pháp sàng lọc bằng natri nitrit được sử dụng, thì thu được thể biến nạp lặp thể của 15 chủng từ 48 đĩa bằng cách chuyển gen vào mô sẹo trước khi cảm ứng mô sẹo non, và thể biến nạp lặp thể của 5 chủng từ 12 đĩa bằng cách chuyển gen vào mô sẹo non và cụm chồi. Các kết quả này cho thấy rằng khi phương pháp sàng lọc bằng natri nitrit, trong đó gen nitrit reductaza được sử dụng làm gen chỉ thị chọn lọc được sử dụng, thì có thể thu được thể biến nạp lặp thể hữu hiệu, và đặc biệt thu được thể biến nạp lặp thể rất hữu hiệu bằng cách chèn gen vào mô sẹo non và cụm chồi.

Bảng 3

Dược chất có thể chọn lọc	Mô chèn gen	Số lượng đĩa thử nghiệm	Số lượng chủng kiểm chứng chèn gen
Kanamycin	Mô sẹo	11	0
	Mô sẹo non và cụm chồi	16	0
Cloramphenicol	Mô sẹo	39	0
	Mô sẹo non và cụm chồi	53	0
Bleomycin	Mô sẹo	24	0
	Mô sẹo non và cụm chồi	4	0
Xycloxydim, fluazifop-butyl	Mô sẹo	24	0
	Mô sẹo non và cụm chồi	10	0
Natri nitrit	Mô sẹo	48	15
	Mô sẹo non và cụm chồi	12	5

7. Nghiên cứu chi tiết điều kiện phương pháp sàng lọc bằng natri nitrit

Trong phương pháp sàng lọc bằng natri nitrit, để xác định nồng độ sàng lọc hiệu quả hơn, cỏ kê Mỹ thể đại được nuôi cấy ở nồng độ khác nhau của natri nitrit, và độ nhạy cảm của tế bào thể đại với natri nitrit được đánh giá.

Cụ thể, khối gồm 14 mô sẹo cỏ kê Mỹ được duy trì trên mỗi đĩa trong môi trường PVC và môi trường PVS chứa natri nitrit ở nồng độ bằng 0g/L, 0,25g/L, 0,5g/L, 0,6g/L, 0,7g/L, 0,8g/L, 0,9g/L, hoặc 1,0g/L, và ba đĩa của mỗi môi trường được chuẩn bị cho mỗi điều kiện nồng độ. Môi trường PVC được nuôi cấy trong bóng tối ở nhiệt độ 28°C và môi trường PVS được nuôi cấy trong ánh sáng ở nhiệt độ 28°C trong 4 tuần. Sau khi nuôi cấy, số lượng của các mô sẹo sinh trưởng được xác định trên môi trường PVC, và số lượng các mô sẹo từ đó cỏ kê Mỹ tái sinh được xác định trên môi trường PVS. Tỷ lệ sinh trưởng và tỷ lệ tái sinh được tính toán.

Fig.2A là biểu đồ thể hiện tỷ lệ mô sẹo sinh trưởng ở nồng độ khác nhau của natri nitrit. Fig.2B là biểu đồ thể hiện tỷ lệ cỏ kê Mỹ tái sinh ở nồng độ khác nhau của natri nitrit. Mô sẹo sinh trưởng trên môi trường PVC đã giảm mạnh ở nồng độ natri nitrit bằng 0,7g/L và bị ức chế hoàn toàn ở nồng độ natri nitrit bằng 0,9g/L hoặc cao hơn (Fig.2A). Mặt khác, cỏ kê Mỹ tái sinh trong môi trường PVS đã giảm mạnh ở nồng độ natri nitrit bằng 0,8g/L và bị ức chế hoàn toàn ở nồng độ natri nitrit bằng 1,0g/L (Fig.2B). Các kết quả này cho thấy rằng tốt hơn nếu nồng độ của natri nitrit để sàng lọc tế bào cỏ kê Mỹ chuyển gen bằng 0,8g/L hoặc cao hơn.

8. Duy trì gen chèn thu được bằng phương pháp sàng lọc bằng natri nitrit

Cỏ kê Mỹ tái sinh được sàng lọc bằng phương pháp sàng lọc bằng natri nitrit, và các mảnh gen chèn được khuếch đại bằng phương pháp PCR trong phần 6 nêu trên được kiểm chứng được cấy chuyển và bắt đầu tạo rễ trên môi trường MS (1/2. Muối MS và vitamin, 15g/L sucroza, 2,5mM MES, 3g/L gồm gelatin, độ pH = 5,7) chứa natri nitrit ở nồng độ bằng 0,8g/L. Sau đó, mẫu được nuôi cấy cấp hai trên môi trường MS mới chứa natri nitrit ở nồng độ bằng 0,8g/L trong 1 đến 2 tháng. Chồi rễ được sản xuất từ quá trình nuôi cấy cấp hai được phân tách và nuôi cấy cấp hai theo cùng chủng. Sau khoảng 1 năm, phương pháp PCR được thực hiện trên năm cá thể cỏ kê Mỹ từ các chủng tương tự như phần 6 nêu trên. Do đó, các mảnh ADN khuếch đại được kiểm chứng ở một cá thể, và các gen chèn được duy trì ổn định được kiểm chứng. Fig.3 là hình ảnh thể hiện kết quả điện di sản phẩm khuếch đại PCR. Trên Fig.3, băng được đánh dấu bằng mũi tên thể hiện các mảnh ADN khuếch đại, và "C" là làn, trong đó mẫu đối chứng dương (sản phẩm PCR thu được bằng cách sử dụng khuôn là vector chuyển gen lap thể) được điện di.

Ví dụ 2

1. Chèn gen vào lap thể của cây lúa và sàng lọc tế bào chuyển gen

Gen PSR1 được chèn vào lap thể của giống lúa Nipponbare và giống lúa Koshihikari và thể biến nạp được sàng lọc bằng cách sử dụng natri nitrit. Cụ thể, phương pháp này được thực hiện như sau. Môi trường MS-NK (Nishimura et al., *Nature Protocols*, 2006, Vol,1, p,2796-2802) được sử dụng làm môi trường tái sinh chứa nitrát ban đầu. Giống lúa thể đại Nipponbare có khả năng tái sinh trong môi trường MS-NK chứa natri nitrit ở nồng độ bằng 400mg/L. Tuy nhiên, giống lúa thể đại Koshihikari không tái sinh ngay cả trong môi trường MS-NK có hoạt tính nitrit reductaza yếu và không bổ sung natri nitrit.

Các mô sẹo có nguồn gốc từ túi phôi theo quá trình nuôi cấy hạt giống lúa trưởng thành được cảm ứng và tổng hợp bằng phương pháp đã biết. Mô sẹo thu được có kích cỡ khoảng 2mm được bố trí trong vòng tròn có đường kính khoảng 35mm ở phần tâm của môi trường N6D (Nishimura et al., *Nature Protocols*, 2006, vol. 1, p. 2796-2802) và sử dụng làm vật liệu chèn gen. Tương tự như cỏ kê Mỹ theo ví dụ 1.5, dung dịch hạt vàng bao ADN được điều chế và chèn vào mô sẹo. Mô sẹo sau khi chèn gen được cấy trải nhiều lần trên môi trường N6D và nuôi cấy trong 3 đến 9 ngày trong bóng tối ở nhiệt độ

29,5°C. Sau đó, các mô sẹo có nguồn gốc từ giống lúa Nipponbare được cấy chuyển sang môi trường MS-NK chứa natri nitrit ở nồng độ nằm trong khoảng từ 800 đến 1000mg/L và các mô sẹo có nguồn gốc từ giống lúa Koshihikari được cấy chuyển sang môi trường MS-NK chứa natri nitrit ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0 đến 400mg/L, và quá trình tái sinh các cây lúa được cảm ứng trong điều kiện ánh sáng ở nhiệt độ 29,5°C. Mảnh mô có kích cỡ khoảng 2mm được lấy mẫu từ các cá thể lúa tái sinh thu được, và các mảnh ADN đích chèn vào được kiểm chứng bằng phương pháp PCR tương tự như cỏ kê Mỹ.

Bảng 4

Giống thử nghiệm	Số lượng đĩa thử nghiệm	Số lượng chủng kiểm chứng chèn gen
Nipponbare	1	38
Koshihikari	2	49

Bảng 4 thể hiện số lượng đĩa môi trường được kiểm chứng chèn gen và số lượng chủng biến nạp, trong đó vector chuyển gen chèn vào được kiểm chứng. Trong cả hai giống lúa, gen được chèn với hiệu suất cao hơn cỏ kê Mỹ.

Khả năng ứng dụng trong công nghiệp

Phương pháp sản xuất thể biến nạp lập thể theo sáng chế có hiệu suất sàng lọc rất cao, và tạo ra thể biến nạp lập thể với hiệu suất cao ở cả thực vật hai lá mầm lẫn thực vật một lá mầm, do đó rất hữu ích trong công nghiệp.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp sản xuất thể biến nạp lap thể, bao gồm các bước sau:

bước (a), trong đó vector được chèn vào mô sẹo non của cỏ kê Mỹ bằng phương pháp bắn hạt; và

bước (b) trong đó mô sẹo non của cỏ kê Mỹ sau bước (a) được nuôi cấy trong môi trường chứa nitơ nitrit ở nồng độ ức chế sinh trưởng tế bào thực vật thể đại hoặc nồng độ ức chế tái sinh thực vật thể đại, và thể biến nạp lap thể thu được bằng cách chèn gen nitrit reductaza vào bộ gen lap thể được sàng lọc,

trong đó vector này là vector trong đó vùng trnl của trình tự tái tổ hợp tương đồng bộ gen lap thể có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3, vùng khởi đầu rrn và trình tự điều khiển dịch mã T7g10 được liên kết với đoạn nằm sau của nó, gen chỉ thị chọn lọc, vùng kết thúc psbA, vùng khởi đầu psbA, vị trí đa tách dòng, vùng kết thúc rps16, và vùng trnA của trình tự tái tổ hợp tương đồng bộ gen lap thể có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.4 được bố trí từ đầu 5' đến đầu 3' trong vector này, và

gen chỉ thị chọn lọc là polynucleotit mã hóa gen nitrit reductaza có nguồn gốc từ giống lúa có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2.

2. Phương pháp sản xuất thể biến nạp lap thể theo điểm 1, trong đó lap thể bao gồm ít nhất một lap thể được chọn từ nhóm bao gồm lục lap, vô sắc lap, lap bột, tiền lục lap, lap đầu, lap đậm, và tiền lap thể.

3. Phương pháp sản xuất thể biến nạp lap thể theo điểm 1 hoặc 2, trong đó vector này còn tạo điều kiện cho các gen ngoại sinh khác của một hoặc hai hoặc nhiều loài được biểu hiện trong lap thể này.

4. Phương pháp sản xuất thể biến nạp lap thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1, 2 và 3, trong đó bước (b) còn bao gồm việc tạo ra thực vật từ thể biến nạp lap thể đã sàng lọc.



Fig.1

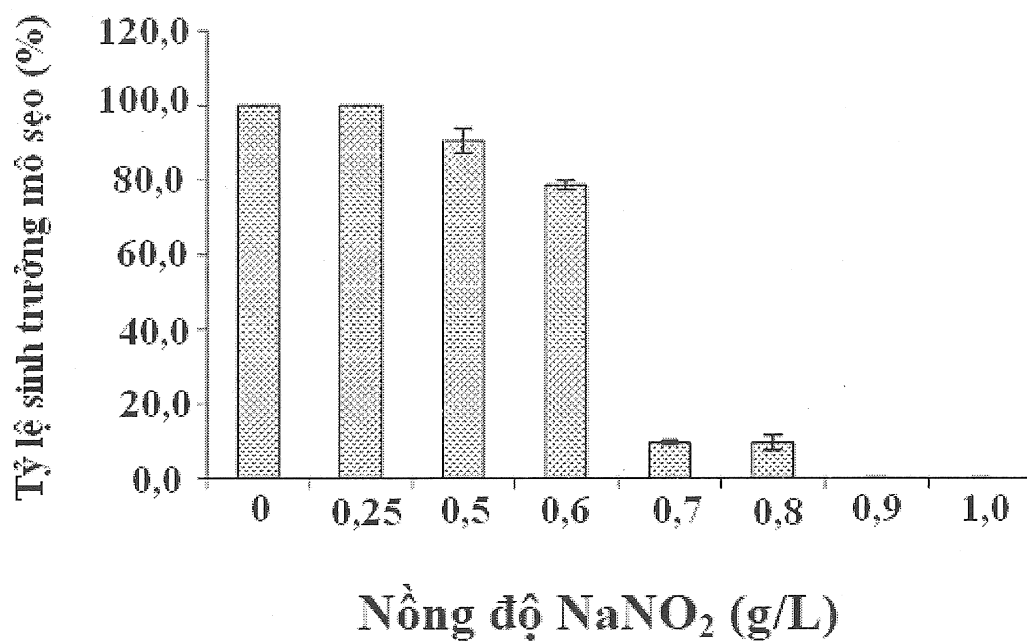
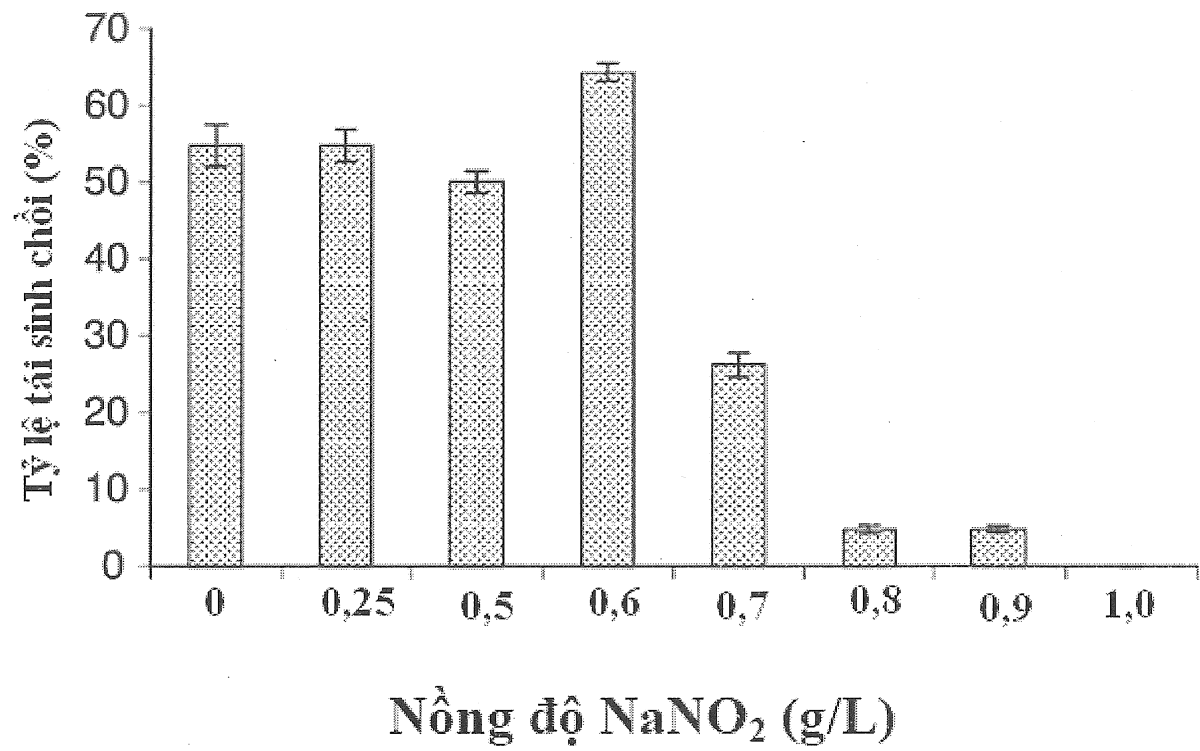
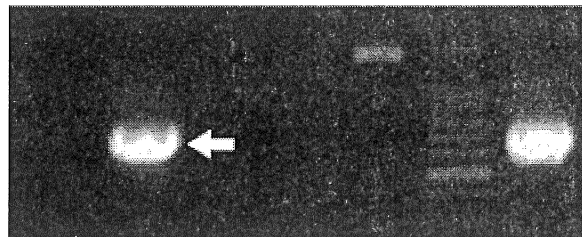


Fig.2A

**Fig.2B**

C

Fig.3

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> HONDA MOTOR CO., LTD.

<120> PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT THẺ BIẾN NẠP LẠP THẺ

<130> H114343802

<160> 4

<210> 1

<211> 567

<212> PRT

<213> Oryza sativa

<220>

<223> PSR1

<400> 1

```

Met Pro Val Gln Ser Ser Thr Val Ser Ala Pro Ser Ser Ser Thr Pro
1      5      10      15
Ala Ala Asp Glu Ala Val Ser Ala Glu Arg Leu Glu Pro Arg Val Glu
20     25     30
Gln Arg Glu Gly Arg Tyr Trp Val Leu Lys Glu Lys Tyr Arg Thr Gly
35     40     45
Leu Asn Pro Gln Glu Lys Val Lys Leu Gly Lys Glu Pro Met Ser Leu
50     55     60
Phe Met Glu Gly Gly Ile Lys Glu Leu Ala Lys Met Pro Met Glu Glu
65     70     75     80
Ile Glu Ala Asp Lys Leu Ser Lys Glu Asp Ile Asp Val Arg Leu Lys
85     90     95
Trp Leu Gly Leu Phe His Arg Arg Lys His Gln Tyr Gly Arg Phe Met
100    105    110
Met Arg Leu Lys Leu Pro Asn Gly Val Thr Thr Ser Glu Gln Thr Arg
115    120    125
Tyr Leu Ala Ser Val Ile Glu Ala Tyr Gly Lys Glu Gly Cys Ala Asp
130    135    140
Val Thr Thr Arg Gln Asn Trp Gln Ile Arg Gly Val Thr Leu Pro Asp
145    150    155    160
Val Pro Ala Ile Leu Asp Gly Leu Asn Ala Val Gly Leu Thr Ser Leu
165    170    175
Gln Ser Gly Met Asp Asn Val Arg Asn Pro Val Gly Asn Pro Leu Ala
180    185    190
Gly Ile Asp Pro Asp Glu Ile Val Asp Thr Arg Ser Tyr Thr Asn Leu
195    200    205
Leu Ser Ser Tyr Ile Thr Ser Asn Phe Gln Gly Asn Pro Thr Ile Thr
210    215    220
Asn Leu Pro Arg Lys Trp Asn Val Cys Val Ile Gly Ser His Asp Leu
225    230    235    240
Tyr Glu His Pro His Ile Asn Asp Leu Ala Tyr Met Pro Ala Val Lys
245    250    255
Gly Gly Lys Phe Gly Phe Asn Leu Leu Val Gly Gly Phe Ile Ser Pro
260    265    270
Lys Arg Trp Glu Glu Ala Leu Pro Leu Asp Ala Trp Val Pro Gly Asp
275    280    285
Asp Ile Ile Pro Val Cys Lys Ala Val Leu Glu Ala Tyr Arg Asp Leu
290    295    300
Gly Thr Arg Gly Asn Arg Gln Lys Thr Arg Met Met Trp Leu Ile Asp
305    310    315    320
Glu Leu Gly Met Glu Ala Phe Arg Ser Glu Val Glu Lys Arg Met Pro
325    330    335
Asn Gly Val Leu Glu Arg Ala Ala Pro Asp Asp Leu Ile Asp Lys Lys
340    345    350
Trp Gln Arg Arg Asp Tyr Leu Gly Val His Pro Gln Lys Gln Glu Gly
355    360    365
Met Ser Tyr Val Gly Leu His Val Pro Val Gly Arg Val Gln Ala Ala
370    375    380
Asp Met Phe Glu Leu Ala Arg Leu Ala Asp Glu Tyr Gly Ser Gly Glu
385    390    395    400
Leu Arg Leu Thr Val Glu Gln Asn Ile Val Ile Pro Asn Val Lys Asn
405    410    415
Glu Lys Val Glu Ala Leu Leu Ala Glu Pro Leu Leu Gln Lys Phe Ser
420    425    430
Pro Gln Pro Ser Leu Leu Lys Gly Leu Val Ala Cys Thr Gly Asn
435    440    445
Gln Phe Cys Gly Gln Ala Ile Ile Glu Thr Lys Gln Arg Ala Leu Leu
450    455    460
Val Thr Ser Gln Val Glu Lys Leu Val Ser Val Pro Arg Ala Val Arg
465    470    475    480
Met His Trp Thr Gly Cys Pro Asn Ser Cys Gly Gln Val Gln Val Ala
485    490    495
Asp Ile Gly Phe Met Gly Cys Leu Thr Lys Asp Ser Ala Gly Lys Ile
500    505    510
Val Glu Ala Ala Asp Ile Phe Val Gly Gly Arg Val Gly Ser Asp Ser
515    520    525

```

His Leu Ala Gly Ala Tyr Lys Lys Ser Val Pro Cys Asp Glu Leu Ala
 530 535 540
 Pro Ile Val Ala Asp Ile Leu Val Glu Arg Phe Gly Ala Val Arg Arg
 545 550 555 560
 Glu Arg Glu Glu Asp Glu Glu
 565

<210> 2
 <211> 1704
 <212> ADN
 <213> Oryza stiva
 <220>
 <223> PSR1
 <400> 2

atgcccgtgc	agtcgtcgac	ggtgtccgca	ccgtcctcct	cgactccggc	ggcggacgag	60
gccgtgtcgg	cggagcggct	ggagcccgcg	gtggagcagc	gggagggccg	gtactgggtg	120
ctcaaggaga	agtaccggac	ggggctgaac	ccgcaggaga	aggtgaagct	ggggaaggag	180
cccattgcat	tggttcatgga	gggcggcatc	aaggagctcg	ccaagatgcc	catggaggag	240
atcgaggccg	acaagctctc	caaggaggac	atcgacgtgc	ggctcaagtg	gctcggcctc	300
ttccaccgcc	gcaaaccatca	gtatgggchg	ttcatgatgc	ggctgaagct	gccaaacggt	360
gtgacgacga	gcgagcagac	gaggtacctg	gcgagcgtga	tcgaggcgta	cggcaaggag	420
ggctgcgcgg	acgtgcacca	ccgccagaac	tggcagatcc	gcggcgatcc	gctccccgac	480
gtgccggcca	tcctcgacgg	gctcaacgcc	gtcggcctca	ccagcctcca	gagcggcatg	540
gacaacgtcc	gcaaccccg	cggcaacccg	ctcgcggcca	tcgaccccca	cgagatcgct	600
gacacgcgat	cctacacca	cctcctctcc	tcctacatca	ccagcaactt	ccaggccaac	660
cccaccatca	ccaacctgcc	gaggaagtgg	aacgtgtgcy	tgatcgggtc	gcacgatctg	720
tacgagcacc	cgcacatcaa	cgacctcgcg	tacatgccgg	cggatgaagg	cggcaagtcc	780
gggttcaacc	tccttgtcgg	cgggttcctc	agccccaaga	gggtgggagg	ggcgctgcgg	840
ctggagcgct	gggtccccgg	cgacgacatc	atcccggtgt	gcaaggccgt	tcctcgaggcg	900
taccgcgacc	tcggcaccag	gggcaaccgc	cagaagaccc	gcacgatgtg	gctcatcgac	960
gaacttgga	tggaggcttt	tcggtcggag	gtggagaaga	ggatgccgaa	cggcggtgctg	1020
gagcgcgctg	cgccggacga	cctcatcgac	aagaaatggc	agaggaggga	ctacctcggc	1080
gtgcaccgcg	agaagcagga	agggatgtcc	tacgtcggcc	tgacgtgccc	cgtcggccgg	1140
gtgcaggcgg	cggacatggt	cgagctcgcc	cgccctggcg	acgagtatgg	ctccggcgag	1200
ctccgcctca	ccgtggagca	gaacatcgct	atcccgaacg	tcaagaacga	gaagggtggag	1260
gcgctgctcg	ccgagccgct	gcttcagaag	ttctccccgc	agccgtcgct	gctgctcaag	1320
ggcctggctg	cgtgcaccgg	caaccagttc	tgcggccagg	ccatcatcga	gacgaagcag	1380
cgggcgctcg	tggtgacgtg	cgaggtggag	aagctcgtgt	cggtgccccg	gcgggtgcgg	1440
atgcactgga	ccggctgccc	caacagctgc	ggccaggtgc	aggtcgccga	catcggcttc	1500
atgggctgcc	tcaccaagga	tagcggccgg	aagatcgctg	aggcgcccca	catcttcgct	1560
ggcggccgcg	tcggcagcga	ctcgcacctc	gcccggcgct	acaagaagtc	cgtgcctgtg	1620
gacgagctgg	cgccgatcgt	cgccgacatc	ctggtcgagc	ggttcggggc	cgtgcggagg	1680
gagagggagg	aggacgagga	gtag				1704

<210> 3
 <211> 2127
 <212> ADN
 <213> Panicum virgatum
 <220>
 <223> HR1
 <400> 3

gcactctgct	gggcccacac	tgacactgag	agacgaaagc	taggggagca	aatgggatta	60
gagaccccag	tagtcctagc	cgtaaacgat	ggatactagg	tgctgtgcga	ctcgaccgct	120
gcagtgtctg	agctaacggc	ttaagtatcc	cgcttgggga	gtacgttcgc	aagaatgaaa	180
ctcaaaaggaa	ttgacggggg	cccgcacaag	cgttgaggca	tgtggtttaa	ttcgatgcaa	240
agcgaagaac	cttaccaggg	cttgacatgc	cgcaaatcct	cttgaaagag	aggggtgccc	300
tcgggaacgc	ggacacaggt	ggtgcatggc	tgtcgtcagc	tcgtgccgta	aggtgttggg	360
ttaagtctcg	caacgagcgc	aacctctgct	tttagttgcc	actataagtt	tggaaacctg	420
aacagaccgc	cgggtgttaa	ccggaggaag	gagaggatga	ggccaagtca	tcatgccctc	480
tatgccctcg	gcgacacacg	tgctacaatg	ggcgggacaa	agggtcgcga	tcctcgcgagg	540
gtgagctaac	tccaaaaaac	cgtcctcagt	tcggattgca	ggctgcaact	cgctgcatg	600
aagcaggaat	cgctagtaat	cgccggctcag	ccatacggcg	gtgaatccgt	tcgccggcct	660
tgtacacacc	gcccgtcaga	ctataggagc	tgcccggtgt	tgaagtcatt	acccttaacc	720
gtaaggaggg	ggatgcctaa	ggctaggctt	gcgactggag	tgaagtcgta	acaaggtagc	780
cgtactggaa	ggtgcggctg	gatcacctcc	ttttcaggga	gagctaagtc	ttatgcttat	840
tgggtatttt	ggtttgacat	tgcttcacgc	ccaaaaacaa	aaagaaggca	gtacgtctg	900
aactaaactt	ggatatggaa	gtcttctttc	gtttagggtg	aagtaagacc	aagctcatga	960
gcttattatc	ctaggtcgga	acaaattagt	tgatagtgat	aggatccccct	ttttgacgtc	1020
cccatgtccc	cccgtgtggc	ggcatgggga	tgtcaaaagg	aaagggatgg	agtttttctc	1080
gcttttggcg	tagcaggcct	ccctttggga	ggcccgccgc	acgggctatt	agctcagttg	1140
tagagcgcg	ccctgataat	tgcgtcgttg	tgccctgggt	gtgagggtc	tcagccacat	1200
ggatagttca	atgtgtctcat	cagcgctctg	ccgaagatg	tggatcatcc	aaggcacatt	1260
agcatggcgt	actcctcctg	tttgaatcgg	agtttgaaac	caaacaaact	tcctctcagg	1320
aggatagatg	gggcgattca	ggtgagatcc	catgtagatc	taacttttcta	ttcactcggt	1380
ggatccgggc	ggtccggggg	ggggccaccg	cggctcctct	cttctcgaga	atccatacat	1440
cccttatcag	tgtctggaga	gctatctctc	gagcacaggt	tgaagttcgt	cctcaatggg	1500
aaaatggagc	acctaacaac	gcattcttcac	agaccaagaa	ctacgagatc	acccctttca	1560
ttctgggggtg	acggaggggat	cgtaccattc	gagccttttt	ttcatgcttt	tcgccgcggt	1620
ctggagaaag	cagtaataca	taggactttc	ctaactcctc	cttctctgaa	ggaagaacgt	1680
gaaattcttt	ttcctttctg	cagggaccag	gagattggat	ctagccataa	gaggaatgct	1740
tggtataaat	aagccacttc	ttggtcttcg	accccttaag	tcactacgag	cgcccccgat	1800
cagtgcgaatg	ggatgtggct	atttatctat	ctcttgactc	gaaatgggag	cagagcaggt	1860

```

ttgaaaaagg atcttagagt gtctagggtt gggccaggag ggtctcttaa ccccttcctt 1920
tttctgcccc tcggagttat ttcccaagga cttgccatgg taagggggag aagggggag 1980
aagcacactt gaagagcgca gtacaacggg gaggttgatg ctgcggttcgg gaaggatgaa 2040
tcgctccccg aaaggagtc attgattctc tcccaattgg ttggatcgta ggggcatga 2100
tttacttcac gggcgaggtc tctgggtt 2127
<210> 4
<211> 2071
<212> ADN
<213> Panicum virgatum
<220>
<223> HR2
<400> 4
cagctgcgcc agggaaaaa atagaagaag catctgactc tttcatgcat actccacttg 60
gctcgggggg gatatagtct agttggtaga gtcgcgctct tgcaattggg tcgttgcgat 120
tacgggttgg ctgtctaatt gtccaggcgg taatgatagt atcttgtacc tgaaccgggtg 180
gctcactttt tctaagtaat ggggaagagg actgaaacat gccactgaaa gactctactg 240
agacaaaaag atgggtgtgc aaaaaggtag aggaggtagg atgggcagtt ggtcagatct 300
agtatggatc gtacatggac gatagttgga gtcggcggct ctctaggct tccctcatct 360
gggatccctg ggggaagagga tcaagttggc ccttgcgaaat agcttgatgc actatctccc 420
ttcaaccctt tgagcgaaa gtggcaaaa gaaggaaaa ccatggaccg accccattgt 480
ctccaccccg taggaactac gagatcacc caaggacgcc ttcggcgctc aggggtcacg 540
gaccgaccat agaccctgtt caataagtgg aacacattag ccgtccgctc tccggttggg 600
cagtaagggg cggagaaggg caatcactcg ttcttaaac cagcattctt aagttaagat 660
caaagagtcg ggcgaaaaa ggggagagct cccggttcct ggttctcctg tagctggatt 720
ccccggaacc acaagaatcc ttagaatggg attccaactc agcacctttt gttttgagat 780
tttgagaaga gttgctcttt ggagagcaca gtacgatgaa agttgtaagc tgtgttcggg 840
ggggagttat tgcttatcgt tgcctctat ggtagaacct gtcggggagg cctgagaggc 900
ggtggtttac cctgtggcgg atgtcagcgg ttcgagtcgg cttatctcca gcccgtaac 960
ttagcggata ctgtgatagc accaattttg ccaattcgtc agttcgatct atgatttcgc 1020
attcatggac gttgataaga tccttccatt tagtagcacc ttaggatggc atagccttaa 1080
cgtaaatggc gaggttcaaa agaggaaaag cttgcggtgg atacctaggc acccagagac 1140
gaggaagggc gtagcaagcg acgaaatgct tcggggagtt gaaaataagc atagatccgg 1200
agattcccaa ataggtaaac cttttgaact gcctgctgaa tccatgagca ggcaagagac 1260
aacctggcga actgaaacat cttagtagcc agaggaaaag aaagcaaaag cgattcccgt 1320
agtagcggcg agcgaaatgg gagcagccta aaccgtgaaa acgggggttg gggagagcaa 1380
tacaagcggt gtgctgctag gcgaagcggg tgagtgcgcg accctagatg gctaaagtcc 1440
agtagccgaa agcatcacta gcttacgctc tgacccgagt agcatggggc acgtggaatc 1500
ccgtgtgaat cagcaaggac caccttgcaa ggctaaatac tcctgggtga ccgatagcga 1560
agtagtaccg taggggaaa gtgaaaagaa ccccagtggt gtagtgaaat agaactgaa 1620
accgtgctga gctcccaagc agtgggagg gaaagtgatc tctgaccgcg tgcctgttga 1680
agaatgagcc ggcgactcat aggcagtggc ttggttaagg gaatggaacc caccggagcc 1740
gtagcgaaa cgagtcttca tagggcgatt gtcactgctt atggacccga acctgggtga 1800
tctatccatg accaggatga agcttgatg aaactaagca gagggtccgaa ccgactgatg 1860
ttgaagaatc agcggatgag ttgtgggttag gggtaaatg ccactcgaa ccagagctag 1920
ctggttctcc ccgaaatgcg ttgaggcgca gcagttgact ggacatctag gggtaaagca 1980
ctgtttcggg gcgggctgcg cgagcggtag caaatcgagg caaactctga atactagata 2040
tgacccaaac aggggtcaag gtcggccagt g 2071

```