



(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)



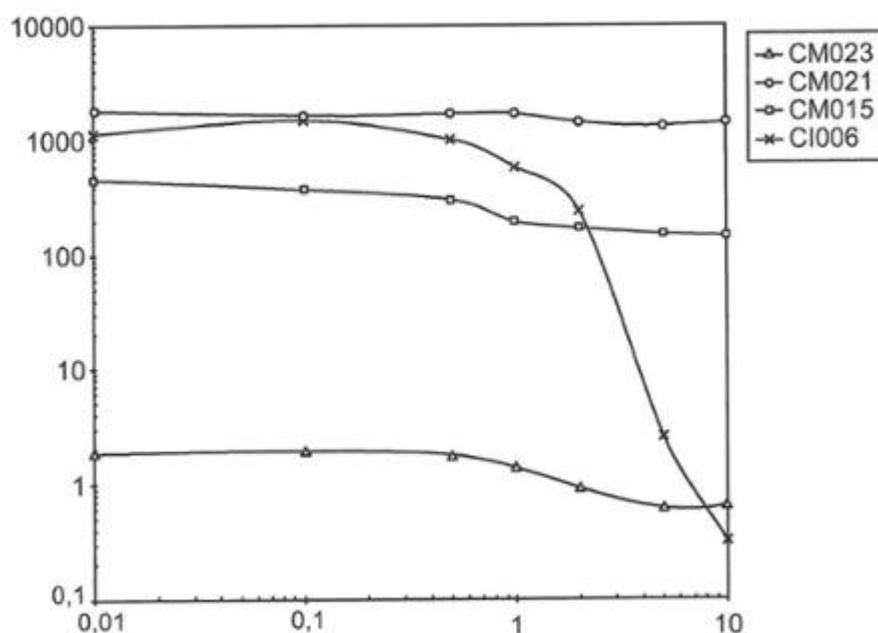
1-0032716

(51)⁷ C05F 11/08; C12N 1/20; C07K 14/195 (13) B

- (21) 1-2018-00568 (22) 13/07/2016
(86) PCT/US2016/042170 13/07/2016 (87) WO 2017/011602 19/01/2017
(30) 62/192,009 13/07/2015 US; 62/213,567 02/09/2015 US
(45) 25/07/2022 412 (43) 25/07/2018 364A
(73) PIVOT BIO, INC. (US)
2929 7th Street, Suite 120, Berkeley, CA 94710, United States of America
(72) TEMME, Karsten (US); TAMSIR, Alvin (US); BLOCH, Sarah (US); CLARK,
Rosemary (US); TUNG, Emily (US).
(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) SINH VẬT CỐ ĐỊNH NITƠ KHÔNG LIÊN GIỐNG ĐÃ ĐƯỢC XỬ LÝ KỸ THUẬT VÀ CHẾ PHẨM CHỨA SINH VẬT CỐ ĐỊNH NITƠ NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp làm tăng độ cố định nitơ ở cây không phải họ đậu. Phương pháp này có thể bao gồm bước phơi nhiễm cây này với nhiều vi khuẩn. Mỗi thành viên trong số các vi khuẩn này chứa một hoặc nhiều biến dị di truyền đã được đưa vào một hoặc nhiều gen hoặc polynucleotit không mã hóa của mạng lưới điều hoà di truyền đồng hóa hoặc cố định nitơ của vi khuẩn này, sao cho vi khuẩn này có khả năng cố định nitơ khí quyển khi có mặt nitơ ngoại sinh. Vi khuẩn này không phải là các vi sinh vật liên giống. Ngoài ra, vi khuẩn này, *in planta*, sản sinh nitơ đã cố định ở mức 1% hoặc cao hơn ở cây này.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp làm tăng độ cố định nitơ ở cây không phải họ đậu. Phương pháp này có thể bao gồm bước phơi nhiễm cây này với nhiều vi khuẩn. Mỗi vi khuẩn trong số nhiều vi khuẩn này bao gồm một hoặc nhiều biến dị di truyền đã được đưa vào một hoặc nhiều gen hoặc polynucleotit không mã hóa của mạng lưới điều hoà di truyền đồng hóa hoặc cố định nitơ của vi khuẩn này, sao cho vi khuẩn này có khả năng cố định nitơ khí quyển khi có mặt nitơ ngoại sinh. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến quần thể vi khuẩn có khả năng cố định nitơ khí quyển khi có mặt nitơ ngoại sinh và chế phẩm chứa quần thể vi khuẩn này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các thực vật có liên hệ với hệ vi sinh vật thông qua một tập chuyển hóa dùng chung. Mỗi quan hệ đa chiều giữa tính trạng của một cây trồng cụ thể và tập chuyển hóa cơ bản được đặc trưng bởi bối cảnh có nhiều cực đại cục bộ. Có thể mong muốn sẽ tối ưu hóa được từ một cực đại cục bộ thấp thành một cực đại khác biểu hiện tính trạng tốt hơn bằng cách làm thay đổi tầm ảnh hưởng của hệ vi sinh vật đến tập chuyển hóa vì nhiều lý do khác nhau, chẳng hạn như nhằm tối ưu hóa cây trồng. Cần phải có cách tiếp cận bền vững về mặt kinh tế, môi trường và xã hội đối với nông nghiệp và sản xuất thực phẩm nhằm đáp ứng nhu cầu cho dân số toàn cầu đang ngày càng tăng. Tổ chức Lương thực và Nông nghiệp của Liên hiệp quốc dự kiến rằng cho đến năm 2050 thì tổng sản lượng lương thực cần phải tăng thêm 70% mới đáp ứng được nhu cầu của dân số ngày càng tăng, một thách thức mà sẽ càng khó khăn hơn bởi nhiều yếu tố, bao gồm, tài nguyên nước ngọt giảm, gia tăng cạnh tranh đối với đất canh tác, giá năng lượng tăng cao, chi phí đầu vào gia tăng, và nhu cầu có thể có đối với cây trồng nhằm thích ứng được với các áp lực do khí hậu toàn cầu khô hơn, nóng hơn và khắc nghiệt hơn.

Một lĩnh vực đáng quan tâm là cải thiện độ cố định nitơ. Khí nitơ (N_2) là thành phần chính trong khí quyển của trái đất. Ngoài ra, nitơ nguyên tố (N) cũng là thành

phần quan trọng trong nhiều hợp chất hóa học tạo nên sinh vật sống. Tuy nhiên, nhiều sinh vật không thể sử dụng trực tiếp N_2 để tổng hợp được các hóa chất dùng trong các quá trình sinh lý, như phát triển và sinh sản. Để sử dụng được N_2 , thì N_2 cần phải được kết hợp với hydro. Việc kết hợp hydro với N_2 được gọi là cố định nitơ. Sự cố định nitơ, dù đạt được bằng phương pháp hóa học hay sinh học, thì đều cần phải đầu tư một lượng năng lượng lớn. Trong các hệ sinh học, một enzym có tên là nitrogenaza xúc tác được phản ứng này dẫn đến cố định nitơ. Mục đích quan trọng của nghiên cứu về quá trình cố định nitơ là nhằm mở rộng kiểu hình này cho các cây không phải họ đậu, cụ thể là các cây nông nghiệp quan trọng, như cây lúa mỳ, cây lúa và cây ngô. Dù đã có tiến bộ to lớn trong việc hiểu được sự phát triển của quá trình cộng sinh cố định nitơ giữa các nốt rễ và các cây họ đậu, nhưng phương thức áp dụng kiến thức này nhằm cảm ứng các nốt sần cố định nitơ trên các cây trồng không phải họ đậu vẫn chưa sáng tỏ. Đồng thời, thách thức cần cung cấp đủ nguồn nitơ bổ sung, như trong phân bón, sẽ tiếp tục gia tăng cùng với nhu cầu ngày càng tăng nhằm tăng sản xuất lương thực.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Do đó, có nhu cầu cải thiện các tính trạng của cây trồng do hệ vi sinh vật kết hợp mang lại. Sáng chế nhằm mục đích giải quyết nhu cầu này, và đồng thời cung cấp các lợi ích khác nữa. Trong một số trường hợp, cả hai loài gồm hệ vi sinh vật và các thông tin di truyền cơ bản của chúng đều là đích để điều biến tác động của vi khuẩn đến tập chuyển hóa.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp gia tăng độ cố định nitơ ở cây không phải họ đậu, phương pháp này bao gồm bước phơi nhiễm cây này với nhiều vi khuẩn, mỗi thành viên trong số nhiều vi khuẩn này bao gồm một hoặc nhiều biến đổi di truyền đã được đưa vào một hoặc nhiều gen hoặc polynucleotit không mã hóa của mạng lưới điều hoà di truyền đồng hóa hoặc cố định nitơ của vi khuẩn này, sao cho vi khuẩn này có khả năng cố định nitơ khí quyển khi có mặt nitơ ngoại sinh; trong đó vi khuẩn này không phải là vi sinh vật liên giống; và trong đó vi khuẩn này, *in planta*, sản sinh nitơ đã cố định ở mức 1% hoặc cao hơn ở cây này.

Theo một vài phương án, vi khuẩn này, *in planta*, sản sinh nitơ đã cố định ở mức 5% hoặc cao hơn ở cây này. Theo một vài phương án, vi khuẩn này, *in planta*, sản sinh nitơ đã cố định ở mức 10% hoặc cao hơn ở cây này.

Theo một vài phương án, một hoặc nhiều biến dị di truyền chứa trình tự điều khiển đã đưa vào được liên kết có điều khiển với một hoặc nhiều gen nêu trên của mạng lưới điều hoà di truyền đồng hóa hoặc cố định nitơ này. Theo các phương án khác, trình tự điều khiển là trình tự khởi đầu. Theo các phương án khác, trình tự khởi đầu này là trình tự khởi đầu dễ cảm ứng. Theo một vài phương án, vi khuẩn này không bao gồm trình tự khởi đầu cơ định liên kết có điều khiển với gen của mạng lưới điều hoà di truyền đồng hóa hoặc cố định nitơ này. Theo một vài phương án, vi khuẩn này không bao gồm trình tự khởi đầu cơ định liên kết có điều khiển với gen trong cụm gen *nif*.

Theo một vài phương án, vi khuẩn này, *in planta*, tiết ra sản phẩm chứa nitơ trong quá trình cố định nitơ. Theo một vài phương án, nhiều vi khuẩn được phối nhiệm cho cây này không kích thích gia tăng sự hấp thụ của nitơ ngoại sinh không có trong khí quyển.

Theo một vài phương án, cây này được trồng trong đất từ thực địa đã được sử dụng khoảng 50 lbs (22,68 kg) phân bón chứa nitơ trên mỗi acre (~0,4 ha), và trong đó phân bón chứa nitơ này chứa nitơ với lượng ít nhất là 5% trọng lượng. Theo các phương án khác, phân bón chứa nitơ này chứa amoni hoặc phân tử chứa amoni. Theo một vài phương án, nitơ ngoại sinh được chọn từ phân bón chứa một hoặc nhiều thành phần trong số glutamin, amoniac, amoni, ure, nitrat, nitrit, phân tử chứa amoni, phân tử chứa nitrat, và phân tử chứa nitrit.

Theo một vài phương án, nhiều vi khuẩn là bao gồm ít nhất hai loài vi khuẩn khác nhau. Theo một vài phương án, nhiều vi khuẩn bao gồm ít nhất hai chủng khác nhau của cùng một loài vi khuẩn. Theo một vài phương án, các vi khuẩn này thuộc giống *Enterobacter*. Theo một vài phương án, các vi khuẩn này sống nội sinh, biểu sinh, hoặc trong bầu rễ. Theo một vài phương án, các vi khuẩn này xâm chiếm cây sao cho vi khuẩn này có mặt trong cây ở mức ít nhất là 10^5 cfu/g trọng lượng tươi của cây đó.

Theo một vài phương án, một hoặc nhiều gen hoặc polynucleotit không mã hóa của mạng lưới điều hoà di truyền đồng hóa hoặc cố định nitơ của vi khuẩn này được chọn từ nhóm gồm: *nifA*, *nifL*, *ntrB*, *ntrC*, polynucleotit mã hóa glutamin synthetaza, *glnA*, *glnB*, *glnK*, *drat*, *amtB*, polynucleotit mã hóa glutaminaza, *glnD*, *glnE*, *nifJ*, *nifH*, *nifD*, *nifK*, *nifY*, *nifE*, *nifN*, *nifU*, *nifS*, *nifV*, *nifW*, *nifZ*, *nifM*, *nifF*, *nifB*, và *nifQ*. Theo một vài phương án, một hoặc nhiều biến dị di truyền là đột biến mà dẫn đến một hoặc nhiều đặc tính trong số: tăng biểu hiện hoặc hoạt tính của NifA hoặc glutaminaza; giảm biểu hiện hoặc hoạt tính của NifL, NtrB, glutamin synthetaza, GlnB, GlnK, DraT, AmtB; giảm hoạt tính loại bỏ adenylyl của GlnE; hoặc giảm hoạt tính loại bỏ uridylyl của GlnD. Theo một vài phương án, một hoặc nhiều biến dị di truyền là (A) đột biến bất hoạt gen; (B) làm biến đổi hoặc làm mất trình tự điều hoà của gen đích; hoặc (C) bao gồm cả biến cải xen trình tự điều hoà khác loài.

Theo một vài phương án, cây là cây trồng nông nghiệp. Theo các phương án khác, cây trồng nông nghiệp được chọn từ cây lúa miến, cây cải dầu, cây cà chua, cây dâu tây, cây lúa mạch, cây lúa gạo, cây ngô, và cây lúa mì. Theo các phương án khác, cây này là sinh vật biến đổi gen. Theo các phương án khác, cây này không phải là sinh vật biến đổi gen. Theo một vài phương án, cây này đã được thiết kế di truyền hoặc nhân giống để sử dụng nitơ hiệu quả.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất quần thể vi khuẩn bao gồm các vi khuẩn chứa một hoặc nhiều biến dị di truyền đã được đưa vào một hoặc nhiều gen hoặc polynucleotit không mã hóa của mạng lưới điều hoà di truyền đồng hóa hoặc cố định nitơ của vi khuẩn này, sao cho vi khuẩn này có khả năng cố định nitơ khí quyển khi có mặt nitơ ngoại sinh; trong đó vi khuẩn này không phải là các vi sinh vật liên giống; và trong đó vi khuẩn này, *in planta*, sản sinh ra nitơ đã cố định ở mức 1% hoặc cao hơn ở cây được trồng khi có mặt quần thể vi khuẩn này.

Theo một vài phương án, vi khuẩn này, *in planta*, sản sinh ra nitơ đã cố định ở mức 5% hoặc cao hơn ở cây này. Theo một vài phương án, vi khuẩn này, *in planta*, sản sinh ra nitơ đã cố định ở mức 10% hoặc cao hơn ở cây này.

Theo một vài phương án, một hoặc nhiều biến dị di truyền chứa trình tự điều khiển đã đưa vào được liên kết có điều khiển với một hoặc nhiều gen nêu trên của

mạng lưới điều hoà di truyền đồng hóa hoặc cố định nitơ này. Theo các phương án khác, trình tự điều khiển là trình tự khởi đầu. Theo các phương án khác, trình tự khởi đầu này là trình tự khởi đầu dễ cảm ứng. Theo một vài phương án, vi khuẩn này không bao gồm trình tự khởi đầu cơ định liên kết có điều khiển với gen của mạng lưới điều hoà di truyền đồng hóa hoặc cố định nitơ này. Theo một vài phương án, vi khuẩn này không bao gồm trình tự khởi đầu cơ định liên kết có điều khiển với gen trong cụm gen *nif*.

Theo một vài phương án, vi khuẩn này, *in planta*, tiết ra sản phẩm chứa nitơ trong quá trình cố định nitơ. Theo một vài phương án, nhiều vi khuẩn được phơi nhiễm cho cây này không kích thích gia tăng sự hấp thụ nitơ ngoại sinh không có khí quyển. Theo một vài phương án, nitơ ngoại sinh được chọn từ phân bón chứa một hoặc nhiều thành phần trong số glutamin, amoniac, amoni, ure, nitrat, nitrit, phân tử chứa amoni, phân tử chứa nitrat, và phân tử chứa nitrit.

Theo một vài phương án, quần thể vi khuẩn bao gồm ít nhất hai loài vi khuẩn khác nhau. Theo một vài phương án, quần thể vi khuẩn này bao gồm ít nhất hai chủng khác nhau của cùng một loài vi khuẩn. Theo một vài phương án, các vi khuẩn này thuộc giống *Enterobacter*. Theo một vài phương án, các vi khuẩn này sống nội sinh, biểu sinh, hoặc trong bầu rễ. Theo một vài phương án, các vi khuẩn này xâm chiếm cây sao cho vi khuẩn này có mặt trong cây ở mức ít nhất là 10^5 cfu/g trọng lượng tươi của cây đó.

Theo một vài phương án, một hoặc nhiều gen hoặc polynucleotit không mã hóa của mạng lưới điều hoà di truyền đồng hóa hoặc cố định nitơ của vi khuẩn này được chọn từ nhóm gồm: *nifA*, *nifL*, *ntrB*, *ntrC*, polynucleotit mã hóa glutamin synthetaza, *glnA*, *glnB*, *glnK*, *drat*, *amtB*, polynucleotit mã hóa glutaminaza, *glnD*, *glnE*, *nifJ*, *nifH*, *nifD*, *nifK*, *nifY*, *nifE*, *nifN*, *nifU*, *nifS*, *nifV*, *nifW*, *nifZ*, *nifM*, *nifF*, *nifB*, và *nifQ*. Theo một vài phương án, một hoặc nhiều biến dị di truyền là đột biến dẫn đến một hoặc nhiều đặc tính trong số: tăng biểu hiện hoặc hoạt tính của NifA hoặc glutaminaza; giảm biểu hiện hoặc hoạt tính của NifL, NtrB, glutamin synthetaza, GlnB, GlnK, DraT, AmtB; giảm hoạt tính loại bỏ adenyllyl của GlnE; hoặc giảm hoạt tính loại bỏ uridylyl của GlnD. Theo một vài phương án, một hoặc nhiều biến dị di

truyền là (A) đột biến bất hoạt gen; (B) làm biến đổi hoặc làm mất trình tự điều hoà của gen đích; hoặc (C) bao gồm cả biến cải xen trình tự điều hoà khác loài.

Theo một vài phương án, cây là cây trồng nông nghiệp. Theo các phương án khác, cây trồng nông nghiệp được chọn từ cây lúa miến, cây cải dầu, cây cà chua, cây đậu tây, cây lúa mạch, cây lúa gạo, cây ngô, và cây lúa mỳ. Theo các phương án khác, cây này là sinh vật biến đổi gen. Theo các phương án khác, cây này không phải là sinh vật biến đổi gen. Theo một vài phương án, cây này đã được thiết kế di truyền hoặc nhân giống để sử dụng nitơ hiệu quả.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chế phẩm chứa quần thể vi khuẩn theo sáng chế. Theo một vài phương án, chế phẩm này chứa quần thể vi khuẩn được phủ lên bề mặt của hạt giống. Theo một vài phương án, chế phẩm này được phối trộn dưới dạng chất lỏng hoặc bột.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất vi khuẩn đã phân lập được nộp lưu tại ATCC với số nộp lưu là PTA-122293 hoặc PTA-122294.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất vi khuẩn không liên giống chứa một hoặc nhiều biến dị di truyền đã được đưa vào một hoặc nhiều gen hoặc polynucleotit không mã hóa của mạng lưới điều hoà di truyền đồng hóa hoặc cố định nitơ của vi khuẩn này, sao cho vi khuẩn này có khả năng cố định nitơ khí quyển khi có mặt nitơ ngoại sinh.

Theo một vài phương án, một hoặc nhiều biến dị di truyền chứa trình tự điều khiển đã đưa vào được liên kết có điều khiển với một hoặc nhiều gen nêu trên của mạng lưới điều hoà di truyền đồng hóa hoặc cố định nitơ này. Theo các phương án khác, trình tự điều khiển là trình tự khởi đầu. Theo các phương án khác, trình tự khởi đầu là trình tự khởi đầu dễ cảm ứng. Theo một vài phương án, vi khuẩn này không bao gồm trình tự khởi đầu cơ định được liên kết có điều khiển với gen của mạng lưới điều hoà di truyền đồng hóa hoặc cố định nitơ này. Theo một vài phương án, vi khuẩn này không bao gồm trình tự khởi đầu cơ định được liên kết có điều khiển với gen trong cụm gen *nif*.

Theo một vài phương án, một hoặc nhiều gen hoặc polynucleotit không mã hóa của mạng lưới điều hoà di truyền đồng hóa hoặc cố định nitơ của vi khuẩn này là

được chọn từ nhóm gồm: *nifA*, *nifL*, *ntrB*, *ntrC*, polynucleotit mã hóa glutamin synthetaza, *glnA*, *glnB*, *glnK*, *draT*, *amtB*, polynucleotit mã hóa glutaminaza, *glnD*, *glnE*, *nifJ*, *nifH*, *nifD*, *nifK*, *nifY*, *nifE*, *nifN*, *nifU*, *nifS*, *nifV*, *nifW*, *nifZ*, *nifM*, *nifF*, *nifB*, và *nifQ*. Theo một vài phương án, một hoặc nhiều biến dị di truyền là đột biến dẫn đến một hoặc nhiều đặc tính trong số: tăng biểu hiện hoặc hoạt tính của NifA hoặc glutaminaza; giảm biểu hiện hoặc hoạt tính của NifL, NtrB, glutamin synthetaza, GlnB, GlnK, DraT, AmtB; giảm hoạt tính loại bỏ adenylyl của GlnE; hoặc giảm hoạt tính loại bỏ uridylyl của GlnD. Theo một vài phương án, một hoặc nhiều biến dị di truyền là (A) đột biến bất hoạt gen; (B) làm biến đổi hoặc làm mất trình tự điều hoà của gen đích; hoặc (C) bao gồm cải biến cải xen trình tự điều hoà khác loài.

Theo một vài phương án, vi khuẩn này là từ giống *Enterobacter*. Theo một vài phương án, vi khuẩn này sống nội sinh, biểu sinh, hoặc trong bầu rễ.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất một hoặc nhiều vi khuẩn. Theo một phương án, phương pháp này bao gồm các bước: (a) phân lập vi khuẩn từ mô hoặc đất của cây thứ nhất; (b) đưa biến dị di truyền (ví dụ một hoặc nhiều biến dị di truyền) vào một hoặc nhiều vi khuẩn này để tạo ra một hoặc nhiều vi khuẩn biến thể; (c) phơi nhiễm các cây với vi khuẩn biến thể này; (d) phân lập vi khuẩn từ mô hoặc đất của một trong các cây này, trong đó cây mà vi khuẩn được phân lập từ đó có tính trạng được cải thiện so với các cây khác trong số các cây này; và (e) lặp lại các bước từ (b) đến (d) với vi khuẩn được phân lập ở bước (d). Tính trạng được cải thiện có thể là sự tăng cường cố định nitơ ở cây mà vi khuẩn được phân lập từ đó, và/hoặc ở cây được phơi nhiễm với vi khuẩn đó. Biến dị di truyền có thể là sự biến đổi ở gen được chọn từ nhóm gồm: *nifA*, *nifL*, *ntrB*, *ntrC*, *glnA*, *glnB*, *glnK*, *draT*, *amtB*, *glnD*, *glnE*, *nifJ*, *nifH*, *nifD*, *nifK*, *nifY*, *nifE*, *nifN*, *nifU*, *nifS*, *nifV*, *nifW*, *nifZ*, *nifM*, *nifF*, *nifB*, và *nifQ*. Biến dị di truyền có thể là sự biến đổi ở gen mã hóa protein có nhóm chức được chọn từ nhóm gồm: glutamin synthetaza, glutaminaza, glutamin synthetaza adenylyltransferaza, chất hoạt hóa phiên mã, chất chống hoạt hóa phiên mã, pyruvat flavodoxin oxidoreductaza, flavodoxin, hoặc NAD⁺-dinitroreductaza ADP-D-ribosyltransferaza. Theo một vài phương án, biến dị di truyền này là đột biến dẫn đến một hoặc nhiều đặc tính trong số: tăng biểu hiện hoặc hoạt tính của NifA hoặc glutaminaza; giảm biểu hiện hoặc hoạt tính của NifL, NtrB, glutamin

synthetaza, GlnB, GlnK, DraT, AmtB; giảm hoạt tính loại bỏ adenylyl của GlnE; hoặc giảm hoạt tính loại bỏ uridylyl của GlnD. Biến dị di truyền có thể là đột biến bất hoạt gen, dẫn đến loại bỏ hoặc mất hoạt tính của miền protein, làm biến đổi hoặc làm mất trình tự điều hoà của gen đích, và/hoặc bao gồm cải biến cài xen trình tự điều hoà khác loài. Theo một vài phương án, biến dị di truyền này bao gồm cải biến cài xen trình tự điều hoà được tìm thấy trong hệ gen của loài hoặc giống vi khuẩn tương ứng với vi khuẩn mà biến dị di truyền được đưa vào đó. Trình tự điều hoà có thể tuỳ ý được chọn dựa vào mức biểu hiện của gen trong giống cây vi khuẩn hoặc trong mô cây. Biến dị di truyền có thể là đột biến ngẫu nhiên ở vị trí ngẫu nhiên, đột biến ngẫu nhiên ở vị trí đích, hoặc biến dị di truyền định trước được đưa một cách đặc hiệu vào vị trí đích. Biến dị di truyền có thể bao gồm cải biến cài xen, làm khuyết, hoặc thay thế một hoặc nhiều nucleotit, hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng. Biến dị di truyền có thể được tạo ra bằng cách gây đột biến bằng hóa chất. Theo một vài phương án, phương pháp này còn bao gồm bước phơi nhiễm các cây với các tác nhân gây stress sinh học hoặc phi sinh học. Theo một vài phương án, các vi khuẩn đã phân lập sau khi lặp lại các bước từ (b) đến (d) một hoặc nhiều lần sản sinh ra nitơ ở mức 1% hoặc cao hơn (ví dụ, ít nhất 2%, 5%) 10%, hoặc cao hơn 10%) ở cây thứ hai cùng loại với cây thứ nhất, hoặc ở cây được phơi nhiễm với vi khuẩn đó. Mức sản sinh này cũng có thể đạt được khi cây thứ hai được trồng với sự có mặt của phân bón đã bổ sung glutamin, amoniac, hoặc nguồn hóa chất nitơ khác. Theo một vài phương án, các vi khuẩn đã phân lập sau khi lặp lại các bước từ (b) đến (d) một hoặc nhiều lần có độ cố định nitơ gia tăng ít nhất 2 lần (ví dụ, gia tăng ít nhất 5 lần) so với các vi khuẩn được phân lập từ cây thứ nhất. Cây thứ nhất, hoặc cây trong số nhiều cây này, có thể là cây trồng nông nghiệp, như cây được chọn từ cây lúa mạch, cây lúa gạo, cây ngô, cây lúa mỳ, cây lúa miến, cây ngô ngọt, cây mía, cây hành, cây cà chua, cây dâu tây, hoặc cây măng tây. Cây thứ nhất, hoặc cây trong số nhiều cây này, có thể là cây mô hình, như cây được chọn từ *Setaria*, *Brachypodium*, hoặc *Arabidopsis*. Theo một vài phương án, bước (a) còn bao gồm công đoạn tiến hành phân tích di truyền vi khuẩn đã phân lập. Theo một vài phương án, bước (b) còn bao gồm công đoạn gây áp lực chọn lọc để làm giàu vi khuẩn chứa biến dị di truyền, và tuỳ ý phân lập vi khuẩn còn sống sau áp lực chọn lọc. Áp lực chọn lọc này có thể bao gồm việc phân cắt các hệ gen thiếu biến dị di truyền đã được đưa vào vị trí đích, trong đó việc phân cắt diễn ra ở phạm

vi 100 nucleotit của vị trí đích. Việc phân cắt này được định hướng bởi nucleaza đặc hiệu vị trí, như nucleaza được chọn từ nhóm gồm nucleaza ngón tay kềm, nucleaza CRISPR, nucleaza TALE, hoặc meganucleaza. Trong một vài trường hợp, nucleaza CRISPR có thể được ưu tiên. Các vi khuẩn đã phân lập sau khi lặp lại các bước từ (b) đến (d) một hoặc nhiều lần là vi khuẩn sống nội sinh, biểu sinh, hoặc trong bầu rễ. Vi khuẩn này có thể được phân lập từ mô cây (ví dụ, hạt giống). Vi khuẩn này có thể bao gồm nhiều taxon (đơn vị phân loại) vi khuẩn khác nhau. Theo một vài phương án, công đoạn phân lập vi khuẩn ở bước (a) bao gồm phân lập vi khuẩn từ hạt giống của cây thứ nhất.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp gia tăng độ cố định nitơ ở cây. Theo một phương án, phương pháp này bao gồm bước phơi nhiễm cây này với các vi khuẩn chứa một hoặc nhiều biến dị di truyền đã được đưa vào một hoặc nhiều gen điều hoà sự cố định nitơ, trong đó các vi khuẩn này sản sinh ra nitơ ở mức 1% hoặc cao hơn (ví dụ, ít nhất 2%, 5%, 10%, hoặc cao hơn 10%) ở cây này. Vi khuẩn này có thể sản sinh ra nitơ khi có mặt phân bón đã bổ sung glutamin, amoniac, hoặc nguồn hóa chất nitơ bổ sung khác. Theo một vài phương án, biến dị di truyền là sự biến đổi ở gen được chọn từ nhóm gồm: *nifA*, *nifL*, *ntrB*, *ntrC*, glutamin synthetaza, *glnA*, *glnB*, *glnK*, *draT*, *amtB*, glutaminaza, *glnD*, *glnE*, *nifJ*, *nifH*, *nifD*, *nifK*, *nifY*, *nifE*, *nifN*, *nifU*, *nifS*, *nifV*, *nifW*, *nifZ*, *nifM*, *nifF*, *nifB*, và *nifQ*. Biến dị di truyền có thể là đột biến dẫn đến một hoặc nhiều đặc tính trong số: tăng biểu hiện hoặc hoạt tính của *nifA* hoặc glutaminaza; giảm biểu hiện hoặc hoạt tính của *nifL*, *ntrB*, glutamin synthetaza, *glnB*, *glnK*, *draT*, *amtB*; giảm hoạt tính loại bỏ adenyllyl của *GlnE*; hoặc giảm hoạt tính loại bỏ uridylyl của *GlnD*. Theo một vài phương án, biến dị di truyền (a) là đột biến bất hoạt gen; (b) làm biến đổi hoặc làm mất trình tự điều hoà của gen đích; hoặc (c) bao gồm cải biến cài xen trình tự điều hoà khác loài. Vi khuẩn này có thể sống nội sinh, biểu sinh, hoặc trong bầu rễ. Trong một vài trường hợp, vi khuẩn này thuộc giống *Enterobacter* hoặc *Rahnella*. Vi khuẩn này có thể bao gồm nhiều taxon vi khuẩn khác nhau. Theo một vài phương án, cây là cây trồng nông nghiệp, như cây được chọn từ cây lúa miến, cây cải dầu, cây cà chua, cây dâu tây, cây lúa mạch, cây lúa gạo, cây ngô, và cây lúa mì. Cây này có thể là cây không thuộc họ đậu. Cây này có thể là sinh vật biến đổi gen (GMO; ví dụ, cây có hệ gen được biến

đổi để mang gen khác loài), không phải là sinh vật biến đổi gen (non-GMO), hoặc đã được thiết kế di truyền hoặc nhân giống để sử dụng nitơ hiệu quả.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất quần thể vi khuẩn. Theo một phương án, quần thể vi khuẩn này bao gồm các vi khuẩn chứa một hoặc nhiều biến dị di truyền đã được đưa vào một hoặc nhiều gen điều hoà sự cố định nitơ, trong đó các vi khuẩn này sản sinh ra nitơ ở mức 1% hoặc cao hơn (ví dụ, ít nhất 2%, 5%, 10% hoặc cao hơn 10%) ở cây được trồng khi có mặt quần thể vi khuẩn này. Các vi khuẩn này có thể sản sinh nitơ khi có mặt phân bón đã bổ sung glutamin, amoniac, hoặc nguồn hóa chất nitơ bổ sung khác. Theo một vài phương án, biến dị di truyền là sự biến đổi ở gen được chọn từ nhóm gồm: *nifA*, *nifL*, *ntrB*, *ntrC*, glutamin synthetaza, *glnA*, *glnB*, *glnK*, *draT*, *amtB*, glutaminaza, *glnD*, *glnE*, *nifJ*, *nifH*, *nifD*, *nifK*, *nifY*, *nifE*, *nifN*, *nifU*, *nifS*, *nifV*, *nifW*, *nifZ*, *nifM*, *nifF*, *nifB*, và *nifQ*. Biến dị di truyền có thể là đột biến dẫn đến một hoặc nhiều đặc tính trong số: tăng biểu hiện của *nifA* hoặc glutaminaza; giảm biểu hiện của *nifL*, *ntrB*, glutamin synthetaza, *glnB*, *glnK*, *draT*, *amtB*; giảm hoạt tính loại bỏ adenylyl của *GlnE*; hoặc giảm hoạt tính loại bỏ uridylyl của *GlnD*. Theo một vài phương án, biến dị di truyền (a) là đột biến bất hoạt gen; (b) làm biến đổi hoặc làm mất trình tự điều hoà của gen đích; hoặc (c) bao gồm cải biến cài xen trình tự điều hoà khác loài. Vi khuẩn này có thể sống nội sinh, biểu sinh, hoặc trong bầu rễ. Trong một vài trường hợp, vi khuẩn này thuộc giống *Enterobacter* hoặc *Rahnella*. Vi khuẩn này có thể bao gồm nhiều taxon vi khuẩn khác nhau.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chế phẩm chứa quần thể vi khuẩn, như quần thể vi khuẩn được mô tả trong bản mô tả này. Chế phẩm này có thể chứa quần thể vi khuẩn được phủ lên bề mặt của hạt giống. Theo một vài phương án, chế phẩm này được phối trộn dưới dạng lỏng hoặc dạng bột.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất vi khuẩn có số nộp lưu ATCC là PTA-122293. Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất vi khuẩn có số nộp lưu ATCC là PTA-122294.

Danh mục tài liệu trích dẫn

Tất cả các công bố đơn, patent và đơn sáng chế được đề cập trong bản mô tả này được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn đến mức độ giống như khi từng công

bố đơn, patent hoặc đơn sáng chế này được chỉ dẫn là được kết hợp bằng cách viện dẫn một cách cụ thể và riêng lẻ.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Các đặc điểm mới của sáng chế được đề cập cụ thể trong các điểm yêu cầu bảo hộ đính kèm. Sẽ hiểu được rõ hơn các đặc điểm và ưu điểm của sáng chế khi đọc phần mô tả chi tiết dưới đây mà nêu ra các phương án minh họa trong đó sử dụng các nguyên tắc của sáng chế và các hình vẽ kèm theo sáng chế, trong đó:

Fig.1A đến Fig.1B mô tả quá trình làm giàu và phân lập các vi khuẩn cố định nitơ. Sử dụng (A) đĩa thạch Nfb để phân lập các khuẩn lạc đơn lẻ của vi khuẩn cố định nitơ. (B) thạch Nfb bán rắn được đổ khuôn trong ống Balch. Mũi tên chỉ lớp màng của vi khuẩn cố định nitơ đã làm giàu.

Fig.2 thể hiện phiên sàng lọc PCR *nifH* đại diện. Vạch dương tính được quan sát ở ~350bp đối với hai khuẩn lạc trên phiên sàng lọc này. Vạch bên dưới là các dime-đoạn môi.

Fig.3 là một ví dụ về phiên sàng lọc PCR của các khuẩn lạc từ quá trình gây đột biến chọn lọc CRISPR-Cas. Các khuẩn lạc CI006 được sàng lọc bằng các đoạn môi đặc hiệu cho locus *nifL*. Sản phẩm PCR kiểu hoang được cho là ở ~2,2kb, trong khi đó thể đột biến được cho là ở ~1,1kb. 7 trong số 10 khuẩn lạc đã sàng lọc thể hiện rõ ràng cải biến làm khuyết mong muốn.

Fig.4A đến Fig.4D là các kiểu hình *in vitro* của các chủng khác nhau. Các hoạt tính thử nghiệm khử axetylen (ARA) của các thể đột biến của chủng CI010 (Fig.4A) và các thể đột biến của chủng CI006 (Fig.4B) được sinh trưởng trong môi trường cố định nitơ có bổ sung từ 0 đến 10mM glutamin. Các hoạt tính ARA của các chủng bổ sung được thể hiện trên Fig.4C, và profin tiết amoni theo thời gian của hai chủng được thể hiện trên Fig.4D.

Fig.5 là profin biểu hiện nuôi cấy của 9 gen khác nhau trong chủng CI006 tham gia vào quá trình cố định nitơ của sinh vật cố định nitơ. Các con số thể hiện số lượng của từng bản phiên mã. Nhiều điều kiện khác nhau (0, 1, 10 mM Glutamin và 0%, 10%, 20% không khí khí quyển là N₂) được chỉ ra trên hình này.

Fig.6 là sự xâm chiếm của CI006 trên rễ cây ngô. Cây ngô mầm được chủng nhiễm CI006 mang plasmit biểu hiện RFP. Sau hai tuần sinh trưởng và duy trì plasmit bằng cách tưới kháng sinh thích hợp, thu gom rễ và chụp hình qua kính hiển vi huỳnh quang. Nhận thấy có sự xâm chiếm ở khoảng trống giữa các tế bào trong rễ.

Fig.7 thể hiện nitơ thu được từ nồng độ vi khuẩn ở chủng kiểu hoang WT (CI050) và chủng được tối ưu hóa (CM002).

Fig.8 thể hiện thiết lập thử nghiệm cho thử nghiệm khối lượng quả Micro-Tom.

Fig.9 thể hiện quá trình sàng lọc 10 chủng để gia tăng khối lượng quả Micro-Tom. Các kết quả cho thử 6 lần lặp lại được thể hiện. Đối với cột 3, $p = 0,07$. Đối với cột 7, $p = 0,05$.

Fig.10A đến Fig.10C thể hiện kết quả bổ sung đối với các hoạt tính ARA của các vi sinh vật ứng viên và các thể đột biến ứng viên đi kèm được sinh trưởng trong môi trường cố định nitơ có bổ sung từ 0 đến 10mM glutamin.

Fig.11 thể hiện thể đột biến kép có mức tiết amoniac cao hơn so với thể đột biến đơn mà thể đột biến kép thu được từ thể này.

Fig.12 thể hiện NDFA thu được từ thử nghiệm hấp thụ khí ^{15}N (ngoại suy ngược lại bằng cách sử dụng số ngày phơi nhiễm) để xác định NDFA ở các cây ngô trong điều kiện có bón phân.

Fig.13 thể hiện giá trị NDFA thu được từ thử nghiệm hấp thụ khí ^{15}N (ngoại suy ngược lại bằng cách sử dụng số ngày phơi nhiễm) để xác định NDFA ở các cây *Setaria* trong điều kiện có bón phân.

Fig.14A thể hiện tỷ lệ kết hợp khí ^{15}N . Các cây được chủng nhiễm của chủng đã tiến hóa cho thấy sự gia tăng tỷ lệ kết hợp khí ^{15}N so với các cây không được chủng nhiễm.

Fig.14B thể hiện 4 tuần sau khi trồng, lên đến 7% nitơ ở các cây được chủng nhiễm của chủng đã tiến hóa là thu được từ nitơ được cố định nhờ vi khuẩn.

Fig.14 C thể hiện diện tích lá (và chỉ số sinh khối khác, dữ liệu không được thể hiện) gia tăng ở các cây được chủng nhiễm của chủng đã tiến hóa so với các cây không được chủng nhiễm hoặc được chủng nhiễm kiểu hoang.

Fig.15A thể hiện các chủng đã tiến hóa mà biểu hiện sự sản sinh nifH cao hơn đáng kể ở mô rễ, như được xác định bằng nghiên cứu hệ phiên mã ở thực vật.

Fig.15B thể hiện tỷ lệ của nitơ đã cố định tìm thấy ở mô thực vật là tương quan với tỷ lệ ở đó cây cụ thể bị xâm chiếm bởi chủng đã tối ưu hóa HoME.

Fig.16A thể hiện sơ đồ kết cấu đất của nhiều loại đất thực địa được thử nghiệm về khả năng xâm chiếm. Đất mà ở đó lấy một vài vi khuẩn được ký hiệu hình sao.

Fig.16B thể hiện tỷ lệ xâm chiếm của chủng 1 và chủng 5 mà được thử nghiệm trên bốn loại đất khác nhau (hình tròn). Cả hai chủng đều thể hiện profin xâm chiếm tương đối mạnh trên nhiều loại đất thử.

Fig.16C thể hiện sự xâm chiếm của chủng 1 như được thử nghiệm trong khảo nghiệm thực địa trong suốt mùa trồng trọt. Chủng 1 này tồn tại trong mô cây ngô cho đến tuần 12 sau khi trồng và bắt đầu giảm xâm chiếm sau thời điểm này.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các thuật ngữ “polynucleotit”, “nucleotit”, “trình tự nucleotit”, “axit nucleic” và “oligonucleotit” được sử dụng thay thế lẫn nhau. Các thuật ngữ này chỉ dạng polyme của các nucleotit có độ dài bất kỳ, deoxyribonucleotit hoặc ribonucleotit, hoặc các chất tương tự của chúng. Các polynucleotit có thể có cấu trúc ba chiều bất kỳ, và có thể thực hiện chức năng bất kỳ, đã biết hoặc chưa biết. Sau đây là các ví dụ không mang tính giới hạn về các polynucleotit: các vùng mã hóa hoặc không mã hóa của gen hoặc đoạn gen, các locus được xác định từ phân tích liên kết, các exon, các intron, ARN thông tin (mARN), ARN vận chuyển (tARN), ARN ribosom (rARN), ARN can thiệp ngắn (siARN), ARN kẹp tóc ngắn (shARN), micro-ARN (miARN), các ribozym, ADN bổ trợ, các polynucleotit tái tổ hợp, các polynucleotit phân nhánh, các plasmit, các vectơ, ADN được phân lập có trình tự bất kỳ, ARN được phân lập có trình tự bất kỳ, đoạn dò axit nucleic, và các đoạn mồi. Polynucleotit có thể bao gồm một hoặc nhiều nucleotit được cải biến, như nucleotit được metyl hóa và các chất tương tự nucleotit. Nếu có, các cải biến đối với cấu trúc nucleotit có thể được thực

hiện trước hoặc sau khi lắp ráp polyme này. Trình tự của các nucleotit có thể bị đan xen bởi các thành phần không phải là nucleotit. Polynucleotit còn có thể được cải biến tiếp sau khi polyme hóa, như bằng cách liên hợp với thành phần đánh dấu.

“Quá trình lai hóa” chỉ phản ứng, trong đó một hoặc nhiều polynucleotit phản ứng để tạo thành một phức hợp mà được làm ổn định thông qua liên kết hydro giữa các bazơ của các gốc nucleotit. Việc liên kết hydro có thể diễn ra bằng cách ghép cặp bazơ Watson Crick, gắn kết Hoogstein, hoặc theo cách đặc hiệu trình tự khác bất kỳ theo tính bổ trợ bazơ. Phức hợp này có thể bao gồm hai sợi tạo thành cấu trúc sợi kép, ba hoặc nhiều hơn ba sợi tạo thành phức hợp nhiều sợi, sợi tự lai hóa đơn nhất, hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng. Phản ứng lai hóa có thể cấu thành một bước trong quy trình rộng hơn, như khởi đầu PCR, hoặc phân cắt bằng enzym một polynucleotit bằng endonucleaza. Trình tự thứ hai mà bổ trợ cho trình tự thứ nhất được gọi là “bổ thể” của trình tự thứ nhất. Thuật ngữ “có thể lai” như sử dụng đối với polynucleotit chỉ khả năng của polynucleotit này trong việc tạo thành phức hợp mà được làm ổn định qua liên kết hydro giữa các bazơ của các gốc nucleotit trong phản ứng lai hóa.

“Tính bổ trợ” chỉ khả năng của axit nucleic trong việc tạo thành (các) liên kết hydro với một trình tự axit nucleic khác theo kiểu Watson-Crick truyền thống hoặc không truyền thống khác. Phần trăm bổ trợ chỉ phần trăm các gốc trong một phân tử axit nucleic mà có thể tạo thành liên kết (ví dụ, ghép cặp bazơ Watson-Crick) với trình tự axit nucleic thứ hai (ví dụ, 5, 6, 7, 8, 9, 10 trong số 10 tương ứng là bổ trợ 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, và 100%). “Bổ trợ hoàn hảo” nghĩa là tất cả các gốc liên tiếp của trình tự axit nucleic sẽ liên kết hydro với các gốc liên tiếp trong trình tự axit nucleic thứ hai với cùng số lượng. “Bổ trợ về cơ bản” như được sử dụng trong bản mô tả này chỉ mức độ bổ trợ mà ít nhất là 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% trong một vùng gồm 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, hoặc nhiều hơn 50 nucleotit, hoặc chỉ hai axit nucleic mà lai hóa trong điều kiện nghiêm ngặt. Mức đồng nhất trình tự, như để đánh giá phần trăm bổ trợ, có thể được xác định bằng thuật toán cân bằng thích hợp bất kỳ, bao gồm nhưng không bị giới hạn ở thuật toán Needleman-Wunsch (ví dụ, xem phần mềm cân bằng EMBOSS Needle sẵn có ở www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/nucleotit.html, tùy ý với các cài đặt mặc

định), thuật toán BLAST (ví dụ, xem công cụ căn thẳng BLAST có sẵn ở blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi, tùy ý với các cài đặt mặc định), hoặc thuật toán Smith-Waterman (ví dụ, xem phần mềm căn thẳng EMBOSS Water sẵn có trên www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_water/nucleotit.html, tùy ý với các cài đặt mặc định). Sự căn thẳng tùy ý có thể được đánh giá bằng cách sử dụng các thông số thích hợp bất kỳ của thuật toán đã chọn, bao gồm các thông số mặc định.

Nói chung, “điều kiện nghiêm ngặt” để lai hóa chỉ các điều kiện mà trong đó axit nucleic có tính hỗ trợ với trình tự đích phần lớn lai với trình tự đích, và về cơ bản không lai với các trình tự không phải là trình tự đích. Điều kiện nghiêm ngặt thường phụ thuộc vào trình tự, và thay đổi tùy thuộc vào một số yếu tố. Nói chung, trình tự càng dài thì nhiệt độ mà ở đó trình tự này lai đặc hiệu với trình tự đích của nó càng cao. Các ví dụ không mang tính giới hạn về điều kiện nghiêm ngặt được mô tả chi tiết trong tài liệu: *Laboratory Techniques In Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization With Nucleic Acid Probes Phần I*, chương hai “Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assay”, Elsevier, N.Y, (1993) của Tijssen.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, “sự biểu hiện” chỉ quy trình trong đó polynucleotit được phiên mã từ đoạn mẫu ADN (như thành mARN hoặc bản phiên mã ARN khác bất kỳ) và/hoặc quy trình mà nhờ đó, mARN đã phiên mã sau đó được dịch mã thành các peptit, polypeptit, hoặc protein. Các bản phiên mã và các polypeptit được mã hóa có thể gọi chung là “sản phẩm gen”. Nếu polynucleotit thu được ADN hệ gen, thì quá trình biểu hiện có thể bao gồm công đoạn cắt mARN trong tế bào có nhân điển hình.

Các thuật ngữ “polypeptit”, “peptit” và “protein” được sử dụng thay thế lẫn nhau trong bản mô tả này để chỉ các polyme của axit amin có độ dài bất kỳ. Polyme này có thể là mạch thẳng hoặc mạch nhánh, có thể bao gồm các axit amin được cải biến, và có thể được xen đoạn bằng các thành phần không phải là axit amin. Các thuật ngữ này cũng có thể bao gồm polyme axit amin đã được cải biến; ví dụ, sự tạo thành liên kết disulfua, glycosyl hóa, lipid hóa, axetyl hóa, phosphoryl hóa, hoặc thao tác khác bất kỳ, như liên hợp với thành phần đánh dấu. Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “axit amin” bao gồm các axit amin tự nhiên và/hoặc phi tự nhiên

hoặc tổng hợp, bao gồm glyxin và cả các đồng phân quang học D hoặc L, và các chất tương tự axit amin và các chất bất chức peptit.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “khoảng” được sử dụng đồng nghĩa với “xấp xỉ”. Để minh họa, thì sử dụng thuật ngữ “khoảng” đối với một lượng chỉ ra rằng các giá trị có thể nằm ngoài các giá trị đã nêu, ví dụ, + hoặc – 0,1% đến 10%.

Thuật ngữ “giống cây thuần khiết sinh học” hoặc “giống cây gần như thuần khiết” chỉ giống cây của một loài vi khuẩn được mô tả trong bản mô tả này không chứa các loài vi khuẩn khác với lượng đủ để gây ảnh hưởng đến sự sao chép của giống cây hoặc phát hiện được bằng các kỹ thuật vi khuẩn học thông thường.

“Năng suất cây trồng” để chỉ chung đến khía cạnh bất kỳ về sự sinh trưởng hoặc phát triển của cây mà là lý do để trồng cây này. Đối với cây lương thực, như ngũ cốc hoặc rau, “năng suất cây trồng” có thể chỉ năng suất hạt hoặc quả thu hoạch được từ cây trồng cụ thể. Như được sử dụng trong bản mô tả này, năng suất cây trồng được cải thiện khái quát chỉ sự cải thiện về năng suất hạt, quả, hoa hoặc các bộ phận khác của cây được thu hoạch cho nhiều mục đích khác nhau, sự cải thiện sinh trưởng ở các bộ phận của cây, bao gồm, thân, lá, và rễ, sự thúc đẩy cây trồng sinh trưởng, sự duy trì hàm lượng chlorophyll cao ở lá, sự gia tăng số lượng quả hoặc hạt, sự gia tăng trọng lượng quả hoặc hạt, sự giảm phát thải NO₂ do giảm sử dụng phân bón nitơ và các cải thiện tương tự về sự sinh trưởng và phát triển của cây.

Các vi khuẩn sống trong và xung quanh cây lương thực có thể ảnh hưởng đến tính trạng của các cây này. Các tính trạng của cây mà có thể bị ảnh hưởng bởi vi khuẩn bao gồm: năng suất (ví dụ, năng suất hạt, tạo sinh khối, ra trái, đơm hoa); dinh dưỡng (ví dụ, nitơ, phospho, kali, sắt, có hàm lượng vi chất); kiểm soát stress phi sinh học (ví dụ, chịu hạn, chịu mặn, chịu nóng); và kiểm soát stress sinh học (ví dụ, sinh vật gây hại, cỏ dại, côn trùng, nấm, và vi khuẩn). Cách thức làm biến đổi tính trạng của cây trồng bao gồm: gia tăng nồng độ các chất chuyển hóa chính; thay đổi động học theo thời gian sự ảnh hưởng của vi khuẩn đến các chất chuyển hóa chính; kết nối sự sản sinh/phân huỷ chất chuyển hóa nhờ vi khuẩn với các tín hiệu môi trường mới;

giảm các chất chuyển hóa bất lợi; và cải thiện tính cân bằng của các chất chuyển hóa hoặc các protein căn bản.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, “trình tự điều khiển” chỉ gen điều khiển, trình tự khởi đầu, gen làm câm, hoặc gen kết thúc.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, “*in planta*” là ở trong cây, và trong đó cây này còn bao gồm lá, rễ, thân, hạt, noãn, phần hoa, hoa, quả, v.v..

Theo một vài phương án, các trình tự điều khiển nguyên thủy hoặc nội sinh của các gen theo sáng chế được thay thế bằng một hoặc nhiều trình tự điều khiển cùng giống.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, “đưa vào” chỉ việc đưa vào bằng công nghệ sinh học hiện đại, và không phải là cách đưa vào có trong tự nhiên.

Theo một vài phương án, các vi khuẩn theo sáng chế đã được cải biến sao cho các vi khuẩn này không phải là các vi khuẩn có trong tự nhiên.

Theo một vài phương án, các vi khuẩn theo sáng chế có mặt trong cây với lượng ít nhất là 10^3 cfu, 10^4 cfu, 10^5 cfu, 10^6 cfu, 10^7 cfu, 10^8 cfu, 10^9 cfu, 10^{10} cfu, 10^{11} cfu, hoặc 10^{12} cfu trong mỗi gam trọng lượng tươi hoặc khô của cây này. Theo một vài phương án, các vi khuẩn theo sáng chế có mặt trong cây với lượng ít nhất là khoảng 10^3 cfu, khoảng 10^4 cfu, khoảng 10^5 cfu, khoảng 10^6 cfu, khoảng 10^7 cfu, khoảng 10^8 cfu, khoảng 10^9 cfu, khoảng 10^{10} cfu, khoảng 10^{11} cfu, hoặc khoảng 10^{12} cfu trong mỗi gam trọng lượng tươi hoặc khô của cây này. Theo một vài phương án, các vi khuẩn theo sáng chế có mặt trong cây với lượng ít nhất là từ 10^3 đến 10^9 , từ 10^3 đến 10^7 , từ 10^3 đến 10^5 , từ 10^5 đến 10^9 , từ 10^5 đến 10^7 , từ 10^6 đến 10^{10} , từ 10^6 đến 10^7 cfu trong mỗi gam trọng lượng tươi hoặc khô của cây này.

Các phân bón và nitơ ngoại sinh theo sáng chế có thể bao gồm các phân tử chứa nitơ sau: amoni, nitrat, nitrit, amoniac, glutamin, v.v.. Các nguồn nitơ của sáng chế có thể bao gồm amoniac khan, amoni sulfat, ure, diamoni phosphat, dạng ure, monoamoni phosphat, amoni nitrat, các dung dịch nitơ, canxi nitrat, kali nitrat, natri nitrat, v.v..

Như được sử dụng trong bản mô tả này, “nitơ ngoại sinh” chỉ nitơ không có trong khí quyển có sẵn trong đất, thực địa hoặc môi trường sinh trưởng mà có mặt trong các điều kiện không hạn chế nitơ, bao gồm amoniac, amoni, nitrat, nitrit, ure, axit uric, các axit amoni v.v..

Như được sử dụng trong bản mô tả này, “các điều kiện không hạn chế nitơ” chỉ nitơ không có trong khí quyển có sẵn trong đất, thực địa, môi trường ở nồng độ > khoảng 4 mM nitơ, như được đề cập trong tài liệu Kant *et al.* (2010. J. Exp. Biol. 62(4):1499-1509), được viện dẫn vào đây để tham khảo.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, “vi sinh vật liên giống” là vi sinh vật được tạo ra bằng cách cố tình kết hợp vật liệu di truyền có nguồn gốc phân lập từ các sinh vật có giống phân loại khác nhau. “Thế đột biến liên giống” có thể được sử dụng thay thế lẫn nhau với “vi sinh vật liên giống”. “Vi sinh vật liên giống” lấy làm ví dụ bao gồm vi sinh vật chứa phân tử di truyền lưu động mà đầu tiên được xác định ở vi sinh vật thuộc giống khác với vi sinh vật tiếp nhận. Có thể tìm thấy phần giải thích rõ hơn, trong số nhiều tài liệu khác, trong 40 C.F.R. § 725.3.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, “vi sinh vật cùng giống” là vi sinh vật được tạo thành bằng cách cố tình kết hợp vật liệu di truyền có nguồn gốc phân lập từ các sinh vật cùng giống phân loại. “Thế đột biến cùng giống” có thể được sử dụng thay thế lẫn nhau với “vi sinh vật cùng giống”.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, “vật liệu di truyền được đưa vào” chỉ vật liệu di truyền được thêm vào, và lưu lại như một thành phần trong hệ gen của sinh vật tiếp nhận.

Theo một vài phương án, mạng lưới điều hoà di truyền đồng hóa và cố định nitơ bao gồm các polynucleotit mã hóa gen và các trình tự không mã hóa mà điều khiển, điều biến và/hoặc điều hòa quá trình cố định và/hoặc đồng hóa nitơ của vi khuẩn và có thể bao gồm các trình tự polynucleotit của cụm *nif* (ví dụ, *nifA*, *nifB*, *nifC*,.....*nifZ*), các polynucleotit mã hóa protein điều hoà nitơ C, các polynucleotit mã hóa protein điều hoà nitơ B, các trình tự polynucleotit của cụm *gln* (ví dụ *glnA* và *glnD*), *draT*, và enzym vận chuyển/thẩm thấu amoniac.

Theo một vài phương án, phân bón theo sáng chế chứa nitơ với lượng ít nhất là 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% trọng lượng.

Theo một vài phương án, phân bón theo sáng chế chứa nitơ với lượng ít nhất khoảng 5%, khoảng 6%, khoảng 7%, khoảng 8%, khoảng 9%, khoảng 10%, khoảng 11%, khoảng 12%, khoảng 13%, khoảng 14%, khoảng 15%, khoảng 16%, khoảng 17%, khoảng 18%, khoảng 19%, khoảng 20%, khoảng 21%, khoảng 22%, khoảng 23%, khoảng 24%, khoảng 25%, khoảng 26%, khoảng 27%, khoảng 28%, khoảng 29%, khoảng 30%, khoảng 31%, khoảng 32%, khoảng 33%, khoảng 34%, khoảng 35%, khoảng 36%, khoảng 37%, khoảng 38%, khoảng 39%, khoảng 40%, khoảng 41%, khoảng 42%, khoảng 43%, khoảng 44%, khoảng 45%, khoảng 46%, khoảng 47%, khoảng 48%, khoảng 49%, khoảng 50%, khoảng 51%, khoảng 52%, khoảng 53%, khoảng 54%, khoảng 55%, khoảng 56%, khoảng 57%, khoảng 58%, khoảng 59%, khoảng 60%, khoảng 61%, khoảng 62%, khoảng 63%, khoảng 64%, khoảng 65%, khoảng 66%, khoảng 67%, khoảng 68%, khoảng 69%, khoảng 70%, khoảng 71%, khoảng 72%, khoảng 73%, khoảng 74%, khoảng 75%, khoảng 76%, khoảng 77%, khoảng 78%, khoảng 79%, khoảng 80%, khoảng 81%, khoảng 82%, khoảng 83%, khoảng 84%, khoảng 85%, khoảng 86%, khoảng 87%, khoảng 88%, khoảng 89%, khoảng 90%, khoảng 91%, khoảng 92%, khoảng 93%, khoảng 94%, khoảng 95%, khoảng 96%, khoảng 97%, khoảng 98%, hoặc khoảng 99% trọng lượng.

Theo một vài phương án, phân bón theo sáng chế chứa nitơ với lượng nằm trong khoảng từ 5% đến 50%, khoảng từ 5% đến 75%, khoảng từ 10% đến 50%, khoảng từ 10% đến 75%, khoảng từ 15% đến 50%, khoảng từ 15% đến 75%, khoảng từ 20% đến 50%, khoảng từ 20% đến 75%, khoảng từ 25% đến 50%, khoảng từ 25% đến 75%, khoảng từ 30% đến 50%, khoảng từ 30% đến 75%, khoảng từ 35% đến 50%, khoảng từ 35% đến 75%, khoảng từ 40% đến 50%, khoảng từ 40% đến 75%,

khoảng từ 45% đến 50%, khoảng từ 45% đến 75%, hoặc khoảng từ 50% đến 75% trọng lượng.

Theo một vài phương án, sự gia tăng cố định nitơ và/hoặc sản sinh nitơ ở mức 1% hoặc cao hơn ở cây được xác định so với các cây đối chứng không được phơi nhiễm với vi khuẩn theo sáng chế. Tất cả các mức tăng hoặc giảm vi khuẩn được xác định so với các vi khuẩn đối chứng. Tất cả các mức tăng hoặc giảm ở cây được xác định so với các cây đối chứng.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, “trình tự khởi đầu cơ định” là trình tự khởi đầu hoạt động trong hầu hết các điều kiện và/hoặc trong hầu hết các giai đoạn phát triển. Có một vài lợi ích đối với việc sử dụng các trình tự khởi đầu cơ định trong các vector biểu hiện được sử dụng trong công nghệ sinh học, như: sản sinh ở mức cao các protein được sử dụng để chọn lọc các tế bào hoặc sinh vật chuyển gen; biểu hiện ở mức cao các protein báo cáo hoặc các chỉ thị dễ cho điểm, cho phép phát hiện và định lượng dễ dàng; sản sinh ở mức cao yếu tố phiên mã mà là một phần của hệ điều hoà phiên mã; sản sinh các hợp chất cần hoạt tính phổ biến ở sinh vật này; và sản sinh các hợp chất cần thiết cho tất cả các giai đoạn phát triển. Các trình tự khởi đầu cơ định lấy làm ví dụ không mang tính giới hạn bao gồm, trình tự khởi đầu CaMV 35S, trình tự khởi đầu opine, trình tự khởi đầu ubiquitin, trình tự khởi đầu alcohol dehydrogenase, v.v..

Như được sử dụng trong bản mô tả này, “trình tự khởi đầu không cơ định” là trình tự khởi đầu hoạt động trong một số điều kiện nhất định, ở một số loại tế bào nhất định, và/hoặc trong một số giai đoạn phát triển nhất định. Ví dụ, trình tự khởi đầu đặc hiệu mô, trình tự khởi đầu được ưu tiên trong mô, trình tự khởi đầu đặc hiệu loại tế bào, trình tự khởi đầu được ưu tiên trong loại tế bào, trình tự khởi đầu dễ cảm ứng, và trình tự khởi đầu chịu sự kiểm soát phát triển là các trình tự khởi đầu không cơ định. Các ví dụ về trình tự khởi đầu chịu sự kiểm soát phát triển bao gồm các trình tự khởi đầu ưu tiên khởi đầu quá trình phiên mã ở các mô nhất định.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, trình tự khởi đầu “dễ cảm ứng” hoặc “dễ ức chế” là trình tự khởi đầu chịu sự kiểm soát của hóa chất hoặc các yếu tố môi trường. Ví dụ về các điều kiện môi trường mà có thể ảnh hưởng đến quá trình phiên

mã bằng các trình tự khởi đầu dễ cảm ứng bao gồm các điều kiện kỵ khí, một số hóa chất, ánh sáng, điều kiện axit hoặc bazơ, v.v..

Như được sử dụng trong bản mô tả này, trình tự khởi đầu “đặc hiệu mô” là trình tự khởi đầu khởi đầu quá trình phiên mã chỉ ở một số mô nhất định. Khác với sự biểu hiện cơ định của gen, biểu hiện đặc hiệu mô là kết quả của một vài mức tương tác của quá trình điều hoà gen. Do đó, trong lĩnh vực này, đôi khi ưu tiên sử dụng các trình tự khởi đầu từ các loài tương đồng hoặc có mối quan hệ gần để đạt được sự biểu hiện hiệu quả và tin cậy của các gen chuyển ở các mô cụ thể. Đây là một trong số các lý do chính vì sao một lượng lớn trình tự khởi đầu đặc hiệu mô phân lập từ các mô cụ thể được tìm thấy trong tài liệu khoa học và sáng chế.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “được liên kết có điều khiển với” chỉ sự kết hợp của các trình tự axit nucleic trên một đoạn axit nucleic đơn nhất sao cho chức năng của một trình tự được điều hoà bởi trình tự kia. Ví dụ, trình tự khởi đầu được liên kết có điều khiển với trình tự mã hóa khi nó có khả năng điều hoà quá trình biểu hiện của trình tự mã hóa đó (nghĩa là, trình tự mã hóa chịu sự kiểm soát phiên mã của trình tự khởi đầu). Các trình tự mã hóa có thể được liên kết có điều khiển với các trình tự điều hoà theo hướng có nghĩa hoặc đối nghĩa. Theo một ví dụ khác, các vùng ARN hỗ trợ theo sáng chế có thể được liên kết có điều khiển với, trực tiếp hoặc gián tiếp, đầu 5' của mARN đích, hoặc đầu 3' của mARN đích, hoặc trong phạm vi mARN đích, hoặc vùng hỗ trợ thứ nhất là đầu 5' và bổ thể của nó là đầu 3' của mARN đích.

Một tính trạng có thể nhắm tới để điều hoà bằng các phương pháp được mô tả trong bản mô tả này là tính trạng cố định nitơ. Nitơ phân bón là chi phí vận hành lớn nhất cho một trang trại và yếu tố điều khiển lớn nhất để có năng suất cao hơn ở các cây trồng theo luống như cây ngô và cây lúa mì. Được mô tả trong bản mô tả này là các sản phẩm vi khuẩn mà có thể phân phối các dạng có thể tái sinh của nitơ ở cây trồng không phải họ đậu. Mặc dù một số loài nội sinh có tính trạng di truyền cần cho việc cố định nitơ trong môi trường nuôi cấy tinh khiết, nhưng thách thức cơ bản về mặt kỹ thuật là các loài nội sinh kiểu hoang của cây ngũ cốc và cây cỏ ngừng cố định nitơ trên thực địa có bón phân. Việc sử dụng các phân bón hóa học và nồng độ nitơ

du trong đất trên thực địa báo hiệu cho vi khuẩn đóng con đường sinh hóa để cố định nitơ.

Các thay đổi ở mức độ phiên mã và sau dịch mã của mạng lưới điều hoà cố định nitơ là cần thiết để phát triển vi khuẩn có khả năng cố định và chuyển nitơ sang cây ngô khi có mặt phân bón. Nhằm mục đích này, được mô tả trong bản mô tả này là công nghệ Tiến hóa Vi khuẩn-Vật chủ (HoME) để giúp tiến hóa một cách chính xác mạng lưới điều hoà và tạo ra các kiểu hình mới. Cũng được mô tả trong bản mô tả này là thư viện độc nhất, độc quyền gồm các loài nội sinh cố định nitơ từ cây ngô, kết hợp với dữ liệu omics chuyên sâu xung quanh tương tác của các vi khuẩn và thực vật chủ trong các điều kiện môi trường khác nhau như thiếu và dư nitơ. Kỹ thuật này cho phép tiến hóa chính xác mạng lưới điều hoà di truyền của các loài nội sinh để tạo ra các vi khuẩn chủ động cố định nitơ ngay cả khi có mặt phân bón ở thực địa. Cũng được mô tả trong bản mô tả này là các đánh giá về tiềm năng kỹ thuật của việc tiến hóa các vi khuẩn mà xâm chiếm mô rễ cây ngô và sản sinh nitơ cho các cây đã được bón phân và đánh giá tính tương thích của các loài nội sinh với thực tiễn phối trộn chuẩn và phân loại đất để xác định tính khả thi của việc tích hợp các vi khuẩn này vào các chiến lược quản lý nitơ hiện đại.

Để sử dụng nitơ nguyên tố (N) để tổng hợp hóa học, thì các dạng sinh sống kết hợp khí nitơ (N_2) có sẵn trong khí quyển với hydro trong quy trình đã biết là quy trình cố định nitơ. Do bản chất tiêu tốn năng lượng của quá trình cố định nitơ sinh học, nên các sinh vật cố định nitơ (các vi khuẩn và các cổ khuẩn cố định khí nitơ trong khí quyển) đã tiến hóa phức tạp và điều hoà chặt chẽ cụm gen *nif* để đáp ứng với oxy môi trường và nitơ có sẵn. Các gen *Nif* mã hóa các enzym tham gia vào quá trình cố định nitơ (như phức hợp nitrogenaza) và các protein điều hoà quá trình cố định nitơ. Shamseldin (2013. Global J. Biotechnol. Biochem. 8(4):84-94) mô tả chi tiết các gen *nif* và các sản phẩm của chúng, và tài liệu này được viện dẫn vào đây để tham khảo. Được mô tả trong bản mô tả này là các phương pháp tạo ra cây có tính trạng được cải thiện bao gồm các bước: phân lập vi khuẩn từ cây thứ nhất, đưa biến dị di truyền vào gen *nif* của vi khuẩn đã phân lập, phơi nhiễm cây thứ hai với vi khuẩn biến thể này, phân lập vi khuẩn từ cây thứ hai có tính trạng được cải thiện so với cây thứ nhất, và lặp lại các bước này với các vi khuẩn được phân lập từ cây thứ hai.

Ở *Proteobacteria*, sự điều hoà quá trình cố định nitơ tập trung xung quanh protein NifA liên kết với gen tăng cường phụ thuộc σ_{54} , chất điều hoà phiên mã dương của cụm *nif*. Các nồng độ nội bào của NifA hoạt tính được kiểm soát bởi hai yếu tố chính: sự phiên mã của operon *nifLA*, và sự ức chế hoạt tính NifA bằng tương tác protein-protein với NifL. Cả hai quy trình này đều đáp ứng với các nồng độ glutamin nội bào thông qua dòng thác truyền tín hiệu protein PII. Dòng thác này được điều tiết bởi GlnD, mà trực tiếp cảm nhận nồng độ glutamin và xúc tác quá trình uridyl hóa hoặc khử uridyl hóa của hai protein điều hoà PII – GlnB và GlnK – lần lượt đáp lại việc không có hoặc có glutamin liên kết. Trong các điều kiện dư nitơ, các GlnB chưa cải biến báo hiệu sự giải hoạt trình tự khởi đầu *nifLA*. Tuy nhiên, trong điều kiện hạn chế nitơ, GlnB được cải biến sau dịch mã mà ức chế hoạt tính của nó và dẫn đến phiên mã operon *nifLA*. Theo cách này, quá trình phiên mã *nifLA* được kiểm soát chặt chẽ đáp ứng với nitơ trong môi trường thông qua dòng thác truyền tín hiệu protein PII. Ở mức điều hoà NifA sau dịch mã, GlnK ức chế tương tác NifL/NifA về bản chất tùy thuộc vào nồng độ toàn phần của GlnK tự do có trong tế bào.

NifA được phiên mã từ operon *nifLA*, mà trình tự khởi đầu của nó được hoạt hóa bởi NtrC đã phosphoryl hóa, một chất điều hoà phụ thuộc σ_{54} khác. Trạng thái phosphoryl hóa của NtrC được điều tiết bởi histidin kinaza NtrB, enzym này tương tác với GlnB đã khử uridyl hóa, mà không tương tác với GlnB được uridyl hóa. Trong điều kiện dư nitơ, nồng độ nội bào cao của glutamin dẫn đến việc khử uridyl hóa GlnB mà sau đó tương tác với NtrB để giải hoạt hoạt tính phosphoryl hóa của nó và kích hoạt hoạt tính phosphatase của nó, dẫn đến khử phosphoryl hóa NtrC và khử hoạt trình tự khởi đầu *nifLA*. Tuy nhiên, trong điều kiện hạn chế nitơ, nồng độ glutamin nội bào thấp dẫn đến việc uridyl hóa GlnB mà sẽ ức chế tương tác của nó với NtrB và cho phép phosphoryl hóa NtrC và phiên mã operon *nifLA*. Theo cách này, mức biểu hiện *nifLA* được kiểm soát chặt chẽ đáp ứng với nitơ môi trường thông qua dòng thác truyền tín hiệu protein PII. *nifA*, *ntrB*, *ntrC*, và *glnB* đều là các gen có thể được đột biến theo các phương pháp được mô tả trong bản mô tả này.

Hoạt tính của NifA cũng được điều hoà sau dịch mã đáp ứng với nitơ môi trường, điển hình nhất là thông qua sự ức chế hoạt tính NifA qua trung gian NifL. Nói chung, tương tác của NifL và NifA bị ảnh hưởng bởi dòng thác truyền tín hiệu

protein PII thông qua GlnK, mặc dù bản chất của các tương tác giữa GlnK và NifL/NifA khác nhau đáng kể giữa các sinh vật cố định nitơ. Ở *Klebsiella pneumoniae*, cả hai dạng GlnK đều ức chế tương tác NifL/NifA, và tương tác giữa GlnK và NifL/NifA được xác định theo nồng độ toàn phần của GlnK tự do có trong tế bào. Trong điều kiện dư nitơ, GlnK đã khử uridyl hóa tương tác với chất vận chuyển amoni AmtB mà có vai trò ngăn chặn sự hấp thụ amoni của AmtB và cô lập GlnK với màng tế bào, cho phép NifL ức chế NifA. Mặt khác, ở *Azotobacter vinelandii*, tương tác với GlnK đã khử uridyl hóa là cần thiết cho tương tác NifL/NifA và ức chế NifA, trong khi việc uridyl hóa GlnK ức chế tương tác của nó với NifL. Ở các sinh vật cố định nitơ thiếu gen *nifL*, có bằng chứng cho thấy là hoạt tính NifA bị ức chế trực tiếp bởi tương tác với các dạng đã khử uridyl hóa của cả GlnK và GlnB trong điều kiện dư nitơ. Bất kể theo cơ chế nào, thì việc ức chế NifA sau dịch mã cũng là yếu tố điều hoà quan trọng của cụm *nif* ở phần lớn các sinh vật cố định nitơ đã biết. Ngoài ra, *nifL*, *amtB*, và *glnK* là các gen có thể được đột biến theo các phương pháp được mô tả trong bản mô tả này.

Ngoài việc điều hoà sự phiên mã của cụm gen *nif*, nhiều sinh vật cố định nitơ đã tiến hóa một cơ chế để cải biến sau dịch mã trực tiếp và tự ức chế enzym nitrogenaza, còn gọi là tắt nitrogenaza. Quá trình này được điều tiết bởi sự ADP-ribosyl hóa của protein Fe (NifH) trong điều kiện dư nitơ, gây phá vỡ tương tác của nó với phức hợp protein MoFe (NifDK) và loại bỏ hoạt tính nitrogenaza. DraT xúc tác sự ADP-ribosyl hóa của protein Fe và chặn nitrogenaza, trong khi DraG xúc tác sự loại bỏ ADP-riboza và tái hoạt hóa nitrogenaza. Như cùng với việc phiên mã *nifLA* và ức chế NifA, việc chặn nitrogenaza cũng được điều hoà thông qua dòng thác truyền tín hiệu protein PII. Trong điều kiện dư nitơ, GlnB đã khử uridyl hóa tương tác với và hoạt hóa DraT, trong khi GlnK đã khử uridyl hóa tương tác với cả DraG và AmtB để tạo ra phức hợp, phức hợp này cô lập DraG với màng tế bào. Trong điều kiện hạn chế nitơ, các dạng đã uridyl hóa của GlnB và GlnK lần lượt không tương tác với DraT và DraG, dẫn đến làm bất hoạt DraT và khuếch tán DraG đến protein Fe, tại đây nó loại bỏ ADP-riboza và hoạt hóa nitrogenaza. Các phương pháp được mô tả trong bản mô tả này cũng bao gồm bước đưa biến dị di truyền vào các gen *nifH*, *nifD*, *nifK*, và *draT*.

Mặc dù một vài loài nội sinh có khả năng cố định nitơ *in vitro*, các đặc tính di truyền này thường bị câm trên thực địa do nồng độ cao của các phân bón hóa học ngoại sinh. Có thể tách rời sự cảm nhận của nitơ ngoại sinh khỏi sự biểu hiện của enzym nitrogenaza để tạo thuận lợi cho việc cố định nitơ ngoài thực địa. Việc cải thiện sự nguyên vẹn của hoạt tính nitrogenaza theo thời gian còn nhằm làm tăng sản sinh nitơ để cho cây trồng tiêu thụ. Các đích đặc hiệu cho biến dị di truyền để tạo thuận lợi cho quá trình cố định nitơ ngoài thực địa bằng cách sử dụng các phương pháp được mô tả trong bản mô tả này bao gồm một hoặc nhiều gen được chọn từ nhóm gồm *nifA*, *nifL*, *ntrB*, *ntrC*, *glnA*, *glnB*, *glnK*, *draT*, *amtB*, *glnD*, *glnE*, *nifJ*, *nifH*, *nifD*, *nifK*, *nifY*, *nifE*, *nifN*, *nifU*, *nifS*, *nifV*, *nifW*, *nifZ*, *nifM*, *nifF*, *nifB*, và *nifQ*.

Một đích bổ sung cho biến dị di truyền để tạo thuận lợi cho việc cố định nitơ ngoài thực địa bằng cách sử dụng các phương pháp được mô tả trong bản mô tả này là protein NifA. Protein NifA thường là chất hoạt hóa để biểu hiện các gen cố định nitơ. Việc tăng sản sinh NifA (cố định hoặc trong điều kiện amoniac cao) can thiệp vào con đường cảm nhận nồng độ amoniac nguyên thủy. Ngoài ra, việc giảm sản sinh các protein NifL, một chất ức chế đã biết của NifA, cũng dẫn đến việc làm tăng nồng độ NifA hoạt tính tự do. Ngoài ra, việc tăng mức độ phiên mã của operon *nifAL* (cố định hoặc trong điều kiện amoniac cao) cũng dẫn đến nồng độ protein NifA toàn phần cao hơn. Mức biểu hiện *nifAL* gia tăng đạt được bằng cách làm biến đổi chính trình tự khởi đầu hoặc bằng cách làm giảm sự biểu hiện của *NtrB* (một phần của dòng thác truyền tín hiệu *ntrB* và *ntrC* mà ban đầu sẽ dẫn đến chặn operon *nifAL* trong điều kiện nitơ cao). Nồng độ cao của NifA đạt được bằng các phương pháp này hoặc phương pháp khác bất kỳ được mô tả trong bản mô tả này làm gia tăng hoạt tính cố định nitơ của các loài nội sinh.

Một đích khác cho biến dị di truyền để tạo thuận lợi cho việc cố định nitơ ngoài thực địa bằng cách sử dụng các phương pháp được mô tả trong bản mô tả này là dòng thác truyền tín hiệu PII *GlnD/GlnB/GlnK*. Nồng độ glutamin nội bào được cảm nhận thông qua dòng thác truyền tín hiệu PII *GlnD/GlnB/GlnK* PII. Các đột biến vị trí hoạt động ở *GlnD* mà loại bỏ hoạt tính loại bỏ uridylyl của *GlnD* phá vỡ dòng thác cảm nhận nitơ. Ngoài ra, sự giảm nồng độ *GlnB* làm đoạn mạch dòng thác cảm

nhận glutamin. Các đột biến này “lừa” các tế bào cảm nhận tình trạng hạn chế nitơ, nhờ đó là tăng hoạt tính cố định nitơ.

Protein amtB cũng là đích cho biến dị di truyền để tạo thuận lợi cho việc cố định nitơ ngoài thực địa bằng cách sử dụng các phương pháp được mô tả trong bản mô tả này. Sự hấp thụ amoniac từ môi trường có thể giảm đi bằng cách làm giảm mức biểu hiện của protein amtB. Khi không có amoniac nội bào thì loài nội sinh không thể cảm nhận được nồng độ amoniac cao, điều này ngăn việc điều hoà giảm các gen cố định nitơ. Amoniac bất kỳ kiểm soát để vào được đến khoang nội bào được chuyển hóa thành glutamin. Nồng độ glutamin nội bào là dòng cảm nhận nồng độ nitơ chính. Việc giảm nồng độ glutamin nội bào ngăn không cho các tế bào này cảm nhận nồng độ amoni cao trong môi trường. Có thể đạt được việc giảm này bằng cách làm gia tăng mức biểu hiện của glutaminaza, một enzyme chuyển hóa glutamin thành glutamat. Ngoài ra, glutamin nội bào cũng có thể giảm đi bằng cách giảm thiểu glutamin synthetaza (enzym chuyển hóa amoniac thành glutamin). Ở các sinh vật cố định nitơ, amoniac đã cố định được đồng hóa nhanh chóng thành glutamin và glutamat để sử dụng cho các quá trình của tế bào. Việc phá vỡ sự đồng hóa amoniac có thể thúc đẩy việc chuyển nitơ đã cố định ra khỏi tế bào dưới dạng amoniac. Amoniac đã cố định chủ yếu được đồng hóa thành glutamin bằng glutamin synthetaza (GS), được mã hóa bởi *glnA*, và sau đó thành glutamin bằng glutamin oxoglutarat aminotransferaza (GOGAT). Trong một vài ví dụ, *glnS* mã hóa glutamin synthetaza. GS được điều hoà sau dịch mã bởi GS adenylyl transferaza (GlnE), một enzym hai chức năng được mã hóa bởi *glnE* xúc tác cả quá trình adenylyl hóa và khử adenylyl hóa của GS thông qua hoạt tính tương ứng của miền adenylyl-transferaza (AT) và miền loại bỏ adenylyl (AR) của nó. Trong điều kiện hạn chế nitơ, *glnA* được biểu hiện, và miền AR của GlnE khử adenylyl hóa GS, cho phép enzym này hoạt động. Trong điều kiện dư nitơ, sự biểu hiện *glnA* bị ngắt, và miền AT của GlnE được hoạt hóa theo cách dị lập thể bởi glutamin, gây sự adenylyl hóa và giải hoạt GS.

Hơn nữa, gen *draT* cũng có thể là đích cho biến dị di truyền để tạo thuận lợi cho việc cố định nitơ ngoài thực địa bằng cách sử dụng các phương pháp được mô tả trong bản mô tả này. Khi tế bào sản sinh các enzym cố định nitơ, thì việc chặn nitrogenaza thể hiện một mức độ khác, trong đó tế bào điều hoà giảm hoạt tính cố

định trong điều kiện nitơ cao. Tình trạng chặn này có thể được loại bỏ bằng cách làm giảm mức biểu hiện của DraT.

Có thể tiến hành các phương pháp truyền kiểu hình vi khuẩn mới ở các mức phiên mã, dịch mã và sau dịch mã. Mức phiên mã bao gồm các thay đổi ở trình tự khởi đầu (như thay đổi ái lực yếu tố sigma hoặc các vị trí gắn kết của các yếu tố phiên mã, bao gồm làm khuyết toàn bộ hoặc một đoạn trình tự khởi đầu) hoặc thay đổi gen kết thúc và gen suy giảm sự phiên mã. Mức dịch mã bao gồm các thay đổi ở các vị trí gắn kết ribosom và thay đổi các tín hiệu thoái biến mRNA. Mức sau dịch mã bao gồm đột biến vị trí hoạt tính của enzyme và thay đổi tương tác protein-protein. Có thể đạt được các thay đổi này theo nhiều cách. Có thể đạt được sự giảm mức biểu hiện (hoặc loại bỏ hoàn toàn) bằng cách hoán đổi vị trí gắn kết ribosom (RBS) nguyên thủy hoặc trình tự khởi đầu với vị trí/gen khác có cường độ/hiệu suất thấp hơn. Có thể hoán đổi các vị trí bắt đầu ATG thành codon bắt đầu GTG, TTG, hoặc CTG, mà dẫn đến việc giảm hoạt tính dịch mã của vùng mã hóa. Có thể tiến hành loại bỏ hoàn toàn sự biểu hiện bằng cách làm bất hoạt (làm khuyết) vùng mã hóa của gen. Việc chuyển khung khung đọc mở (ORF) có thể tạo ra codon dừng sớm trong ORF, nhờ đó tạo ra sản phẩm bị cắt ngắn không chức năng. Việc cài xen các codon dừng trong khung tương tự cũng sẽ tạo ra sản phẩm bị cắt ngắn không chức năng. Việc thêm đuôi thoái biến vào ở đầu tận N hoặc đầu tận C cũng có thể được thực hiện để làm giảm nồng độ hữu hiệu của một gen cụ thể.

Ngược lại, mức biểu hiện của các gen được mô tả trong bản mô tả này có thể đạt được bằng cách sử dụng một trình tự khởi đầu mạnh hơn. Để đảm bảo hoạt tính trình tự khởi đầu cao trong điều kiện nồng độ nitơ cao (hoặc điều kiện khác bất kỳ), có thể lấy được profin phiên mã của toàn bộ hệ gen trong điều kiện nồng độ nitơ cao, và chọn được các trình tự khởi đầu hoạt động với mức phiên mã mong muốn từ bộ dữ liệu đó để thay thế trình tự khởi đầu yếu. Các codon bắt đầu yếu có thể được hoán đổi bằng codon bắt đầu ATG để có hiệu suất khởi đầu dịch mã tốt hơn. Các vị trí gắn kết ribosom (RBS) yếu cũng có thể được hoán đổi bằng RBS khác có hiệu suất khởi đầu dịch mã tốt hơn. Ngoài ra, cũng có thể tiến hành gây đột biến đặc hiệu vị trí để biến đổi hoạt tính của enzyme.

Việc tăng mức cố định nitơ diễn ra trong cây có thể dẫn đến việc làm giảm lượng phân bón hóa học cần thiết cho sản xuất trồng trọt và giảm lượng phát thải khí nhà kính (ví dụ, oxit nitơ).

Cây chuyển theo dây

Có thể sản xuất được các vi khuẩn để cải thiện tính trạng cây trồng (ví dụ, cố định nitơ) thông qua cây chuyển theo dây. Có thể tiến hành quy trình cây chuyển này bằng cách chọn lọc các cây có tính trạng được cải thiện cụ thể mà bị ảnh hưởng bởi hệ vi khuẩn, ngoài việc nhận biết các vi khuẩn và/hoặc chế phẩm có khả năng truyền một hoặc nhiều tính trạng được cải thiện cho một hoặc nhiều cây trồng. Một phương pháp sản xuất vi khuẩn để cải thiện tính trạng của cây trồng bao gồm các bước: (a) phân lập vi khuẩn từ mô hoặc đất của cây thứ nhất; (b) đưa một biến dị di truyền vào một hoặc nhiều vi khuẩn này để tạo ra một hoặc nhiều vi khuẩn biến thể; (c) phơi nhiễm các cây với vi khuẩn biến thể này; (d) phân lập vi khuẩn từ mô hoặc đất của một trong các cây này, trong đó cây mà vi khuẩn này được phân lập từ đó có tính trạng được cải thiện so với các cây còn lại trong số các cây này; và (e) lặp lại các bước từ (b) đến (d) với các vi khuẩn được phân lập từ cây có tính trạng được cải thiện (bước d)). Các bước từ (b) đến (d) có thể được lặp lại nhiều lần (ví dụ, một lần, hai lần, ba lần, bốn lần, năm lần, mười lần, hoặc nhiều hơn mười lần) cho đến khi tính trạng được cải thiện ở cây đạt đến mức mong muốn. Hơn nữa, nhiều cây có thể là nhiều hơn hai cây, như từ 10 đến 20 cây, hoặc 20 hoặc nhiều hơn 20, 50 hoặc nhiều hơn 50, 100 hoặc nhiều hơn 100, 300 hoặc nhiều hơn 300, 500 hoặc nhiều hơn 500, hoặc 1000 hoặc nhiều hơn 1000.

Ngoài việc thu được cây có tính trạng được cải thiện, còn thu được quần thể vi khuẩn bao gồm các vi khuẩn chứa một hoặc nhiều biến dị di truyền đã được đưa vào một hoặc nhiều gen (ví dụ, gen điều hoà sự cố định nitơ). Bằng cách lặp lại các bước được mô tả ở trên, có thể thu được quần thể vi khuẩn gồm các thành viên thích hợp nhất trong quần thể có tương quan với tính trạng của cây đang quan tâm. Các vi khuẩn trong quần thể này có thể được nhận biết và các tính chất có lợi của chúng được xác định, như bằng cách phân tích di truyền và/hoặc phân tích kiểu hình. Có thể phân tích di truyền đối với vi khuẩn đã phân lập ở bước (a). Có thể thu được thông tin kiểu hình và/hoặc kiểu gen bằng cách sử dụng các kỹ thuật bao gồm: sàng lọc

năng suất cao các thành phần hóa học có nguồn gốc thực vật, các kỹ thuật giải trình tự bao gồm giải trình tự năng suất cao của vật liệu di truyền, các kỹ thuật biểu hiện vi sai (bao gồm DDRT-PCR, và DD-PCR), kỹ thuật vi dây axit nucleic, ARN-seq (Whole Transcriptome Shotgun Sequencing), và qRT-PCR (PCR định lượng thời gian thực). Thông tin thu được có thể được sử dụng để có được thông tin profin quần xã về đặc điểm nhận dạng và hoạt tính của các vi khuẩn có mặt, như phân tích phát sinh loài hoặc sàng lọc dựa trên vi dây các axit nucleic mã hóa các thành phần operon ARN ribosom hoặc các locus thông tin về taxon khác. Các ví dụ về các locus thông tin về taxon bao gồm gen 16S ARN ribosom, gen 23S ARN ribosom, gen 5S ARN ribosom, gen 5.8S ARN ribosom gen, gen 12S ARN ribosom, gen 18S ARN ribosom, gen 28S ARN ribosom, gen *gyrB*, gen *rpoB*, gen *fusA*, gen *recA*, gen *coxI*, gen *nifD*. Các quy trình lấy làm ví dụ để xác định profin taxon để xác định các taxon có mặt trong quần thể được mô tả trong US20140155283. Việc nhận biết vi khuẩn có thể bao gồm bước xác định đặc tính hoạt tính của một hoặc nhiều gen hoặc một hoặc nhiều con đường tín hiệu, như các gen liên quan đến con đường cố định nitơ. Các tương tác hiệp đồng (trong đó hai thành phần, khi kết hợp chúng với nhau, làm tăng tác dụng mong muốn ở mức độ lớn hơn mức cộng hợp) giữa các loài vi khuẩn khác nhau cũng có thể có mặt trong các quần thể vi khuẩn này.

Biến dị di truyền có thể là gen được chọn từ nhóm gồm: *nifA*, *nifL*, *ntrB*, *ntrC*, *glnA*, *glnB*, *glnK*, *draT*, *amtB*, *glnD*, *glnE*, *nifJ*, *nifH*, *nifD*, *nifK*, *nifY*, *nifE*, *nifN*, *nifU*, *nifS*, *nifV*, *nifW*, *nifZ*, *nifM*, *nifF*, *nifB*, và *nifQ*. Biến dị di truyền có thể là sự biến đổi ở gen mã hóa protein có nhóm chức được chọn từ nhóm gồm: glutamin synthetaza, glutaminaza, glutamin synthetaza adenyltransferaza, chất hoạt hóa phiên mã, chất chống hoạt hóa phiên mã, pyruvat flavodoxin oxidoreductaza, flavodoxin, hoặc NAD⁺-dinitro-reductaza ADP-D-ribosyltransferaza. Biến dị di truyền có thể là đột biến dẫn đến một hoặc nhiều đặc tính trong số: tăng biểu hiện hoặc hoạt tính của NifA hoặc glutaminaza; giảm biểu hiện hoặc hoạt tính của NifL, NtrB, glutamin synthetaza, GlnB, GlnK, DraT, AmtB; giảm hoạt tính loại bỏ adenyl giảm của GlnE; hoặc giảm hoạt tính loại bỏ uridylyl của GlnD. Việc đưa biến dị di truyền có thể bao gồm việc cài xen và/hoặc làm khuyết một hoặc nhiều nucleotit ở vị trí đích, như 1, 2, 3, 4, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, hoặc nhiều hơn 500 nucleotit. Biến dị di truyền đã được

đưa vào một hoặc nhiều vi khuẩn theo các phương pháp được mô tả trong bản mô tả này có thể là đột biến bất hoạt gen (ví dụ làm khuyết trình tự khởi đầu, cài xen hoặc làm khuyết để tạo ra codon dừng sớm, làm khuyết toàn bộ gen), hoặc có thể là loại bỏ hoặc làm mất hoạt tính của miền protein (ví dụ thể đột biến điểm tác động đến vị trí hoạt động, hoặc làm khuyết một đoạn gen mã hóa đoạn tương ứng của sản phẩm protein), hoặc có thể biến đổi hoặc làm mất trình tự điều hoà của gen đích. Cũng có thể cài xen một hoặc nhiều trình tự điều hoà, bao gồm các trình tự điều hoà khác loài và trình tự điều hoà tìm thấy trong hệ gen của các loài hoặc giống vi khuẩn tương ứng với vi khuẩn mà biến dị di truyền được đưa vào đó. Hơn nữa, có thể chọn lọc các trình tự điều hoà dựa vào mức biểu hiện của gen trong giống cây vi khuẩn hoặc trong mô cây. Biến dị di truyền có thể là biến dị di truyền định trước được đưa một cách đặc hiệu vào vị trí đích. Biến dị di truyền có thể là đột biến ngẫu nhiên trong phạm vi vị trí đích. Biến dị di truyền có thể là cài biến cài xen hoặc làm khuyết một hoặc nhiều nucleotit. Trong một vài trường hợp, nhiều biến dị di truyền khác nhau (ví dụ 2, 3, 4, 5, 10, hoặc nhiều hơn 10) được đưa vào một hoặc nhiều vi khuẩn được phân lập trước khi phơi nhiễm vi khuẩn này cho các cây để đánh giá sự cải thiện tính trạng. Nhiều biến dị di truyền có thể thuộc loại thay đổi bất kỳ trong số các loại nêu trên, cùng loại hoặc các loại khác nhau, và theo tổ hợp bất kỳ. Trong một vài trường hợp, nhiều biến dị di truyền khác nhau được đưa vào lần lượt, đưa biến dị di truyền thứ nhất vào sau bước phân lập thứ nhất, biến dị di truyền thứ hai sau bước phân lập thứ hai, và v.v. để tích lũy nhiều biến dị di truyền trong các vi khuẩn truyền các tính trạng được cải thiện từ từ ở các cây liên quan.

Nói chung, thuật ngữ “biến dị di truyền” chỉ thay đổi bất kỳ được đưa vào trình tự polynucleotit so với polynucleotit tham chiếu, như hệ gen tham chiếu hoặc một phần của nó, hoặc gen tham chiếu hoặc một phần của nó. Biến dị di truyền có thể được gọi là “đột biến”, và trình tự hoặc sinh vật chứa biến dị di truyền có thể được gọi là “biến thể di truyền” hoặc “thể đột biến”. Biến dị di truyền có thể có một số tác dụng bất kỳ, như tăng hoặc giảm hoạt tính sinh học nhất định, bao gồm sự biểu hiện gen, chuyển hóa, và truyền tín hiệu tế bào. Biến dị di truyền có thể được đưa một cách đặc hiệu vào vị trí đích, hoặc được đưa vào một cách ngẫu nhiên. Nhiều loại công cụ phân tử và phương pháp là có sẵn để đưa biến dị di truyền vào. Ví dụ, biến dị di truyền

có thể được đưa vào bằng cách gây đột biến phản ứng chuỗi polymeraza, gây đột biến định hướng bằng oligonucleotit, gây đột biến bão hoà, gây đột biến xáo trộn mảnh, tái tổ hợp tương đồng, các hệ CRISPR/Cas9, gây đột biến hóa học, và kết hợp các cách này. Các phương pháp hóa học để đưa biến dị di truyền vào bao gồm phơi nhiễm ADN với tác nhân gây đột biến hóa học, ví dụ, etyl metansulfonat (EMS), metyl metansulfonat (MMS), N-nitrosoure (EN U), N-metyl-N-nitro-N'-nitrosoguanidin, 4-nitroquinolin N-oxit, dietylsulfat, benzopyren, xyclophosphamit, bleomycin, trietylmelamin, acrylamit monome, nitor hơi cay, vincristin, diepoxyalkan (ví dụ, diepoxybutan), ICR-170, formaldehyt, procarbazin hydroclorua, etylen oxit, dimetylnitrosamin, 7,12 dimetylbenz(a)anthraxen, clorambuxil, hexametylphosphoramit, bisulfan, và các hóa chất tương tự. Các tác nhân cảm ứng đột biến phóng xạ bao gồm phóng xạ tử ngoại, phóng xạ γ , tia X, và bắn phá neutron nhanh. Biến dị di truyền cũng có thể được đưa vào axit nucleic bằng cách sử dụng, ví dụ, trimetylpsoralen kèm theo ánh sáng tử ngoại. Kỹ thuật cài xen ngẫu nhiên hoặc hướng đích phân tử ADN di động, ví dụ, phân tử dễ chuyển vị, là một phương pháp thích hợp khác để tạo ra biến dị di truyền. Biến dị di truyền có thể được đưa vào axit nucleic trong quá trình khuếch đại trong hệ *in vitro* không có tế bào, ví dụ, bằng cách sử dụng kỹ thuật phản ứng chuỗi polymeraza (PCR) như PCR dễ sai sót. Biến dị di truyền có thể được đưa vào axit nucleic *in vitro* bằng cách sử dụng kỹ thuật xáo trộn ADN (ví dụ, xáo trộn exon, hoán đổi miền, và kỹ thuật tương tự). Biến dị di truyền cũng có thể được đưa vào axit nucleic do thiếu hụt enzym sửa chữa ADN trong tế bào, ví dụ, sự có mặt trong tế bào của gen đột biến mã hóa enzym sửa chữa ADN đột biến được cho là tạo ra tần suất đột biến cao (nghĩa là, khoảng từ 1 đột biến/100 gen đến 1 đột biến/10.000 gen) trong hệ gen của tế bào này. Ví dụ về các gen mã hóa các enzym sửa chữa ADN bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở Mut H, Mut S, Mut L, và Mut U, và các dạng tương đồng của chúng ở các loài khác (ví dụ, MSH 1 6, PMS 1 2, MLH 1, GTBP, ERCC-1, và các dạng tương tự). Phần mô tả ví dụ về nhiều phương pháp để đưa biến dị di truyền vào được đề cập trong các tài liệu, ví dụ: Nature 5:1-7, (2004) của Stemple; PCR Methods Appl 2(3) (1993) của Chiang et al.: 210-217; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:10747-10751 của Stemmer (1994); và các patent Mỹ số 6033861, và 6773900.

Đối với kỹ thuật khuếch đại theo chu kỳ, quy trình gây đột biến phản ứng chuỗi polymeraza (PCR) sử dụng các đoạn mồi gây đột biến để đưa các thể đột biến mong muốn vào. Tiến hành PCR bằng các chu kỳ gây biến tính, ủ và mở rộng chuỗi. Sau khi khuếch đại bằng PCR, có thể tiến hành chọn lọc ADN đã đột biến và loại bỏ ADN plasmit gốc bằng cách: 1) thay thế dCTP bằng dCTP được hydroxymetyl hóa trong quá trình PCR, tiếp đó phân hủy bằng các enzym giới hạn để chỉ loại bỏ ADN gốc không được hydroxymetyl hóa; 2) gây đột biến đồng thời cả gen kháng kháng sinh và gen đã nghiên cứu làm thay đổi plasmit này thành kháng kháng sinh khác, tính kháng kháng sinh mới tạo thuận lợi cho việc chọn lọc thể đột biến mong muốn sau đó; 3) sau khi đưa đột biến mong muốn vào, phân hủy ADN khuôn mẫu gốc được metyl hóa bằng enzym giới hạn DpnI, enzym này chỉ phân cắt ADN đã metyl hóa, bằng cách này thu được các chuỗi không được metyl hóa đã bị đột biến; hoặc 4) tuân hoàn các sản phẩm PCR đã đột biến trong phản ứng nối mạch bổ sung để làm gia tăng hiệu suất biến nạp của ADN đã đột biến. Có thể tìm được phần mô tả chi tiết hơn về các phương pháp lấy làm ví dụ trong các tài liệu, ví dụ: US7132265, US6713285, US6673610, US6391548, US5789166, US5780270, US5354670, US5071743, và US20100267147.

Gây đột biến định hướng bằng oligonucleotit, còn được gọi là gây đột biến định hướng vị trí, thường sử dụng đoạn mồi ADN tổng hợp. Đoạn mồi tổng hợp này thường chứa đột biến mong muốn và bổ trợ với ADN khuôn mẫu xung quanh vị trí đột biến sao cho nó có thể lai hóa với ADN ở gen quan tâm. Đột biến này có thể là sự thay đổi một bazơ duy nhất (đột biến điểm), thay đổi nhiều bazơ, làm khuyết, hoặc cài xen, hoặc tổ hợp các đột biến này. Đoạn mồi sợi đơn tiếp đó được mở rộng bằng cách sử dụng ADN polymeraza, enzym này sao chép phần còn lại của gen này. Gen được sao chép theo cách này chứa vị trí bị đột biến, và tiếp đó có thể được đưa vào tế bào vật chủ dưới dạng vector và được tách dòng. Cuối cùng, các thể đột biến có thể được chọn lọc bằng cách giải trình tự ADN để kiểm tra xem chúng có chứa đột biến mong muốn hay không.

Biến dị di truyền có thể được đưa vào bằng cách sử dụng PCR dễ sai sót. Trong kỹ thuật này, gen quan tâm được khuếch đại bằng cách sử dụng ADN polymeraza trong điều kiện thiếu độ chính xác trong sao chép trình tự. Kết quả là các sản phẩm

khuếch đại chứa ít nhất một sai sót trong trình tự. Khi một gen được khuếch đại và (các) sản phẩm thu được của phản ứng này chứa một hoặc nhiều thay đổi trong trình tự so với phân tử khuôn mẫu, thì các sản phẩm thu được là bị đột biến so với khuôn mẫu. Một cách thức khác để đưa các đột biến ngẫu nhiên vào là phơi nhiễm các tế bào với tác nhân gây đột biến hóa học, như nitrosoguanidin hoặc etyl metansulfonat (Nestmann, *Mutat Res* 1975 June; 28(3):323-30), và vector chứa gen này tiếp đó được phân lập từ vật chủ.

Gây đột biến bão hoà là một hình thức gây đột biến ngẫu nhiên khác, trong đó thử tạo ra tất cả hoặc gần như tất cả các đột biến có thể có ở một vị trí cụ thể, hoặc một vùng gen hẹp. Nói chung, gây đột biến bão hoà bao gồm gây đột biến cho tập cat-xet gây đột biến hoàn chỉnh (trong đó mỗi cat-xet có độ dài, ví dụ, từ 1 đến 500 bazơ) trong trình tự polynucleotit xác định là cần gây đột biến (trong đó trình tự cần gây đột biến này có độ dài, ví dụ, từ 15 đến 100.000 bazơ). Do đó, một nhóm các đột biến (ví dụ nằm trong khoảng từ 1 đến 100 đột biến) được đưa vào mỗi cat-xet cần gây đột biến. Phân nhóm các đột biến sẽ đưa vào một cat-xet có thể khác hoặc giống với phân nhóm các đột biến thứ hai sẽ đưa vào cat-xet thứ hai khi áp dụng một chu kỳ gây đột biến bão hoà. Các phân nhóm như vậy được lấy làm ví dụ bằng cách làm khuyết, thêm, gộp nhóm các codon cụ thể, và gộp nhóm các cat-xet nucleotit cụ thể.

Gây đột biến xáo trộn mảnh, còn được gọi là xáo trộn ADN, là cách để nhanh chóng nhân lên các thể đột biến có lợi. Trong ví dụ về quy trình xáo trộn, DNAza được sử dụng để phân mảnh một tập hợp các gen gốc thành các mảnh có độ dài từ 50 đến 100 cặp bazơ (bp). Sau quy trình đó là phản ứng chuỗi polymeraza (PCR) không có các mảnh ADN--đoạn nối với trình tự tương đồng trùng lặp vừa đủ sẽ nối với nhau và tiếp đó được mở rộng chuỗi bằng ADN polymeraza. Để diễn ra một vài chu kỳ mở rộng chuỗi bằng PCR, sau khi một vài phân tử ADN đạt đến kích cỡ của các gen gốc. Các gen này tiếp đó có thể được khuếch đại bằng một PCR khác, lần này có bổ sung thêm các đoạn nối được thiết kế để hỗ trợ cho các đầu của các sợi. Các đoạn nối có thể có trình tự bổ sung được thêm vào các đầu 5' của chúng, như là các trình tự cho các vị trí nhận diện enzym giới hạn cần để nối vào vector tách dòng. Các ví dụ khác nữa về kỹ thuật xáo trộn được đề cập trong US20050266541.

Gây đột biến tái tổ hợp tương đồng bao gồm sự tái tổ hợp giữa mảnh ADN ngoại sinh và trình tự polynucleotit đích. Sau khi diễn ra quá trình phá vỡ sợi đôi, các đoạn ADN xung quanh các đầu 5' của sợi phá vỡ bị cắt đi trong quy trình gọi là cắt đoạn. Trong bước xâm chiếm sợi sau đó, đầu nhô 3' của phân tử ADN đã phá vỡ khi đó "xâm chiếm" phân tử ADN tương tự hoặc tương đồng mà chưa bị phá vỡ. Phương pháp này có thể được sử dụng để xóa bỏ gen, loại bỏ các exon, thêm gen, và đưa các đột biến điểm vào. Gây đột biến tái tổ hợp tương đồng có thể là vĩnh viễn hoặc có điều kiện. Thông thường, khuôn mẫu tái tổ hợp cũng được cung cấp. Khuôn mẫu tái tổ hợp có thể là thành phần của một vectơ khác, có trong một vectơ riêng rẽ, hoặc được cung cấp dưới dạng polynucleotit riêng rẽ. Theo một vài phương án, khuôn mẫu tái tổ hợp được thiết kế để làm khuôn mẫu trong quy trình tái tổ hợp tương đồng, như trong phạm vi hoặc gần trình tự đích bị cắt bỏ hoặc phân cắt bởi nucleaza đặc hiệu vị trí. Polynucleotit khuôn mẫu có thể có độ dài thích hợp bất kỳ, như khoảng hoặc nhiều hơn khoảng 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 500, 1000, hoặc nhiều hơn 1000 nucleotit. Theo một vài phương án, polynucleotit khuôn mẫu này bổ trợ với phần polynucleotit chứa trình tự đích. Khi được căn thẳng tối ưu, polynucleotit khuôn mẫu có thể trùng lặp với một hoặc nhiều nucleotit của trình tự đích (ví dụ khoảng hoặc nhiều hơn khoảng 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100 hoặc nhiều hơn 100 nucleotit). Theo một vài phương án, khi trình tự khuôn mẫu và polynucleotit chứa trình tự đích được căn thẳng tối ưu, thì nucleotit gần nhất của polynucleotit khuôn mẫu là trong khoảng 1, 5, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500, 1000, 5000, 10000, hoặc nhiều hơn 10000 nucleotit từ trình tự đích. Các ví dụ không mang tính giới hạn về các nucleaza định hướng vị trí hữu ích trong các phương pháp tái tổ hợp tương đồng bao gồm nucleaza ngón tay kềm, nucleaza CRISPR, nucleaza TALE, và meganucleaza. Để có thêm thông tin chi tiết hơn về việc sử dụng các nucleaza này, xem trong các tài liệu, ví dụ, US8795965 và US20140301990.

Các hệ (Cas) kết hợp CRISPR/Cas9 (các đoạn lặp palindrom ngắn được cách quãng đều đặn cụm lại)/CRISPR cung cấp các vi khuẩn và các cổ khuẩn có tính miễn dịch thích ứng kháng lại các virus và plasmit bằng cách sử dụng các ARN CRISPR (crARN) để dẫn hướng việc làm câm các axit nucleic xâm chiếm. Protein Cas9 (hoặc

thể chức năng tương đương và/hoặc biến thể của nó, nghĩa là protein giống Cas9) tự nhiên chứa hoạt tính ADN endonucleaza mà tùy thuộc vào sự kết hợp của protein này với hai phân tử ARN có trong tự nhiên hoặc tổng hợp gọi là crARN và tracrARN (còn gọi là các ARN dẫn hướng). Trong một vài trường hợp, hai phân tử này được liên kết cộng hóa trị để tạo thành một phân tử đơn nhất (còn được gọi là ARN dẫn hướng đơn nhất ("sgARN")). Do đó, protein Cas9 hoặc protein giống Cas9 kết hợp với ARN hướng đích ADN (thuật ngữ này bao gồm cả cấu hình ARN dẫn hướng hai phân tử và cấu hình ARN dẫn hướng một phân tử), ARN này hoạt hóa protein Cas9 hoặc protein giống Cas9 và dẫn hướng protein này đến trình tự axit nucleic đích. Nếu protein Cas9 hoặc protein giống Cas9 vẫn giữ được chức năng enzym tự nhiên của nó, thì protein này sẽ phân cắt ADN đích để tạo ra sự phá vỡ sợi đôi mà có thể dẫn đến việc biến đổi hệ gen (có nghĩa là, chỉnh sửa: làm khuyết, cài xen (khi có mặt polynucleotit cho), thay thế, v.v.), nhờ đó biến đổi sự biểu hiện gen. Một vài biến thể của Cas9 (các biến thể này được bao hàm bởi thuật ngữ giống Cas9) đã được biến đổi sao cho chúng có hoạt tính phân cắt ADN giảm đi (trong một vài trường hợp, chúng phân cắt một sợi thay vì cả hai sợi của ADN đích, trong khi trong các trường hợp khác, chúng có hoạt tính phân cắt ADN từ giảm nghiêm trọng đến không còn hoạt tính). Xác mô tả ví dụ lấy làm ví dụ khác nữa về hệ CRISPR để đưa biến dị di truyền vào có thể được tìm thấy trong tài liệu, ví dụ US8795965.

Tác nhân gây đột biến tạo ra chủ yếu là các đột biến điểm và các cải biến làm khuyết, cài xen, chuyển đoạn, và/hoặc chuyển tiếp đoạn ngắn, bao gồm tác nhân gây đột biến hóa học hoặc phóng xạ, có thể được sử dụng để tạo ra biến dị di truyền. Tác nhân gây đột biến bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, etyl metansulfonat, metylmetan sulfonat, N-etyl-N-nitrosure, trietylmelamin, N-metyl-N-nitrosoure, procarbazin, clorambuxil, xyclophosphamit, dietyl sulfat, acrylamit monome, melphalan, nitơ hơi cay, vincristin, dimetylnitrosamin, N-metyl-N'-nitro-Nitrosoguanidin, nitrosoguanidin, 2-aminopurin, 7,12 dimetyl-benz(a)antraxen, etylen oxit, hexametylphosphoramit, bisulfan, diepoxyalkan (diepoxyoctan, diepoxybutan, và chất tương tự), 2-metoxi-6-clo-9[3-(etyl-2-clo-etyl)aminopropylamino]acridin dihydroclorua và formaldehyt.

Việc đưa biến dị di truyền vào có thể là quá trình không hoàn chỉnh, sao cho trong quần thể vi khuẩn đã được xử lý này có một vài vi khuẩn mang đột biến mong muốn trong khi các vi khuẩn còn lại thì không. Trong một vài trường hợp, có thể muốn sử dụng áp lực chọn lọc để làm giàu các vi khuẩn mang biến dị di truyền mong muốn. Theo cách truyền thống, việc chọn lọc các biến dị di truyền thành công bao gồm chọn lọc đối với hoặc loại bỏ nhóm chức nhất định được truyền hoặc loại bỏ bởi biến dị di truyền này, như trong trường hợp cài xen gen kháng kháng sinh hoặc loại bỏ hoạt tính chuyển hóa có khả năng chuyển hóa hợp chất không gây chết thành chất chuyển hóa gây chết. Cũng có thể sử dụng áp lực chọn lọc dựa trên chính trình tự polynucleotit, sao cho chỉ có biến dị di truyền mong muốn là cần được đưa vào (ví dụ, không cần đến chỉ thị chọn lọc). Trong trường hợp này, áp lực chọn lọc có thể bao gồm việc phân cắt các hệ gen thiếu biến dị di truyền đưa vào vị trí đích, sao cho việc chọn lọc được định hướng một cách hiệu quả dựa vào trình tự tham chiếu mà biến dị di truyền được tìm cách đưa vào. Thông thường, sự phân cắt diễn ra trong phạm vi 100 nucleotit quanh vị trí đích (ví dụ trong phạm vi 75, 50, 25, 10, hoặc ít hơn 10 nucleotit từ vị trí đích, bao gồm phân cắt ở hoặc trong phạm vi vị trí đích). Việc phân cắt có thể được định hướng bằng nucleaza đặc hiệu vị trí được chọn từ nhóm gồm nucleaza ngón tay kẽm, nucleaza CRISPR, nucleaza TALE (TALEN), hoặc meganucleaza. Quy trình này tương tự với quy trình tăng cường sự tái tổ hợp tương đồng ở vị trí đích, ngoại trừ việc không cung cấp khuôn mẫu để tái tổ hợp tương đồng. Do đó, các vi khuẩn không mang biến dị di truyền mong muốn có khả năng bị phân cắt hơn mà không được sửa chữa, dẫn đến chết tế bào. Các vi khuẩn sống sót sau chọn lọc này tiếp đó có thể được phân lập để sử dụng để phơi nhiễm cho cây để đánh giá việc truyền tính trạng được cải thiện.

Nucleaza CRISPR có thể được sử dụng làm nucleaza đặc hiệu vị trí để định hướng sự phân cắt đến vị trí đích. Có thể thu được sự chọn lọc cải thiện của các vi khuẩn đã đột biến bằng cách sử dụng Cas9 để tiêu diệt các tế bào không bị đột biến. Các cây tiếp đó được chủng nhiễm bằng các vi khuẩn đã đột biến để tái khẳng định sự cộng sinh và tạo ra áp lực tiến hóa để chọn lọc các thể cộng sinh hiệu quả. Sau đó các vi khuẩn có thể được phân lập lại từ các mô cây. Các hệ nucleaza CRISPR dùng để chọn lọc loại bỏ các dạng không phải biến thể có thể sử dụng các phần tử tương tự

với các phần tử đã mô tả ở trên đối với việc đưa biến dị di truyền vào, ngoại trừ việc không cung cấp khuôn mẫu để tái tổ hợp tương đồng. Theo đó việc phân cắt được định hướng đến vị trí đích làm tăng cường sự chết các tế bào bị ảnh hưởng.

Các phương án khác để cảm ứng một cách đặc hiệu sự phân cắt ở vị trí đích là có sẵn, như các nucleaza ngón tay kềm, các hệ nucleaza TALE (TALEN), và meganucleaza. Các nucleaza ngón tay kềm (ZFN) là các endonucleaza ADN nhân tạo được tạo ra bằng cách dung hợp miền gắn kết ADN ngón tay kềm với miền phân cắt ADN. Các ZFN có thể được xử lý kỹ thuật để hướng đích các trình tự ADN mong muốn và việc xử lý này khiến cho các nucleaza ngón tay kềm phân cắt được các trình tự đích độc nhất. Khi được đưa vào tế bào, các ZFN có thể được sử dụng để chỉnh sửa ADN đích trong tế bào (ví dụ, hệ gen của tế bào này) bằng cách cảm ứng làm phá vỡ sợi đôi. Các nucleaza hiệu ứng tương tự chất hoạt hóa phiên mã (TALEN) là các endonucleaza ADN nhân tạo được tạo ra bằng cách dung hợp miền gắn kết ADN hiệu ứng TAL (tương tự chất hoạt hóa phiên mã) với miền phân cắt ADN. Các TALEN có thể được xử lý kỹ thuật một cách nhanh chóng để gắn kết trên thực tế trình tự ADN mong muốn bất kỳ và khi được đưa vào tế bào, các TALEN có thể được sử dụng để chỉnh sửa ADN đích trong tế bào này (ví dụ, hệ gen của tế bào này) bằng cách cảm ứng là phá vỡ sợi đôi. Các meganucleaza (endonucleaza homing) là các endodeoxyribonucleaza đặc trưng bởi vị trí nhận diện lớn (trình tự ADN sợi đôi có từ 12 đến 40 cặp bazơ). Các meganucleaza có thể được sử dụng để thay thế, loại bỏ hoặc cải biến các trình tự theo cách hướng đích mức độ cao. Bằng cách cải biến trình tự nhận diện của chúng thông qua xử lý kỹ thuật protein, trình tự đích có thể bị thay đổi. Các meganucleaza có thể được sử dụng để cải biến tất cả các loại hệ gen, cho dù là của vi khuẩn, thực vật hay động vật và thường được phân thành bốn họ: họ LAGLIDADG, họ GIY-YIG, họ hộp His-Cyst và họ HNH. Các endonucleaza homing lấy làm ví dụ bao gồm I-SceI, I-CeuI, PI-PspI, PI-Sce, I-SceIV, I-CsmI, I-PanI, I-SceII, I-PpoI, I-SceIII, I-CreI, I-TevI, I-TevII và I-TevIII.

Các phương pháp theo sáng chế có thể được sử dụng để đưa vào hoặc cải thiện một hoặc nhiều loại tính trạng mong muốn. Các ví dụ về các tính trạng mà có thể được đưa vào hoặc cải thiện bao gồm: sinh khối rễ, độ dài rễ, chiều cao, độ dài chồi, số lượng lá, hiệu suất sử dụng nước, sinh khối tổng thể, sản lượng, cỡ quả, cỡ hạt, tốc

độ quang hợp, chịu hạn, chịu nhiệt, chịu mặn, kháng stress do giun tròn, kháng nấm bệnh nấm, kháng mầm bệnh vi khuẩn, kháng mầm bệnh virus, nồng độ chất chuyển hóa, và sự biểu hiện protein. Các tính trạng mong muốn, bao gồm chiều cao, sinh khối tổng thể, sinh khối rễ và/hoặc chồi, khả năng nảy mầm của hạt, khả năng sống của cây giống, hiệu suất quang hợp, tốc độ thoát hơi nước, số lượng hoặc khối lượng hạt/quả, sản lượng hạt hoặc quả, hàm lượng chlorophyll của lá, tốc độ quang hợp, độ dài của rễ, hoặc tổ hợp bất kỳ của các tính trạng này, có thể được sử dụng để xác định mức độ sinh trưởng, và so với tốc độ sinh trưởng của các cây nông nghiệp tham chiếu (ví dụ, cây không có các tính trạng cải thiện) được trồng trong các điều kiện như nhau. Tính trạng được ưu tiên cần được đưa vào hoặc được cải thiện là cố định nitơ, như được mô tả trong bản mô tả này. Trong một vài trường hợp, cây thu được từ các phương pháp được mô tả trong bản mô tả này biểu hiện sự chênh lệch về tính trạng mà lớn hơn ít nhất khoảng > 5%, ví dụ ít nhất khoảng 5%, ít nhất khoảng 8%, ít nhất khoảng 10%, ít nhất khoảng 15%, ít nhất khoảng 20%, ít nhất khoảng 25%, ít nhất khoảng 30%, ít nhất hơn khoảng 40%, ít nhất hơn khoảng 50%, ít nhất hơn khoảng 60%, ít nhất hơn khoảng 75%, ít nhất hơn khoảng 80%, ít nhất hơn khoảng 80%, ít nhất hơn khoảng 90%, hoặc ít nhất 100%, ít nhất khoảng 200%, ít nhất khoảng 300%, ít nhất khoảng 400% hoặc cao hơn 400%, so với cây nông nghiệp tham chiếu được trồng trong cùng điều kiện trong đất.

Tính trạng cần được cải thiện có thể được đánh giá trong các điều kiện bao gồm việc sử dụng một hoặc nhiều tác nhân gây stress sinh học hoặc phi sinh học. Các ví dụ về các tác nhân gây stress bao gồm các stress phi sinh học (như stress nhiệt, stress muối mặn, stress khô hạn, stress lạnh giá, và stress nghèo chất dinh dưỡng) và các stress sinh học (như stress giun tròn, stress côn trùng ăn thực vật, stress nấm bệnh nấm, stress mầm bệnh vi khuẩn, và stress mầm bệnh virus).

Tính trạng được cải thiện bằng các phương pháp và chế phẩm theo sáng chế có thể là khả năng cố định nitơ, kể cả ở cây trước đó không có khả năng cố định nitơ. Trong một vài trường hợp, các vi khuẩn được phân lập theo phương pháp được mô tả trong bản mô tả này sản sinh nitơ trong cây ở mức 1% hoặc cao hơn (ví dụ, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, hơn 20%), mức này cho thấy khả năng cố định nitơ tăng ít nhất 2 lần (ví dụ 3 lần, 4 lần, 5 lần, 6 lần, 7 lần, 8 lần, 9 lần,

10 lần, 20 lần, 50 lần, 100 lần, 1000 lần, hoặc hơn 1000 lần) so với các vi khuẩn được phân lập từ cây thứ nhất trước khi đưa biến dị di truyền bất kỳ vào. Trong một vài trường hợp, vi khuẩn này sản sinh nitơ trong cây ở mức 5% hoặc cao hơn. Mức cố định nitơ mong muốn có thể đạt được sau khi lặp lại các bước gồm đưa biến dị di truyền vào, phơi nhiễm cho nhiều cây, và phân lập vi khuẩn từ các cây có tính trạng được cải thiện một hoặc nhiều lần (ví dụ 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 25, hoặc nhiều lần). Trong một vài trường hợp, đạt được mức cố định nitơ tăng cường khi có mặt phân bón có bổ sung glutamin, amoniac, hoặc nguồn hóa chất nitơ khác. Các phương pháp để đánh giá mức độ cố định nitơ là đã biết, ví dụ về các phương pháp này được mô tả trong bản mô tả này.

Quy trình cố định nitơ

Được mô tả trong bản mô tả này là các phương pháp gia tăng độ cố định nitơ ở cây, bao gồm bước phơi nhiễm cây này với các vi khuẩn chứa một hoặc nhiều biến dị di truyền đã được đưa vào một hoặc nhiều gen điều hoà sự cố định nitơ, trong đó vi khuẩn này sản sinh nitơ ở mức 1% hoặc cao hơn ở cây này (ví dụ 2%, 5%, 10% hoặc hơn 10%), mức này cho thấy khả năng cố định nitơ cao hơn gấp ít nhất 2 lần so với cây không có vi khuẩn này. Vi khuẩn này có thể sản sinh nitơ khi có mặt phân bón có bổ sung glutamin amoniac. Biến dị di truyền có thể là biến dị di truyền bất kỳ được mô tả trong bản mô tả này, bao gồm các ví dụ đã đề cập ở trên, với số lượng bất kỳ và theo tổ hợp bất kỳ. Biến dị di truyền có thể được đưa vào gen được chọn từ nhóm gồm *nifA*, *nifL*, *ntrB*, *ntrC*, glutamin synthetaza, *glnA*, *glnB*, *glnK*, *draT*, *amtB*, glutaminaza, *glnD*, *glnE*, *nifJ*, *nifH*, *nifD*, *nifK*, *nifY*, *nifE*, *nifN*, *nifU*, *nifS*, *nifV*, *nifW*, *nifZ*, *nifM*, *nifF*, *nifB*, và *nifQ*. Biến dị di truyền có thể là đột biến dẫn đến một hoặc nhiều đặc tính trong số: tăng biểu hiện hoặc hoạt tính của *nifA* hoặc glutaminaza; giảm biểu hiện hoặc hoạt tính của *nifL*, *ntrB*, glutamin synthetaza, *glnB*, *glnK*, *draT*, *amtB*; giảm hoạt tính loại bỏ adenyllyl của *GlnE*; hoặc giảm hoạt tính loại bỏ uridylyl của *GlnD*. Biến dị di truyền đã được đưa vào một hoặc nhiều vi khuẩn theo các phương pháp được mô tả trong bản mô tả này có thể là đột biến bất hoạt gen hoặc biến dị này có thể làm mất trình tự điều hoà của gen đích, hoặc nó có thể bao gồm cài xen trình tự điều hoà khác loài, ví dụ, cài xen trình tự điều hoà tìm thấy trong hệ gen của cùng một loài hoặc giống vi khuẩn. Trình tự điều hoà có thể được chọn dựa trên

mức biểu hiện của gen trong giống cây vi khuẩn hoặc trong mô cây. Biến dị di truyền có thể được tạo ra bằng cách gây đột biến hóa học. Các cây được trồng ở bước (c) có thể được phơi nhiễm với các tác nhân gây stress sinh học hoặc phi sinh học.

Mức độ cố định nitơ có trong cây được mô tả trong bản mô tả này có thể được xác định theo một vài cách, ví dụ, bằng thử nghiệm khử axetylen (AR). Có thể tiến hành thử nghiệm khử axetylen này *in vitro* hoặc *in vivo*. Rõ ràng là một vi khuẩn cụ thể cung cấp nitơ đã cố định cho cây có thể bao gồm: 1) N toàn phần trong cây tăng lên đáng kể khi chủng nhiễm, tốt hơn là cùng với sự gia tăng đồng thời nồng độ N ở cây này; 2) giảm nhẹ các triệu chứng thiếu hụt nitơ trong các điều kiện hạn chế N khi chủng nhiễm (mà nên bao gồm sự gia tăng chất khô); 3) khả năng cố định N_2 được ghi nhận thông qua việc sử dụng phương thức ^{15}N (mà có thể là thử nghiệm pha loãng đồng vị, thử nghiệm khử $^{15}N_2$, hoặc thử nghiệm dư thừa tự nhiên ^{15}N); 4) N đã cố định được kết hợp vào protein hoặc chất chuyển hóa của cây; và 5) tất cả các tác dụng này không được thấy ở cây không được chủng nhiễm hoặc ở cây được chủng nhiễm bằng thể đột biến của chủng chủng nhiễm.

Dòng thác điều hoà quá trình cố định nitơ kiểu hoang có thể được trình bày dưới dạng mạch logic kỹ thuật số, trong đó các đầu vào O_2 và NH_4^+ đi qua cổng NOR, đầu ra của các chất này đi vào cổng AND ngoài ATP. Theo một vài phương án, các phương pháp được mô tả trong bản mô tả này phá vỡ sự ảnh hưởng của NH_4^+ đối với mạch này, tại nhiều điểm trong dòng thác điều hoà này, sao cho các vi khuẩn có thể sản sinh nitơ ngay cả trên thực địa có bón phân. Tuy nhiên, các phương pháp được mô tả trong bản mô tả này cũng dự tính việc làm thay đổi tác động của ATP hoặc O_2 đến mạch này, hoặc thay thế mạch này bằng các dòng thác điều hoà khác trong tế bào, hoặc làm thay đổi các mạch gen không phải là mạch cố định nitơ. Các cụm gen có thể được xử lý kỹ thuật lại để tạo ra các sản phẩm chức năng dưới sự kiểm soát của hệ điều hoà khác loài. Bằng cách loại bỏ các phân tử điều hoà nguyên thuỷ ngoài phạm vi, và trong phạm vi các trình tự mã hóa của cụm gen, và thay thế chúng bằng các hệ điều hoà thay thế, các sản phẩm chức năng của các operon gen phức hợp và các cụm gen khác có thể được kiểm soát và/hoặc di chuyển đến các tế bào khác loài, bao gồm tế bào của loài khác không phải loài mà các gen nguyên thuỷ thu được từ đó. Khi đã được xử lý kỹ thuật lại, các cụm gen tổng hợp có thể được kiểm soát bằng

các mạch di truyền hoặc các hệ điều hoà dễ cảm ứng khác, nhờ đó kiểm soát được sự biểu hiện của các sản phẩm theo ý muốn. Cat-xet biểu hiện có thể được thiết kế để hoạt động như các cổng logic, bộ tạo xung, bộ dao động, bộ chuyển mạch hoặc bộ nhớ. Cat-xet kiểm soát biểu hiện có thể được nối với trình tự khởi đầu sao cho cat-xet biểu hiện này hoạt động như bộ cảm biến môi trường, như bộ cảm biến oxy, bộ cảm biến nhiệt độ, bộ cảm biến xúc giác, bộ cảm biến ứng suất thẩm thấu, bộ cảm biến ứng suất màng hoặc bộ cảm biến oxy hóa khử.

Ví dụ, các gen *nifL*, *nifA*, *nifT*, và *nifX* có thể được loại bỏ khỏi cụm gen *nif*. Các gen tổng hợp có thể được thiết kế bằng cách chọn ngẫu nhiên codon của ADN mã hóa từng trình tự axit amin. Tiến hành chọn lọc codon, cụ thể là việc sử dụng codon khác biệt nhiều nhất có thể so với việc sử dụng codon ở gen nguyên thủy. Các trình tự được đề xuất được quét tìm các đặc điểm không mong muốn bất kỳ, như các vị trí nhận diện enzym giới hạn, các vị trí nhận diện transposon, các trình tự lặp, các trình tự khởi đầu sigma 54 và sigma 70, các vị trí gắn kết ribosom bí ẩn, và các gen kết thúc không phụ thuộc rho. Các vị trí gắn kết ribosom tổng hợp được chọn để trùng khớp với độ bền của mỗi vị trí gắn kết ribosom nguyên thủy tương ứng, như là bằng cách xây dựng cấu trúc plasmid báo cáo huỳnh quang, trong đó 150 cặp bazơ (bp) xung quanh codon bắt đầu của gen (từ -60 đến +90) được dung hợp với gen huỳnh quang. Gen khả năng này có thể được biểu hiện dưới sự kiểm soát của trình tự khởi đầu *P_{tac}*, và xác định tín hiệu huỳnh quang thông qua kỹ thuật đếm tế bào theo dòng chảy. Để tạo ra các vị trí gắn kết ribosom tổng hợp, thư viện plasmid báo cáo sử dụng 150 bp (-60 đến +90) của cat-xet biểu hiện tổng hợp được tạo ra. Vấn đề là, cat-xet biểu hiện tổng hợp có thể bao gồm đoạn đệm ADN ngẫu nhiên, trình tự thoái hóa mã hóa thư viện RBS (RBS- vị trí gắn kết ribosom), và trình tự mã hóa cho từng gen tổng hợp. Nhiều dòng vô tính được sàng lọc để xác định vị trí gắn kết ribosom tổng hợp trùng khớp nhất với vị trí gắn kết ribosom nguyên thủy. Theo đó các operon tổng hợp mà bao gồm cùng các gen như operon nguyên thủy được xây dựng cấu trúc và thử nghiệm về khả năng hỗ trợ chức năng. Phần mô tả chi tiết hơn về các operon tổng hợp được nêu trong US20140329326.

Các loài vi khuẩn

Các vi khuẩn hữu ích trong các phương pháp và chế phẩm được mô tả trong bản mô tả này có thể thu được bằng cách chiết tách các vi khuẩn từ bề mặt hoặc mô của các cây nguyên thủy; nghiền hạt để phân lập vi khuẩn; gieo hạt trong các mẫu đất khác nhau và thu hồi vi khuẩn từ các mô; hoặc chủng nhiễm cho cây bằng các vi khuẩn ngoại sinh và xác định xem vi khuẩn nào xuất hiện trong mô cây. Các ví dụ không mang tính giới hạn về mô cây bao gồm hạt, cây mầm, lá, cành giâm, cây, củ hoặc rễ củ. Trong một vài trường hợp, các vi khuẩn được phân lập từ hạt. Các thông số để xử lý mẫu có thể được thay đổi để phân lập các loại khác nhau của các vi khuẩn kết hợp, như loài sống trong bầu rễ, các loài biểu sinh, hoặc các loài nội sinh. Các vi khuẩn cũng có thể nguồn gốc từ một tập hợp, như tập hợp chủng môi trường, thay vì phân lập từ ban đầu từ cây thứ nhất. Các vi khuẩn này có thể được xác định kiểu gen và kiểu hình, bằng cách giải trình tự các hệ gen của các vi khuẩn đã phân lập; xác định profin hợp phần của các quần xã *in planta*; đặc trưng hóa chức năng hệ phiên mã của các quần xã hay các vi khuẩn được phân lập; hoặc sàng lọc các đặc điểm vi khuẩn bằng cách sử dụng môi trường chọn lọc hoặc kiểu hình (ví dụ, kiểu hình cố định nitơ hoặc kiểu hình hoà tan phosphat). Các chủng hoặc quần thể ứng viên được chọn có thể thu được thông qua các dữ liệu trình tự; dữ liệu kiểu hình; dữ liệu cây (ví dụ, dữ liệu hệ gen, kiểu hình, và/hoặc sản lượng); dữ liệu đất (ví dụ, độ pH, hàm lượng N/P/K, và/hoặc quần xã sinh học trong khối đất); hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng.

Vi khuẩn và các phương pháp sản sinh vi khuẩn được mô tả trong bản mô tả này có thể áp dụng cho các vi khuẩn có khả năng tự nhân lên một cách hiệu quả trên bề mặt lá, bề mặt rễ hoặc bên trong mô của cây mà không gây ra phản ứng tự vệ gây hại cho cây, hoặc các vi khuẩn kháng các đáp ứng tự vệ của cây. Vi khuẩn được mô tả trong bản mô tả này có thể được phân lập bằng cách nuôi cấy dịch chiết mô cây hoặc dịch rửa bề mặt lá trong môi trường không có nitơ bổ sung. Tuy nhiên, vi khuẩn này có thể là không thể nuôi cấy, nghĩa là, không rõ là có thể nuôi cấy được hay khó nuôi cấy bằng cách sử dụng các phương pháp chuẩn đã biết trong lĩnh vực này. Vi khuẩn được mô tả trong bản mô tả này có thể là vi khuẩn nội sinh hoặc biểu sinh hoặc vi khuẩn cư trú ở bầu rễ của cây (vi khuẩn bầu rễ). Vi khuẩn thu được sau khi lặp lại các bước gồm đưa biến dị di truyền vào, phơi nhiễm với nhiều cây, và phân lập vi khuẩn từ các cây có tính trạng cải thiện một hoặc nhiều lần (ví dụ 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15,

25, hoặc nhiều hơn 25 lần) có thể là sống nội sinh, biểu sinh, hoặc trong bầu rễ. Các loài nội sinh là các sinh vật đi vào bên trong thực vật mà không gây nên các triệu chứng bệnh hoặc gây ra sự hình thành các cấu trúc cộng sinh, và được quan tâm về mặt nông học do chúng có thể tăng cường sự sinh trưởng của cây và cải thiện dinh dưỡng cho cây (ví dụ, thông qua cố định nitơ). Vi khuẩn có thể là loài nội sinh sinh ra từ hạt. Các loài nội sinh sinh ra từ hạt bao gồm vi khuẩn kết hợp với hoặc thu được từ hạt của cỏ hoặc cây, như vi khuẩn nội sinh sinh ra từ hạt được tìm thấy ở các hạt già, khô, và không bị hư hại (ví dụ, không nứt, không bị nhiễm nấm nhìn thấy được hoặc không nảy mầm sớm). Vi khuẩn nội sinh sinh ra từ hạt có thể được kết hợp với hoặc thu được từ bề mặt của hạt; theo cách khác, hoặc ngoài ra, có thể được kết hợp với hoặc thu được từ khoang bên trong của hạt (ví dụ, hạt được vô trùng bề mặt). Trong một vài trường hợp, vi khuẩn nội sinh sinh ra từ hạt có khả năng sao chép trong mô cây, ví dụ, bên trong hạt. Tương tự, trong một vài trường hợp, vi khuẩn nội sinh sinh ra từ hạt có khả năng sống sót khi hút ẩm.

Vi khuẩn được phân lập theo các phương pháp của sáng chế có thể bao gồm nhiều taxon vi khuẩn khác nhau kết hợp lại. Ví dụ, vi khuẩn có thể bao gồm Proteobacteria (như *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Stenotrophomonas*, *Burkholderia*, *Rhizobium*, *Herbaspirillum*, *Pantoea*, *Serratia*, *Rahnella*, *Azospirillum*, *Azorhizobium*, *Azotobacter*, *Duganella*, *Delftia*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium* và *Halomonas*), Firmicutes (như *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Lactobacillus*, *Mycoplasma*, và *Acetabacterium*), và Actinobacteria (như *Streptomyces*, *Rhodococcus*, *Microbacterium*, và *Curtobacterium*). Các vi khuẩn mà có thể được sản xuất bằng các phương pháp được mô tả trong bản mô tả này bao gồm *Azotobacter* sp., *Bradyrhizobium* sp., *Klebsiella* sp., và *Sinorhizobium* sp. Vi khuẩn có thể được chọn từ nhóm gồm: *Azotobacter vinelandii*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Klebsiella pneumoniae*, và *Sinorhizobium meliloti*. Vi khuẩn có thể là thuộc giống *Enterobacter* và *Rahnella*.

Vi khuẩn có thể thu được từ môi trường đất liền phổ biến bất kỳ, bao gồm các đất, các thực vật, nấm, động vật (bao gồm các động vật không xương sống) và các khu hệ sinh vật khác, bao gồm trầm tích, nước, và khu hệ sinh vật hồ ao và sông; từ môi trường thủy sinh, khu hệ sinh vật và trầm tích của môi trường này (ví dụ, nước

biển, bùn biển, các thực vật biển, động vật không xương sống biển (ví dụ, hải miên), động vật có xương sống biển (ví dụ, cá)); địa quyển đất liền và biển (tầng phong hóa và đá, ví dụ, đá dăm ngầm, cát và đất sét); băng quyển và nước tan chảy của nó; khí quyển (ví dụ, bụi không khí lơ, mây và giọt nước mưa); môi trường đô thị, công nghiệp và nhân tạo khác (ví dụ, chất hữu cơ và khoáng chất tích tụ trên bề mặt bê tông, rãnh thoát nước bên đường, bề mặt mái, và bề mặt đường).

Các cây mà thu được vi khuẩn từ đó có thể là cây có một hoặc nhiều tính trạng mong muốn, ví dụ cây mọc tự nhiên trong một môi trường cụ thể hoặc trong các điều kiện nhất định đang quan tâm. Ví dụ, một số cây có thể mọc tự nhiên trong đất cát hoặc cát có độ mặn cao, hoặc ở nhiệt độ khắc nghiệt, hoặc có rất ít nước, hoặc nó có thể kháng các loài gây hại hoặc bệnh có trong môi trường, và có thể mong muốn rằng cây trồng thương mại mọc được trong các điều kiện đó, đặc biệt nếu chúng là, ví dụ, các điều kiện duy nhất sẵn có ở một vị trí địa lý cụ thể. Ví dụ khác, vi khuẩn có thể được thu gom từ các cây trồng thương mại được trồng trong môi trường đó, hoặc cụ thể hơn là từ các cá thể cây trồng biểu hiện tốt nhất tính trạng quan tâm trong số các cây trồng được trồng trong môi trường cụ thể bất kỳ: ví dụ các cây mọc nhanh nhất trong số các cây trồng ở đất hạn chế nước mặn, hoặc các cây bị hư hại ít nhất trong số các cây phơi nhiễm với thiệt hại do côn trùng hoặc bệnh dịch nghiêm trọng, hoặc các cây có lượng mong muốn của một số chất chuyển hóa nhất định và các hợp chất khác, bao gồm hàm lượng chất xơ, hàm lượng dầu, và hàm lượng tương tự, hoặc các cây có màu sắc, mùi hoặc vị mong muốn. Vi khuẩn có thể được thu gom từ cây quan tâm hoặc vật liệu bất kỳ xuất hiện trong môi trường quan tâm, bao gồm nấm và khu hệ sinh vật động vật và thực vật khác, đất, nước, trầm tích và các phần tử khác của môi trường như đã nêu từ trước.

Vi khuẩn có thể được phân lập từ mô cây. Việc phân lập này có thể diễn ra từ mô thích hợp bất kỳ của cây, bao gồm ví dụ, rễ, thân và lá, và các mô sinh sản của cây. Ví dụ, các phương pháp thông thường để phân lập từ cây thường bao gồm bước cắt vô trùng vật liệu cây đang quan tâm (ví dụ, độ dài rễ hoặc thân, lá), vô trùng bề mặt bằng dung dịch thích hợp (ví dụ natri hypochlorit 2%), sau đó vật liệu cây này đặt trên môi trường dinh dưỡng để vi khuẩn phát triển. Theo cách khác, vật liệu cây đã được vô trùng bề mặt có thể được nghiền trong chất lỏng vô khuẩn (thường là nước)

và hỗn dịch lỏng, bao gồm các mảnh nhỏ của vật liệu cây đã nghiền phết lên bề mặt của môi trường thạch rắn thích hợp hoặc môi trường mà có thể hoặc không thể chọn lọc (ví dụ chỉ chứa axit phytic làm nguồn phospho). Phương thức này đặc biệt hữu ích cho các vi khuẩn tạo khuẩn lạc được phân lập và có thể được nhặt ra một cách riêng rẽ để tách các đĩa môi trường dinh dưỡng, và tinh chế tiếp đến còn một loài đơn nhất bằng các phương pháp đã biết. Theo cách khác, các mẫu rễ hoặc lá cây có thể không được vô trùng bề mặt mà chỉ được rửa nhẹ nhàng do đó bao gồm các vi sinh vật biểu sinh cư trú trên bề mặt trong quy trình phân lập, hoặc các vi khuẩn biểu sinh có thể được phân lập riêng rẽ, bằng cách ấn các mẫu rễ, thân hoặc lá cây lên trên bề mặt của môi trường thạch sau đó nhấc lên và tiếp đó phân lập các khuẩn lạc đơn lẻ như trên. Phương thức này đặc biệt hữu ích đối với vi khuẩn chẳng hạn. Theo cách khác, rễ có thể được xử lý mà không rửa trôi các lượng đất nhỏ bám vào rễ, do đó bao gồm các vi khuẩn xâm chiếm bầu rễ cây. Theo cách khác, đất bám dính vào rễ có thể được loại bỏ, pha loãng và phết lên thạch của môi trường chọn lọc và không chọn lọc thích hợp để phân lập các khuẩn lạc đơn lẻ của vi khuẩn bầu rễ.

Giống cây thuần khiết về mặt sinh học của *Rahnella aquatilis* và *Enterobacter sacchari* được nộp lưu ngày 14/7/2015 vào Thư viện giống chuẩn Mỹ (American Type Culture Collection-ATCC; một cơ quan nộp lưu quốc tế), Manassas, VA, Mỹ, và được cấp số ký hiệu nộp lưu Patent ATTC lần lượt là 122293 và PTA-122294. Việc nộp lưu được thực hiện theo quy định của Hiệp ước Budapest về Công nhận Quốc tế đối với việc Nộp lưu Chung Vi sinh vật nhằm tiến hành các thủ tục về patent và Quy định kèm theo (Hiệp ước Budapest).

Chế phẩm

Chế phẩm chứa các vi khuẩn hoặc quần thể vi khuẩn được sản xuất theo các phương pháp được mô tả trong bản mô tả này và/hoặc có các đặc tính được mô tả trong bản mô tả này cũng có thể được sử dụng để cải thiện các tính trạng cây trồng. Chế phẩm chứa quần thể vi khuẩn này có thể được phủ lên bề mặt của hạt, và có thể ở dạng lỏng. Chế phẩm chứa lớp phủ hạt dùng cho cây trồng nông nghiệp quan trọng về mặt thương mại, ví dụ, cây lúa miến, cây cải dầu, cây cà chua, cây đậu tây, cây lúa mạch, cây lúa gạo, cây ngô, và cây lúa mì. Chế phẩm này cũng có thể được phun lên các bộ phận cây trên không hoặc sử dụng cho rễ bằng cách chèn vào luống cây sẽ

gieo hạt, tưới nước vào đất, hoặc nhúng rễ vào hỗn dịch chứa chế phẩm. Chế phẩm này có thể được khử nước theo cách thích hợp để duy trì khả năng sống của tế bào và khả năng chủng nhiễm nhân tạo và xâm chiếm cây trồng chủ. Các loài vi khuẩn có thể có mặt trong chế phẩm ở nồng độ nằm trong khoảng từ 10^8 đến 10^{10} CFU/ml. Chế phẩm này có thể được bổ sung ion kim loại vi lượng, như các ion molybden, các ion sắt, các ion mangan, hoặc tổ hợp các ion này. Nồng độ ion trong chế phẩm được mô tả trong bản mô tả này có thể nằm trong khoảng từ 0,1 mM đến khoảng 50 mM. Chế phẩm này cũng có thể được phối trộn với chất mang, như beta-glucan, carboxylmetyl xenluloza (CMC), chất polyme ngoại bào vi khuẩn (EPS), đường, sữa động vật, hoặc các chất mang thích hợp khác. Theo cách khác, có thể sử dụng các vật liệu trồng trọt hoặc than bùn để làm chất mang, hoặc có thể sử dụng các polyme sinh học mà chế phẩm được cấy trong polyme sinh học này để làm chất mang. Chế phẩm chứa quần thể vi khuẩn được mô tả trong bản mô tả này có thể cải thiện các tính trạng của cây, như thúc đẩy sự sinh trưởng của cây, duy trì hàm lượng chlorophyll cao trong lá, gia tăng số lượng quả hoặc hạt, và gia tăng trọng lượng của từng quả hoặc hạt.

Chế phẩm chứa quần thể vi khuẩn được mô tả trong bản mô tả này có thể được phủ lên bề mặt hạt. Như vậy, chế phẩm bao gồm hạt được phủ bằng một hoặc nhiều vi khuẩn được mô tả trong bản mô tả này cũng nằm trong phạm vi của sáng chế. Lớp phủ hạt có thể được tạo thành bằng cách trộn quần thể vi khuẩn với chất mang dạng hạt tro về mặt hóa học và xốp rỗng. Theo cách khác, chế phẩm này có thể được chèn trực tiếp vào luống cày sẽ gieo hạt hoặc phun lên lá cây hoặc sử dụng bằng cách nhúng rễ vào hỗn dịch chứa chế phẩm này. Lượng hữu hiệu của chế phẩm này có thể được sử dụng để vi khuẩn sống đang sinh trưởng cư trú được ở vùng dưới đất gần với rễ cây, hoặc để vi khuẩn sống đang phát triển cư trú được trên lá. Nói chung, lượng hữu hiệu là lượng đủ để tạo ra cây có tính trạng được cải thiện (ví dụ mức cố định nitơ mong muốn).

Các chế phẩm vi khuẩn được mô tả trong bản mô tả này có thể được phối trộn bằng cách sử dụng chất mang nông dụng. Dạng phối trộn hữu ích cho các phương án này bao gồm ít nhất một thành viên được chọn từ nhóm gồm chất dính, chất làm ổn định vi khuẩn, chất diệt nấm, chất kháng khuẩn, chất diệt cỏ, chất diệt giun tròn, chất diệt côn trùng, chất điều hoà sinh trưởng thực vật, phân bón, chất diệt động vật gặm

nhấm, chất hút ẩm và chất dinh dưỡng. Ví dụ, chế phẩm bất kỳ trong số các chế phẩm được mô tả trong bản mô tả này có thể chứa chất mang nông dụng (ví dụ, một hoặc nhiều phân bón như phân bón không có trong tự nhiên, chất kết dính như chất kết dính không có trong tự nhiên, và chất diệt loài gây hại như chất diệt loài gây hại không có trong tự nhiên). Chất kết dính không có trong tự nhiên có thể là, ví dụ, polyme, copolyme, hoặc sáp tổng hợp. Ví dụ, bất kỳ trong số hạt giống được phủ, cây giống, hoặc cây được mô tả trong bản mô tả này có thể chứa chất mang nông dụng trong lớp phủ hạt. Trong chế phẩm hoặc phương pháp bất kỳ trong số các chế phẩm hoặc phương pháp được mô tả trong bản mô tả này, chất mang nông dụng có thể là hoặc có thể bao gồm hợp chất không có trong tự nhiên (ví dụ, phân bón không có trong tự nhiên, chất kết dính không có trong tự nhiên như polyme, copolyme, hoặc sáp tổng hợp, hoặc chất diệt loài gây hại không có trong tự nhiên). Các ví dụ không mang tính giới hạn về các chất mang nông dụng được mô tả dưới đây. Các ví dụ bổ sung về các chất mang nông dụng là đã biết trong lĩnh vực này.

Trong một vài trường hợp, các vi khuẩn được trộn với chất mang nông dụng. Chất mang này có thể là chất mang rắn hoặc chất mang lỏng, và ở nhiều dạng khác nhau bao gồm vi cầu, bột, nhũ tương và dạng tương tự. Chất mang có thể là một hoặc nhiều chất mang bất kỳ trong số các chất mang mang lại nhiều tính chất, như tăng độ ổn định, khả năng thấm ướt hoặc khả năng phân tán. Các chất thấm ướt như các chất hoạt động bề mặt tự nhiên hoặc tổng hợp, mà có thể là chất hoạt động bề mặt phi ion hoặc ion, hoặc tổ hợp của chúng có thể có trong chế phẩm này. Nhũ tương nước-trong-dầu cũng có thể được sử dụng để phối trộn chế phẩm chứa vi khuẩn được phân lập (xem, ví dụ, Patent Mỹ số 7485451). Các chế phẩm thích hợp có thể được pha chế bao gồm bột có thể thấm ướt, hạt, gel, băng thạch hoặc viên, chất làm đặc, và dạng tương tự, các hạt vi nang, và dạng tương tự, các chất lỏng như dịch lỏng chứa nước, hỗn dịch chứa nước, nhũ tương nước-trong-dầu v.v.. Chế phẩm có thể bao gồm các sản phẩm hạt hoặc hạt đậu, ví dụ, bột nghiền mịn hoặc bột đậu, canh hoặc bột thu được từ hạt hoặc đậu, tinh bột, đường hoặc dầu.

Theo một vài phương án, chất mang nông nghiệp có thể là đất hoặc môi trường sinh trưởng thực vật. Các chất mang nông nghiệp khác mà có thể được sử dụng bao gồm nước, phân bón, dầu gốc thực vật, chất làm ẩm, hoặc tổ hợp của chúng. Theo

cách khác, chất mang nông nghiệp có thể là chất rắn, như đất tảo cát, đất mùn, silica, alginat, đất sét, bentonit, vermiculit, vỏ hạt, các sản phẩm thực vật và động vật khác, hoặc dạng kết hợp, bao gồm hạt, viên, hoặc hỗn dịch. Các hỗn hợp của thành phần bất kỳ trong số các thành phần nêu trên cũng được dự định làm chất mang, như, nhưng không bị giới hạn ở, pesta (bột và đất sét kaolin), viên gốc thạch hoặc bột mịn trong đất mùn, cát, hoặc đất sét v.v.. Các chế phẩm có thể bao gồm nguồn thức ăn cho vi khuẩn, như lúa mạch, gạo, hoặc các sinh chất khác như hạt, bộ phận của cây, bã mía, vỏ hoặc trấu từ quy trình xử lý hạt, vật liệu thực vật nghiền hoặc gỗ nghiền từ chất thải công trình xây dựng, mùn cưa hoặc sợi mảnh từ quá trình tái chế giấy, vải hoặc gỗ.

Ví dụ, phân bón có thể được sử dụng để hỗ trợ thúc đẩy sự sinh trưởng hoặc cung cấp chất dinh dưỡng cho hạt giống, cây giống, hoặc cây. Các ví dụ không mang tính giới hạn về phân bón bao gồm nitơ, phospho, kali, canxi, lưu huỳnh, magie, bo, clorua, mangan, sắt, kẽm, đồng, molybden, và selen (hoặc muối của chúng). Các ví dụ bổ sung về phân bón bao gồm một hoặc nhiều axit amin, các muối, các hydrat cacbon, các vitamin, glucoza, NaCl, dịch chiết nấm men, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, glyxerol, valin, L-loxin, axit lactic, axit propionic, axit succinic, axit malic, axit xitric, KH tartrat, xyloza, lyxoz, và lexithin. Theo một phương án, chế phẩm có thể chứa chất dính hoặc chất kết dính (được gọi là tác nhân kết dính) để hỗ trợ liên kết các hoạt chất khác với cơ chất (ví dụ, bề mặt hạt). Các chất này hữu ích để kết hợp vi khuẩn với chất mang mà có thể chứa các hợp chất khác (ví dụ, các tác nhân kiểm soát không phải là sinh phẩm), để tạo chế phẩm phủ. Chế phẩm này hỗ trợ tạo lớp phủ xung quanh cây hoặc hạt giống để duy trì sự tiếp xúc giữa vi khuẩn và các chất khác với cây hoặc bộ phận của cây. Theo một phương án, các chất kết dính được chọn từ nhóm gồm: alginat, gôm, tinh bột, lexithin, formononetin, rượu polyvinyl, formononetinat kiềm, hesperetin, polyvinyl axetat, xephalin, gôm Arabic, gôm Xanthan, dầu khoáng, Polyetylen Glycol (PEG), Polyvinyl pyrrolidon (PVP), Arabino-galactan, methyl xenluloza, PEG 400, Chitosan, Polyacrylamit, Polyacrylat, Polyacrylonitril, Glyxerol, Trietylen glycol, Vinyl Axetat, gôm Gellan, Polystyren, Polyvinyl, Carboxymetyl xenluloza, gôm Ghatti, và copolyme khối polyoxyetylen-polyoxybutylen.

Theo một vài phương án, các chất kết dính có thể là, ví dụ, sáp như sáp carnauba, sáp ong, sáp Trung quốc, sáp shellac, sáp spermaceti, sáp candelilla, sáp thầu dầu, sáp ouricury, và sáp cám gạo, polysacarit (ví dụ, tinh bột, dextrin, maltodextrin, alginat, và chitosan), chất béo, dầu, protein (ví dụ, gelatin và đạm ngô), gồm arabic, và gồm shellac. Các chất kết dính có thể là các hợp chất không có trong tự nhiên, ví dụ, polyme, copolyme, và sáp. Ví dụ, các ví dụ không mang tính giới hạn về các polyme mà có thể được sử dụng làm chất kết dính bao gồm: các polyvinyl axetat, copolyme polyvinyl axetat, copolyme etylen vinyl axetat (EVA), rượu polyvinyl, copolyme rượu polyvinyl, xenluloza (ví dụ, etyl xenluloza, metyl xenluloza, hydroxymetyl xenluloza, hydroxypropyl xenluloza, và carboxymetyl xenluloza), polyvinylpyrrolidon, vinyl clorua, copolyme vinyliden clorua, canxi lignosulfonat, copolyme acrylic, polyvinylacrylat, polyetylen oxit, polyme và copolyme acylamit, polyhydroxyetyl acrylat, monome metylacrylamit, và polyclopren.

Trong một vài ví dụ, một hoặc nhiều hợp chất trong số chất kết dính, chất chống nấm, chất điều hoà sinh trưởng, và chất diệt loài gây hại (ví dụ, chất diệt côn trùng) là các hợp chất không có trong tự nhiên (ví dụ, theo tổ hợp bất kỳ). Các ví dụ bổ sung về các chất mang nông dụng bao gồm chất phân tán (ví dụ, polyvinylpyrrolidon/vinyl axetat PVPIVA S-630), chất hoạt động bề mặt, chất liên kết, và chất độn.

Chế phẩm cũng có thể chứa chất hoạt động bề mặt. Các ví dụ không mang tính giới hạn về các chất hoạt động bề mặt bao gồm hỗn hợp chất hoạt động bề mặt-nitơ như Prefer 28 (Cenex), Surf-N(US), Inhance (Brandt), P-28 (Wilfarm) và Patrol (Helena); dầu hạt được este hóa bao gồm Sun-It II (AmCy), MSO (UAP), Scoil (Agasco), Hasten (Wilfarm) và Mes-100 (Drexel); và các chất hoạt động bề mặt silicon hữu cơ bao gồm Silwet L77 (UAP), Silikin (Terra), Dyne-Amic (Helena), Kinetic (Helena), Sylgard 309 (Wilbur-Ellis) và Century (Precision). Theo một phương án, chất hoạt động bề mặt có mặt với nồng độ nằm trong khoảng từ 0,01% đến 10% theo thể tích. Theo một phương án khác, chất hoạt động bề mặt có mặt với nồng độ nằm trong khoảng từ 0,1% đến 1% theo thể tích.

Trong một số trường hợp, chế phẩm chứa chất làm ổn định vi khuẩn. Chất này có thể bao gồm chất hút ẩm mà có thể bao gồm hợp chất bất kỳ hoặc hỗn hợp bất kỳ của các hợp chất có thể được phân loại là chất hút ẩm bất kể việc hợp chất hoặc các hợp chất này có được sử dụng ở nồng độ sao cho chúng có tác dụng hút ẩm đối với chất chủng nhiễm lỏng trên thực tế hay không. Các chất hút ẩm này tương thích một cách lý tưởng với quần thể vi khuẩn được sử dụng, và nên thúc đẩy khả năng của quần thể vi khuẩn này trong việc sống sót khi phủ lên hạt giống và sống sót khi hút ẩm. Các ví dụ về các chất hút ẩm thích hợp bao gồm một hoặc nhiều hợp chất trong số: trehaloza, sucroza, glyxerol, và metylen glycol. Các chất hút ẩm thích hợp khác, bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, đường không khử và rượu đường (ví dụ, manitol hoặc sorbitol). Lượng chất hút ẩm được đưa vào chế phẩm có thể nằm trong khoảng từ khoảng 5% đến 50% theo trọng lượng/thể tích, ví dụ, trong khoảng từ 10% đến 40%, trong khoảng từ 15% đến 35%, hoặc trong khoảng từ 20% đến 30%. Trong một vài trường hợp, có lợi cho chế phẩm này khi chứa các chất như chất diệt nấm, chất kháng khuẩn, chất diệt cỏ, chất diệt giun tròn, chất điều hoà sinh trưởng thực vật, chất diệt động vật gặm nhấm, hoặc chất dinh dưỡng. Các ví dụ không mang tính giới hạn về chất điều hoà sinh trưởng bao gồm brassinosteroid, xytokinin (ví dụ, kinetin và zeatin), auxin (ví dụ, axit indolylaxetic và indolylaxetyl aspartat), flavonoid và isoflavonoid (ví dụ, formononetin và diosmetin), phytoalexin (ví dụ, glyxeolin), và oligosaccharit cảm ứng phytoalexin (ví dụ, pectin, chitin, chitosan, axit polygalacturonic, và axit oligogalacturonic), và gibberelin. Các chất này tương thích một cách lý tưởng với hạt giống hoặc cây giống nông nghiệp sử dụng chế phẩm này (ví dụ, nó không nên gây hại cho sự sinh trưởng hay khoẻ mạnh của cây). Hơn nữa, chất này là chất lý tưởng mà không gây quan ngại về tính an toàn khi sử dụng cho người, động vật hoặc trong công nghiệp (ví dụ, không có vấn đề gì về tính an toàn, hoặc hợp chất này không bền vừa đủ sao cho sản phẩm hàng hóa thực vật thu được từ cây chứa hợp chất này với các lượng không đáng kể).

Ở dạng chất lỏng, ví dụ, dung dịch hoặc hỗn dịch, các quần thể vi khuẩn có thể được trộn hoặc tạo hỗn dịch trong nước hoặc trong dung dịch chứa nước. Các chất pha loãng hoặc chất mang lỏng thích hợp bao gồm nước, dung dịch chứa nước, chất chưng cất dầu mỏ hoặc các chất mang lỏng khác.

Chế phẩm rắn có thể được điều chế bằng cách phân tán quần thể vi khuẩn trong và trên chất mang rắn được phân chia thích hợp, như than bùn, bột lúa mỳ, bột cám, vermiculit, đất sét, bột talc, bentonit, đất diatomit, đất sét fuller, đất thanh trùng, và chất tương tự. Khi các chế phẩm này được sử dụng dưới dạng bột thấm ướt, thì chất phân tán tương thích sinh học như các chất phân tán và nhũ hóa phi ion, anion, lưỡng tính hoặc cation có thể được sử dụng.

Các chất mang rắn được sử dụng cho chế phẩm bao gồm, ví dụ, các chất mang khoáng như đất sét kaolin, pyrophyllit, bentonit, montmorillonit, đất diatomit, đất trắng axit, vermiculit, và pearlit, và các muối vô cơ như amoni sulfat, amoni phosphat, amoni nitrat, ure, amoni clorua, và canxi cacbonat. Tương tự, các bột mịn hữu cơ như bột mỳ, bột cám gạo, và cám gạo có thể được sử dụng. Các chất mang lỏng bao gồm dầu thực vật như dầu đậu nành và dầu hạt bông, glyxerol, etylen glycol, polyetylen glycol, propylen glycol, polypropylen glycol, v.v..

Loài thực vật

Các phương pháp và vi khuẩn được mô tả trong bản mô tả này thích hợp cho bất kỳ thực vật nào trong số nhiều loại thực vật, như các thực vật thuộc giống *Hordeum*, *Oryza*, *Zea*, và *Triticeae*. Các ví dụ không mang tính giới hạn khác về các thực vật thích hợp bao gồm rêu, địa y, và tảo. Trong một vài trường hợp, các thực vật này có giá trị kinh tế, xã hội, và/hoặc môi trường, như cây lương thực, cây lấy sợi, cây lấy dầu, các thực vật trong lâm nghiệp hoặc công nghiệp bột và giấy, nguyên liệu để sản xuất nhiên liệu sinh học và/hoặc các thực vật làm cảnh. Các ví dụ không mang tính giới hạn về cây trồng bao gồm cây ngô, cây lúa gạo, cây lúa mỳ, cây lúa mạch, cây lúa miến, cây kê, cây yến mạch, cây lúa mạch đen, cây kiều mạch, cây ngô ngọt, cây mía, cây hành, cây cà chua, cây dâu tây, và cây măng tây.

Các thực vật có thể thu được hoặc được cải thiện bằng cách sử dụng các phương pháp và chế phẩm được mô tả trong bản mô tả này còn bao gồm cây dừa, cây chuối, cây dưa, cây Huệ tây, và cây cỏ; và các thực vật hai lá mầm, như, ví dụ, cây đậu Hà lan, cây cỏ linh lăng, cây cà chua xanh Mê-xi-cô, cây dưa, cây đậu gà, cây cải ô rô, cây cỏ ba lá, cây cải xoăn, cây đậu lăng, cây đậu tương, cây thuốc lá, cây khoai tây, cây khoai lang, cây củ cải, cây bắp cải, cây cải dầu, cây táo, cây nho, cây bông,

cây hướng dương, cây *Arabidopsis thaliana*, cây cải dầu, cây cam quýt (bao gồm cam, quýt, quýt vàng, chanh tây, chanh xanh, bưởi chùm, quất, cam bưởi (tangelo), thanh yên, và bưởi), cây hồ tiêu, cây đậu, và cây rau diếp.

Trong một vài trường hợp, cây cần cải thiện không dễ điều chỉnh theo các điều kiện thí nghiệm. Ví dụ, cây trồng có thể mất quá nhiều thời gian để đủ lớn để đánh giá được tính trạng cải thiện trải qua nhiều chu kỳ phát triển trên thực tế. Do đó, cây thứ nhất mà các vi khuẩn bước đầu được phân lập từ đó, và/hoặc nhiều cây mà các vi khuẩn đã được thiết kế di truyền được đưa vào có thể là cây mô hình, như cây dễ điều chỉnh để đánh giá trong điều kiện mong muốn. Các ví dụ không mang tính giới hạn về các cây mô hình bao gồm *Setaria*, *Brachypodium*, và *Arabidopsis*. Sau đó, khả năng của vi khuẩn đã được phân lập theo phương pháp theo sáng chế bằng cách sử dụng cây mô hình có thể được áp dụng cho cây thuộc một loại khác (ví dụ cây trồng) để khẳng định việc có mang lại tính trạng được cải thiện.

Các tính trạng mà có thể được cải thiện theo các phương pháp được mô tả trong bản mô tả này bao gồm đặc tính có thể nhận thấy bất kỳ của cây, bao gồm, ví dụ, tốc độ sinh trưởng, chiều cao, trọng lượng, màu sắc, vị, mùi, các thay đổi trong việc sản sinh một hoặc nhiều hợp chất của cây (bao gồm ví dụ, các chất chuyển hóa, protein, dược chất, hydrat cacbon, dầu, và các hợp chất khác bất kỳ). Việc chọn lọc cây dựa trên thông tin kiểu gen cũng được dự định (ví dụ, bao gồm hình mẫu biểu hiện gen ở cây đáp ứng với vi khuẩn, hoặc xác định sự có mặt của chỉ thị di truyền, như các chỉ thị liên quan đến sự tăng cố định nitơ). Các cây cũng có thể được chọn lọc dựa trên việc không có, kìm hãm hoặc ức chế một số đặc điểm hoặc tính trạng nhất định (như đặc điểm hoặc tính trạng không mong muốn) trái với việc có mặt đặc điểm hoặc tính trạng nhất định (như đặc điểm hoặc tính trạng mong muốn).

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ trong bản mô tả này mô tả các phương pháp phân lập vi khuẩn, phân tích vi khuẩn và thực vật, và sự cải thiện tính trạng cây trồng. Các ví dụ này chỉ nhằm mục đích minh họa và không được hiểu là làm giới hạn sáng chế theo bất kỳ cách nào.

Ví dụ 1: Phân lập các vi khuẩn từ mô cây

Tầng đất mặt thu được từ nhiều vùng nông nghiệp ở miền trung California. Thu gom 20 mẫu đất với các đặc tính kết cấu đa dạng, bao gồm đất sét nặng, đất sét mùn có than bùn, đất sét bùn, và đất sét pha cát. Hạt giống của các cây ngô thực địa, cây ngô ngọt, cây ngô di sản và cây cà chua được gieo vào từng loại đất, như thể hiện trong Bảng 1.

Loại cây trồng	Cây ngô thực địa	Cây ngô ngọt	Cây ngô di sản	Cây cà chua
Giống	Mo17	Ferry-Morse 'Golden Cross Bantam T-51'	Victory Seeds 'Moseby Prolific'	Ferry-Morse Roma VF
	B73	Ferry-Morse 'Silver Queen Hybrid'	Victory Seeds 'Reid's Yellow Dent'	Stover Roma
	DKC 66-40	Ferry-Morse 'Sugar Dots'	Victory Seeds 'Hickory King'	Totally Tomatoes 'Micro Tom Hybrid'
	DKC 67-07			Heinz 1015
	DKC 70-01			Heinz 2401
				Heinz 3402
				Heinz 5508
				Heinz 5608
				Heinz 8504

Bảng 1: Loại và giống cây trồng được gieo ở đất có các đặc tính khác nhau

Các cây được nhổ rễ sau khi trồng từ 2 đến 4 tuần và loại bỏ đất dư thừa trên bề mặt rễ bằng nước đã khử ion. Sau khi loại bỏ đất, các cây này được vô trùng bề mặt bằng chất tẩy và rửa kỹ trong nước vô trùng. Cát lấy đoạn rễ 1 cm đã rửa sạch từ cây này và cho vào dung dịch nước muối đậm phosphat chứa các hạt thép 3 mm. Tạo ra huyền phù đặc bằng cách lắc mạnh dung dịch này bằng Qiagen TissueLyser II.

Pha loãng huyền phù đặc chứa rễ và nước muối này và chủng nhiễm vào nhiều loại môi trường sinh trưởng khác nhau để phân lập các vi khuẩn sống trong bầu rễ, nội sinh, biểu sinh, và các vi khuẩn liên quan đến cây khác. Sử dụng môi trường thạch R2A và Nfb để thu được các khuẩn lạc đơn nhất, và sử dụng môi trường nghiêng Nfb bán rắn để thu được quần thể các vi khuẩn cố định nitơ. Sau khi ủ từ 2 đến 4 tuần trong môi trường nghiêng Nfb bán rắn, thu gom các quần thể vi khuẩn và cấy vạch để thu được các khuẩn lạc đơn nhất trên thạch R2A, như được thể hiện trên Fig.1A-

Fig.1B. Tạo lại huyền phù các khuẩn lạc đơn nhất trong hỗn hợp gồm R2A và glyxerol, cho phân tích PCR, và đông lạnh ở nhiệt độ -80°C để phân tích sau. Thu được khoảng 1.000 khuẩn lạc đơn nhất và gọi là “các vi khuẩn đã phân lập”.

Các thể phân lập tiếp đó được tiến hành sàng lọc PCR khuẩn lạc để phát hiện sự có mặt của gen *nifH* để nhận biết các sinh vật cố định nitơ. Sử dụng bộ đoạn môi đã mô tả ở trên Ueda 19F/388R, mà cho thấy là phát hiện ra hơn 90% sinh vật cố định nitơ trong các phiên sàng lọc, để dò sự có mặt của cụm *nif* trong mỗi thể phân lập (J. Bacteriol. 177: 1414–1417, 1995 của Ueda *et al.*). Nhặt các khuẩn lạc đơn nhất của các thể phân lập đã tinh chế, tạo lại huyền phù trong PBS, và sử dụng làm khuôn mẫu cho PCR khuẩn lạc, như thể hiện trên Fig.2. Các khuẩn lạc của các thể phân lập mà cho vạch PCR dương tính được cấy vạch lại, và lặp lại quy trình PCR khuẩn lạc và quy trình cấy vạch lại hai lần để tránh nhận biết các sinh vật cố định nitơ dương tính giả. Các thể phân lập đã tinh chế sau đó được gọi là “các vi khuẩn ứng viên”.

Ví dụ 2: Xác định đặc tính của các vi khuẩn đã phân lập

Giải trình tự, phân tích và xác định đặc tính phát sinh loài

Phương pháp giải trình tự ADN ribosom 16S bằng bộ đoạn môi 515f-806r được sử dụng để tạo ra các đặc điểm nhận dạng phát sinh loài sơ bộ cho vi khuẩn đã phân lập và vi khuẩn ứng viên (xem tài liệu, ví dụ: BMC Microbiol. 2002 Dec 23;2:39. của Vernon *et al.*). Các vi khuẩn bao gồm các giống khác nhau bao gồm: *Enterobacter*, *Burkholderia*, *Klebsiella*, *Bradyrhizobium*, *Rahnella*, *Xanthomonas*, *Raoultella*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Brevundimonas*, *Agrobacterium*, và *Paenibacillus*, như được thể hiện trong Bảng 2.

GIỐNG	PHÂN LẬP	GIỐNG	PHÂN LẬP
<i>Achromobacter</i>	7	<i>Paenibacillus</i>	1
<i>Agrobacterium</i>	117	<i>Paenisparsarcina</i>	3
<i>Agromyces</i>	1	<i>Pantoea</i>	14
<i>Alicyclobacillus</i>	1	<i>Pedobacter</i>	16
<i>Asticcacaulis</i>	6	<i>Pimelobacter</i>	2
<i>Bacillus</i>	131	<i>Pseudomonas</i>	212
<i>Bradyrhizobium</i>	2	<i>Rhizobium</i>	4
<i>Brevibacillus</i>	2	<i>Rhodoferrax</i>	1
<i>Burkholderia</i>	2	<i>Sphingobacterium</i>	13
<i>Caulobacter</i>	17	<i>Sphingobium</i>	23
<i>Chryseobacterium</i>	42	<i>Sphingomonas</i>	3
<i>Comamonas</i>	1	<i>Sphingopyxis</i>	1
<i>Dyadobacter</i>	2	<i>Stenotrophomonas</i>	59
<i>Flavobacterium</i>	46	<i>Streptococcus</i>	3
<i>Halomonas</i>	3	<i>Variovorax</i>	37
<i>Leptothrix</i>	3	<i>Xylanimicrobium</i>	1
<i>Lysobacter</i>	2	không xác định	75
<i>Neisseria</i>	13		

Bảng 2: Tính đa dạng của các vi khuẩn được phân lập từ cây cà chua như được xác định bằng cách giải trình tự sâu ADN ribosom 16S.

Sau đó, hệ gen của 39 vi khuẩn ứng viên được giải trình tự bằng cách sử dụng hệ thống Illumina Miseq. ADN hệ gen từ các giống cây thuần khiết được tách chiết bằng cách sử dụng bộ kit mini QIAmp DNA (QIAGEN), và các thư viện ADN toàn phần để giải trình tự được xây dựng thông qua nhà cung cấp bên thứ ba (SeqMatic, Hayward). Tiếp đó tiến hành lắp ráp hệ gen thông qua kênh dẫn A5 (PLOS One 7(9):e42304, 2012 của Tritt et al.). Xác định và chú giải các gen, và các gen có liên quan đến việc điều hoà và biểu hiện sự cố định nitơ được ghi nhận làm đích để gây đột biến.

Xác định profin hệ phiên mã của các vi khuẩn ứng viên

Tiến hành xác định profin hệ phiên mã cho chủng CI010 để nhận biết các trình tự khởi đầu hoạt động khi có mặt nitơ môi trường. Nuôi cấy chủng CI010 trong môi trường xác định không có nitơ có bổ sung glutamin 10 mM. Tách chiết ARN toàn phần từ các giống cây này (bộ QIAGEN RNeasy) và cho giải trình tự ARNseq bằng Illumina HiSeq (SeqMatic, Fremont CA). Lập bản đồ các kết quả giải trình tự theo

dữ liệu hệ gen CI010 bằng cách sử dụng Geneious, và nhận biết các gen biểu hiện ở mức cao dưới sự kiểm soát của các trình tự khởi đầu phiên mã gần. Bảng 3A-Bảng 3C liệt kê các gen và mức biểu hiện tương đối của chúng như xác định được bằng cách giải trình tự ARNSeq cho ARN toàn phần. Ghi nhận các trình tự của trình tự khởi đầu gần để sử dụng trong quy trình gây đột biến cho các con đường *nif*, các con đường liên quan đến tiêu thụ nitơ, hoặc các gen khác có mức biểu hiện mong muốn.

Đánh giá khả năng dễ điều khiển về mặt di truyền

Các vi khuẩn ứng viên được xác định đặc tính dựa trên khả năng biến nạp và khả năng dễ điều khiển di truyền. Bước thứ nhất, xác định mức tiêu thụ nguồn cacbon tối ưu qua sự sinh trưởng trên panen nhỏ chứa môi trường thích hợp cũng như đường cong sinh trưởng trong cả môi trường không có nitơ và môi trường giàu nitơ. Bước thứ hai, xác định tính kháng kháng sinh tự nhiên của mỗi chủng thông qua cấy điểm và sự sinh trưởng trong môi trường nuôi cấy lỏng chứa panen kháng sinh được sử dụng làm chỉ thị chọn lọc để gây đột biến. Bước thứ ba, mỗi chủng được thử nghiệm về khả năng biến nạp của nó bằng cách điện di một tập hợp các plasmit. Tập hợp plasmit này bao gồm phần mở rộng tổ hợp gồm bảy điểm khởi đầu sao chép, đó là, p15a, pSC101, CloDF, colA, RK2, pBBR1, và pRO1600 và bốn chỉ thị kháng kháng sinh, đó là, CmR, KmR, SpecR, và TetR. Sử dụng phương pháp đánh giá tổng thể tính tương thích giữa điểm khởi đầu và chỉ thị kháng để nhận biết các vector dùng để gây đột biến bằng plasmit ở các vi khuẩn ứng viên.

Ví dụ 3: Gây đột biến các vi khuẩn ứng viên

Bất hoạt gen qua trung gian Lambda-Red

Tạo ra một vài thể đột biến của các vi khuẩn ứng viên bằng cách sử dụng plasmit pKD46 hoặc dẫn xuất chứa chỉ thị kháng kanamycin (PNAS 97(12): 6640-6645, 2000 của Datsenko et al.). Các cat-xet bất hoạt gen được thiết kế có đoạn tương đồng 250bp nằm bên sườn gen đích và được tạo ra thông qua phương pháp PCR mở rộng chuỗi chồng lặp. Các vi khuẩn ứng viên được biến nạp bằng pKD46, được nuôi cấy với sự có mặt của arabinoza để cảm ứng sự biểu hiện cơ cấu Lambda-Red, được chuẩn bị cho quá trình điện di, và biến nạp với các cat-xet bất hoạt gen để tạo ra các chủng đột biến ứng viên. Sử dụng bốn vi khuẩn ứng viên và một chủng phòng thí

nghiệm, *Klebsiella oxytoca* M5A1, để tạo ra mười ba thể đột biến ứng viên của gen điều hoà sự cố định nitơ *nifL*, *glnB*, và *amtB*, như được thể hiện trong Bảng 4.

Chủng	<i>nifL</i>	<i>glnB</i>	<i>amtB</i>
M5A1	X	X	X
CI006	X	X	X
CI010	X	X	X
CI019	X	X	
CI028	X	X	

Bảng 4: Danh sách các thể đột biến bất hoạt gen đơn lẻ được tạo ra bằng cách gây đột biến Lambda-red

Gây đột biến định hướng bằng oligo kèm theo chọn lọc Cas9

Phương pháp gây đột biến định hướng bằng oligo được sử dụng để hướng đích các thay đổi hệ gen đối với gen *rpoB* ở DH10B của *E. coli*, và các thể đột biến được chọn lọc bằng hệ CRISPR-Cas. Oligo gây đột biến (ss1283: “G*T*T*G*ATCAGACCGATGTTTCGGACCTTCcaagGTTTCGATCGGACATACGCGACCGTAGTGGGTCGGGTGTACGTCTCGAACTTCAAAGCC”, trong đó * chỉ liên kết phosphorothioat) được thiết kế để truyền tính kháng rifampixin cho gen *rpoB* thông qua đột biến 4 cặp bazơ (bp). Các tế bào chứa plasmit mã hóa Cas9 được cảm ứng để biểu hiện Cas9, được chuẩn bị cho quá trình điện di, và tiếp đó được điện di bằng cả oligo gây đột biến và plasmit mã hóa sự biểu hiện cơ định của ARN dẫn hướng (gARN) mà hướng đích sự phân cắt Cas9 của trình tự *rpoB* kiểu hoang (WT). Thu hồi các tế bào đã điện di trong môi trường không chọn lọc qua đêm để phân chia thỏa đáng các nhiễm sắc thể đột biến thu được. Sau khi dàn trên đĩa để chọn lọc plasmit mã hóa gARN, hai trong số mười khuẩn lạc đã sàng lọc cho thấy là chứa đột biến mong muốn, trong khi các khuẩn lạc còn lại cho thấy là các thể đột biến trốn thoát được tạo ra thông qua đột biến protospacer trong plasmit gARN hoặc mất plasmit Cas9.

Gây đột biến Lambda-Red kèm theo chọn lọc Cas9

Các thể đột biến của các vi khuẩn ứng viên CI006 và CI010 được tạo ra bằng cách gây đột biến lambda-red kèm theo chọn lọc bằng CRISPR-Cas. Các cat-xet bất

hoạt gen chứa trình tự khởi đầu nội sinh đã được nhận biết bằng cách xác định profin phiên mã (như đã mô tả trong Ví dụ 2 và trình bày trong Bảng 3) và vùng tương đồng ~250 cặp bazơ nằm bên sườn đích khuyết đoạn. CI006 và CI010 được biến nạp với các plasmit mã hóa hệ tái tổ hợp Lambda-red (các gen *exo*, *beta*, *gam*) dưới sự kiểm soát của trình tự khởi đầu *arabinoza* để cảm ứng và Cas9 dưới sự kiểm soát của trình tự khởi đầu IPTG để cảm ứng. Các hệ tái tổ hợp Red và Cas9 được cảm ứng trong các thể biến nạp thu được, và các chủng được chuẩn bị để điện di. Các cat-xet bất hoạt gen và gARN chọn lọc được mã hóa bằng plasmit tiếp đó được biến nạp vào các tế bào cạnh tranh. Sau khi dàn trên đĩa để chọn lọc kháng sinh cho cả plasmit Cas9 và plasmit gARN, thì 7 trong số 10 khuẩn lạc đã sàng lọc thể hiện đột biến bất hoạt gen dự định, như được thể hiện trên Fig.3.

Ví dụ 4: Xác định kiểu hình *in vitro* của các phân tử ứng viên

Đánh giá tác động của nitơ ngoại sinh lên hoạt tính và sự sinh tổng hợp nitrogenaza ở nhiều thể đột biến khác nhau. Sử dụng thử nghiệm khử axetylen (ARA) (109(18): 7085–7090, 2012 của Temme et al.) để xác định hoạt tính nitrogenaza trong các điều kiện nuôi cấy thuần khiết. Các chủng được để sinh trưởng trong các ống nghiệm kín khí, và định lượng mức khử axetylen thành etylen bằng phương pháp sắc ký khí Agilent 6890. Hoạt tính ARA của các vi khuẩn ứng viên và các thể đột biến ứng viên đối ứng sinh trưởng trong môi trường cố định nitơ được bổ sung từ 0 đến 10mM glutamin được thể hiện trên các hình vẽ Fig.4A đến Fig.4B và Fig.10A đến Fig.10C.

Trong điều kiện nuôi cấy kỵ khí, thử nghiệm một khoảng các nồng độ glutamin và amoniac để định lượng tác động lên hoạt tính cố định nitơ. Ở các tế bào kiểu hoang, hoạt tính này giảm nhanh khi nồng độ glutamin tăng lên. Tuy nhiên, trong một loạt các đột biến bất hoạt gen ban đầu, một nhóm đột biến được kiểm định thúc đẩy sự biểu hiện của các gen cố định nitơ ở các nồng độ glutamin mà sẽ ngừng hoạt tính này đối với kiểu hoang. Profin này được tạo ra ở bốn loài khác nhau của sinh vật cố định nitơ, như quan sát được trên Fig.4C. Ngoài ra, bằng cách nối lại mạng lưới điều hoà bằng cách sử dụng các phần di truyền đã được nhận biết, mức hoạt tính cố định nitơ đã được điều chỉnh theo dự tính. Kết quả này có thể quan sát được trên Fig.4B, hình vẽ này minh họa các chủng CM023, CM021, CM015, và CI006. Chủng CM023 là

chúng đã tiến hóa ít; chủng CM021 là chủng đã tiến hóa nhiều; chủng CM015 là chủng đã tiến hóa trung bình; chủng CI006 là kiểu hoang (chủng 2). Amoniac đã được tiết vào các dịch nổi trên bề mặt nuôi cấy được thử nghiệm bằng cách sử dụng thử nghiệm dựa trên enzym (MEGAZYME). Thử nghiệm này xác định lượng NADPH đã tiêu thụ khi hấp thụ ở bước sóng 340 nm. Tiến hành thử nghiệm này đối với các giống cây vi khuẩn sinh trưởng trong môi trường kỵ khí không có nitơ với mật độ ban đầu là $1E9$ CFU/ml. Trong panen gồm 6 chủng đã tiến hóa, 1 chủng tiết ra lên đến $100 \mu\text{M}$ amoniac trong thời gian 48 giờ, như quan sát được trên Fig.4D. Hơn nữa, thể đột biến đôi có sự tiết amoniac ở mức cao hơn so với thể đột biến đơn mà nó có nguồn gốc từ đó, như quan sát được trên Fig.11. Kết quả này chứng tỏ là khả năng sản sinh amoniac của vi khuẩn vượt quá nhu cầu sinh lý của nó.

Xác định profin phiên mã của các giống cây thuần khiết

Hoạt tính phiên mã của CI006 được xác định bằng cách sử dụng hệ thống Nanostring Elements. Các tế bào được cho sinh trưởng trong môi trường không có nitơ và thu gom $10E^8$ tế bào sau 4 giờ ủ. ARN toàn phần được tách chiết bằng cách sử dụng bộ kit Qiagen RNeasy. ARN đã tinh chế được chuyển cho Core Diagnostics ở Palo Alto, CA, để lai hóa đầu dò và phân tích Digital Analyzer, như được thể hiện trên Fig.5.

Ví dụ 5: Xác định kiểu hình *in planta* của các vi khuẩn ứng viên

Mức xâm chiếm của các vi khuẩn ứng viên trên cây

Mức xâm chiếm cây trồng chủ của vi khuẩn ứng viên được định lượng thông qua các thử nghiệm sinh trưởng thực vật thời gian ngắn. Các cây ngô được chủng nhiễm bằng chủng biểu hiện RFP từ plasmit hoặc từ cat-xet biểu hiện RFP tích hợp Tn5. Các cây ngô này được trồng trong cả cát đã vô trùng và môi trường than bùn không vô trùng, và tiến hành chủng nhiễm bằng cách nhỏ bằng pipet 1 mL dịch nuôi cấy tế bào trực tiếp lên lá bao mầm của cây mới mọc 3 ngày sau khi nảy mầm. Duy trì plasmit bằng cách tưới các cây này bằng dung dịch chứa kháng sinh thích hợp. Sau ba tuần, thu gom rễ cây, rửa ba lần trong nước vô trùng để loại bỏ đất nhìn thấy được, và chia thành hai mẫu thử. Một mẫu rễ được phân tích bằng cách soi kính hiển vi huỳnh quang để xác định kiểu cư trú của các vi khuẩn ứng viên. Tiến hành soi kính

hiện vi trên các đoạn dài 10mm của phần rễ cây nguyên vẹn tốt nhất, như được thể hiện trên Fig.6.

Phương pháp định lượng thứ hai để đánh giá mức xâm chiếm được phát triển. Tiến hành thử nghiệm PCR định lượng trên các chế phẩm ADN toàn phần từ các rễ cây được chủng nhiễm các loài nội sinh. Cho nảy mầm hạt giống ngô (Dekalb DKC-66-40) trong cát đã hấp tiệt trùng từ trước trong các chậu kích thước 2,5 inch (6,35 cm) x 2,5 inch (6,35 cm) x 10 inch (25,4 cm). Một ngày sau khi gieo, thấm 1ml dịch nuôi cấy qua đêm của vi khuẩn nội sinh (môi trường SOB) vào ngay điểm gieo hạt giống. 1mL dịch nuôi cấy qua đêm này gần tương đương với khoảng 10^9 cfu, thay đổi chênh nhau khoảng 3 lần, tùy thuộc vào chủng sẽ sử dụng. Mỗi cây giống được bón 3 lần/tuần bằng 50mL dung dịch Hoagland đã cải biến có bổ sung dung dịch amoni nitrat 2,5mM hoặc 0,25mM. Ở thời điểm 4 tuần sau khi trồng, thu gom các mẫu rễ để tách chiết ADN. Rửa sạch đất bám bằng cách xịt nước có áp lực. Tiếp đó các mẫu mô này được đồng nhất hóa bằng cách sử dụng QIAGEN Tissuelyzer và ADN được tách chiết sau đó bằng cách sử dụng bột kit QIAmp DNA Mini (QIAGEN) theo quy trình được khuyến cáo. Tiến hành thử nghiệm qPCR bằng cách sử dụng Stratagene Mx3005P RT-PCR đối với các dịch chiết ADN này bằng cách sử dụng các đoạn mồi đã thiết kế (sử dụng Primer BLAST của NCBI) để đặc hiệu với locus ở từng hệ gen của loài nội sinh. Sự có mặt của bản sao hệ gen của các loài nội sinh được định lượng. Để khẳng định hơn nữa đặc điểm nhận dạng của các loài nội sinh, các sản phẩm khuếch đại PCR được giải trình tự và được khẳng định là có trình tự đúng. Tóm tắt về profin xâm chiếm của chủng CI006 và CI008 từ các vi khuẩn ứng viên được trình bày trong Bảng 5. Tỷ lệ xâm chiếm cao đến mức 10^7 x cfu/g rễ tươi được thể hiện ở chủng CI008.

Chủng	Tỷ lệ xâm chiếm (CFU/g rễ tươi)
CI006	$1,45 \times 10^5$
CI008	$1,24 \times 10^7$

Bảng 5: Xâm chiếm cây ngô như xác định bằng qPCR

Xác định profin ARN *in planta*

Mức sinh tổng hợp của các thành phần của con đường nif *in planta* được ước tính bằng cách xác định mức phiên mã của các gen nif. ARN toàn phần thu được từ mô rễ cây của các cây được chủng nhiễm CI006 (phương pháp gieo trồng như được mô tả ở trên). Tiến hành tách chiết ARN bằng cách sử dụng bột kit mini RNEasy theo quy trình được khuyến cáo (QIAGEN). ARN toàn phần từ các mô cây này tiếp đó được thử nghiệm bằng bộ kit Nanostring Elements (NanoString Technologies, Inc.) bằng cách sử dụng đầu dò đặc hiệu với các gen nif trong hệ gen của chủng CI006. Dữ liệu về mức biểu hiện của gen nif *in planta* được tóm tắt trong Bảng 6. Phát hiện có sự biểu hiện các gen nifH ở các cây được chủng nhiễm bằng chủng CM013 trong khi đó không phát hiện được là có sự biểu hiện nifH ở các cây được chủng nhiễm bằng chủng CI006. Chủng CM013 là bắt nguồn từ chủng CI006, trong đó gen nifL đã được làm bất hoạt.

Các gen được biểu hiện ở mức cao của CM011, được xếp loại theo số lượng bản phiên mã/triệu kilobazơ (TPM), được xác định *in planta* trong điều kiện có bón phân. Các trình tự khởi đầu kiểm soát sự biểu hiện của một vài gen trong số các gen được biểu hiện ở mức cao này được sử dụng làm khuôn mẫu để tái tổ hợp tương đồng vào các locus đồng hóa và cố định nitơ đích. Các mẫu ARN từ cây được chủng nhiễm CM011 trồng trong nhà kính được tách chiết, ARN ribosom được loại bỏ bằng cách sử dụng bộ kit Ribo-Zero, được giải trình tự bằng cách sử dụng hệ Truseq của Illumina và lập bản đồ gen ngược theo hệ gen của CM011. Các gen được biểu hiện ở mức cao từ CM011 được liệt kê trong Bảng 7.

Chủng	Mức biểu hiện phiên mã tương đối
CI006	9,4
CM013	103,25

Bảng 6: Biểu hiện của nifH *in planta*

Tên gen	Vị trí gen	Hướng	Số lượng đọc kết quả thô	TPM (Bản phiên mã/triệu kilobazo)
Trình tự mã hóa (CDS) rpsH	18196 - 18588	ngược chiều	4841,5	27206,4
CDS rplQ	11650 - 12039	ngược chiều	4333	24536,2
CDS rpsJ	25013 - 25324	ngược chiều	3423	24229
CDS rplV	21946 - 22278	ngược chiều	3367,5	22333
CDS rpsN	18622 - 18927	ngược chiều	2792	20150,1
CDS rplN	19820 - 20191	ngược chiều	3317	19691,8
CDS rplF	17649 - 18182	ngược chiều	4504,5	18628,9
CDS rpsD	13095 - 13715	ngược chiều	5091,5	18106,6
CDS rpmF	8326 - 8493	xuôi chiều	1363,5	17923,8
CDS rplW	23429 - 23731	ngược chiều	2252	16413,8
CDS rpsM	14153 - 14509	ngược chiều	2269	14036,2
CDS rplR	17286 - 17639	ngược chiều	2243,5	13996,1
CDS rplC	24350 - 24979	ngược chiều	3985	13969,2
CDS rplK	25526 - 25954	ngược chiều	2648,5	13634,1
CDS rplP	20807 - 21217	ngược chiều	2423	13019,5
CDS rplX	19495 - 19809	ngược chiều	1824	12787,8
CDS rpsQ	20362 - 20616	ngược chiều	1460,5	12648,7
CDS bhsA 3	79720 - 79977	ngược chiều	1464	12531,5
CDS rpmC	20616 - 20807	ngược chiều	998,5	11485
CDS rpoA	12080 - 13069	ngược chiều	4855	10830,2
CDS rplD	23728 - 24333	ngược chiều	2916,5	10628,5
CDS bhsA 1	78883 - 79140	ngược chiều	1068	9141,9
CDS rpsS	22293 - 22571	ngược chiều	1138,5	9011,8
CDS rpmA	2210 - 2467	xuôi chiều	1028,5	8803,7
CDS rpmD	16585 - 16764	ngược chiều	694,5	8520,8
CDS rplB	22586 - 23410	ngược chiều	3132	8384
CDS rpsC	21230 - 21928	ngược chiều	2574,5	8133,9
CDS rplE	18941 - 19480	ngược chiều	1972,5	8066,9
CDS rplO	16147 - 16581	ngược chiều	1551	7874,2
CDS của SecY cấu trúc siêu phân tử vận chuyển tiền chất protein	14808 - 16139	ngược chiều	4657	7721,2
CDS rpsE	16771 - 17271	ngược chiều	1671,5	7368
CDS rpsK	13746 - 14135	ngược chiều	1223,5	6928,2
CDS tufA	27318 - 28229	ngược chiều	2850	6901,3
CDS rpmI	38574 - 38771	xuôi chiều	615	6859,5
CDS rplU	1880 - 2191	xuôi chiều	935,5	6621,7
CDS rplT	38814 - 39170	xuôi chiều	1045	6464,4
CDS bhsA 2	79293 - 79550	ngược chiều	754	6454,1

Tên gen	Vị trí gen	Hướng	Số lượng đọc kết quả thô	TPM (Bản phiên mã/triệu kilobazơ)
CDS rpmB	8391 - 8627	ngược chiều	682	6355,1
CDS rplJ	23983 - 24480	ngược chiều	1408	6243,9
CDS fusA 2	481 - 2595	ngược chiều	5832	6089,6
CDS rpsA	25062 - 26771	ngược chiều	4613	5957,6
CDS rpmJ	14658 - 14774	ngược chiều	314	5926,9
CDS rpsR	52990 - 53217	xuôi chiều	603	5840,7
CDS rpsG	2692 - 3162	ngược chiều	1243	5828,2
CDS rpsI	11354 - 11746	ngược chiều	980,5	5509,8
CDS cspC 1	8091 - 8300	ngược chiều	509	5352,8
CDS rpsF	52270 - 52662	xuôi chiều	916	5147,4
CDS rpsT	55208 - 55471	ngược chiều	602	5035,9
CDS infC	38128 - 38478	xuôi chiều	755	4750,3
CDS cspG	30148 - 30360	xuôi chiều	446	4624,2

Bảng 7

Thử nghiệm ^{15}N

Phương pháp cơ bản nhằm phát hiện sự cố định sử dụng đồng vị nitơ ^{15}N , đồng vị này tìm thấy trong khí quyển ở tỷ lệ cố định so với ^{14}N . Bằng cách bổ sung phân bón hoặc khí quyển với các nồng độ được làm giàu ^{15}N , có thể quan sát sự cố định trực tiếp, ở mức cao hơn ^{15}N được cố định từ khí quyển bổ sung khí $^{15}\text{N}_2$ (Yoshida 1980), hoặc ngược lại thông qua việc loăng phân bón đã làm giàu bằng khí N_2 khí quyển ở mô cây (Iniguez 2004). Phương pháp pha loăng cho phép quan sát nitơ đã cố định tích lũy trong thời gian sinh trưởng của cây, trong khi phương pháp khí $^{15}\text{N}_2$ hạn chế ở việc xác định sự cố định diễn ra ở khoảng cách ngắn mà cây được trồng trong khí quyển trong đó (xác định tỷ lệ). Do đó, phương pháp khí ưu việt hơn về tính đặc hiệu (khi nồng độ $^{15}\text{N}_2$ gia tăng bất kỳ trong cây cao hơn tỷ lệ trong khí quyển thì có thể quy kết một cách rõ ràng là do sự cố định) nhưng không thể thể hiện hoạt tính tích lũy.

Cả hai loại thử nghiệm đều đã được tiến hành để xác định hoạt tính cố định của chúng được cải thiện so với các cây ngô kiểu hoang và các cây ngô không được chủng nhiễm, và nhận thấy rằng tỷ lệ cố định tăng lên *in planta* đối với một vài chủng

đã cải thiện (Fig.12, Fig.14A, và Fig.14B). Các thử nghiệm này là công cụ để chứng tỏ là hoạt tính của các chủng được quan sát *in vitro* chuyển thành các kết quả *in vivo*. Hơn nữa, các thử nghiệm này cho phép xác định tác động của phân bón lên hoạt tính của chủng, điều này gợi ý ứng dụng thích hợp trong bối cảnh nông nghiệp. Quan sát thấy các kết quả tương tự khi các cây *Setaria* được chủng nhiễm bằng các chủng kiểu hoang và chủng được cải thiện (Fig.13). Hoạt tính cố định *in planta* thể hiện trên các hình vẽ Fig.14A đến Fig.14C được sao lưu thêm bởi các dữ liệu hệ phiên mã. Các chủng đã tiến hóa biểu hiện mức phiên mã *nifH* gia tăng so với chủng đối ứng kiểu hoang. Hơn nữa, nồng độ nitơ thu được từ vi khuẩn *in planta* cũng tương quan với mức xâm chiếm trên cây theo từng cây. Các kết quả này (Fig.12, Fig.13, Fig.14A đến Fig.14C, Fig.15A, và Fig.15B) củng cố giả thuyết rằng vi khuẩn này, thông qua việc điều hoà cải thiện đối với cụm gen *nif*, là lý do có vẻ đúng cho sự gia tăng nitơ thu được từ khí quyển thấy được trong mô cây. Ngoài việc xác định trực tiếp mức cố định, thì tác động của các cây chủng nhiễm có chủng cải thiện trong thử nghiệm sinh khối ở cây bị stress nitơ cũng được xác định. Mặc dù sinh khối ở cây có thể có liên quan đến nhiều tương tác có thể có của vi khuẩn với cây, các tác giả mong đợi rằng việc bổ sung nitơ đã cố định sẽ tác động đến kiểu hình của cây khi nitơ bị hạn chế. Các cây đã chủng nhiễm được trồng trong môi trường hoàn toàn không có nitơ, và nhận thấy có sự gia tăng đáng kể đối với diện tích lá, trọng lượng tươi và khô của chồi, và trọng lượng tươi và khô của rễ ở các cây đã chủng nhiễm so với cây đối chứng không được xử lý (Fig.14 C). Mặc dù các chênh lệch này không thể quy riêng là do sự cố định nitơ, số liệu này cũng củng cố cho kết luận rằng các chủng được cải thiện tích cực cung cấp nitơ cho cây. Các cây ngô và cây *Setaria* được trồng và chủng nhiễm như nêu trên. Phân bón chứa ^{15}N 1,2% được sử dụng đều đặn cho các cây thông qua tưới nước. Mức cố định nitơ bởi các vi khuẩn được định lượng bằng cách xác định nồng độ ^{15}N ở mô cây. Thu gom mô lá thứ tư và làm khô 4 tuần sau khi gieo trồng. Đồng nhất hóa các mẫu lá khô bằng cách sử dụng chùm hạt (QIAGEN Tissuelyzer) và chia nhỏ mẫu vào các nang thiếc để đo phổ khối so sánh tỷ lệ đồng vị (IRMS) (MBL Stable Isotope Laboratory ở The Ecosystems Center, Woods Hole, MA). Tính toán lượng nitơ thu được từ khí quyển (NDFA), và mức sản sinh nitơ của CI050 và CM002 được thể hiện trên Fig.7.

Thử nghiệm sản sinh hormon thực vật

Cây cà chua lùn (*Solanum lycopersicum*) giống canh tác ‘Micro-Tom’ trước đây đã được sử dụng để nghiên cứu tầm ảnh hưởng của axit indol-3-axetic đối với việc quả chín thông qua thử nghiệm *in vitro* (J Am Soc Hortic Sci 121: 520–524, 1996 của Cohen). Để đánh giá sự sản sinh và bài tiết hormon thực vật của các vi khuẩn ứng viên, thử nghiệm sàng lọc trên đĩa bằng cách sử dụng quả chưa trưởng thành của cây Micro-Tom. Các đĩa thử nghiệm nuôi cấy mô 20 giếng được chuẩn bị bằng cách làm đầy các giếng bằng môi trường thạch, để nó hóa rắn, và chấm 10 uL dịch nuôi cấy vi khuẩn qua đêm lên bề mặt thạch, như được thể hiện trên Fig.8. Các giếng có thạch chứa axit gibberelic (GA) với các lượng tăng nhưng không chứa dịch nuôi cấy vi khuẩn được sử dụng làm đối chứng dương và mẫu chuẩn. Các bông hoa một ngày sau khi ra hoa cắt từ cây Micro-Tom đang trồng được gài, đầu tiên là phần cuống, vào thạch ở điểm chấm dịch nuôi cấy vi khuẩn này. Theo dõi các bông hoa này trong 2-3 tuần, sau đó thu hoa hoạch quả và cân. Sự gia tăng khối lượng quả trên cây trên một vài bản sao cho thấy có sự sản sinh hormon thực vật do vi khuẩn chủng nhiễm, như được thể hiện trên Fig.9.

Ví dụ 6: Sự tiến hóa vi khuẩn-vật chủ theo chu kỳ

Các cây ngô được chủng nhiễm bằng CM013 và được trồng 4 tuần đến khoảng giai đoạn sinh trưởng V5. Các cây thể hiện sự tích lũy nitơ cải thiện từ các nguồn vi khuẩn bằng phân tích ^{15}N được nhỏ rễ, và rễ được rửa bằng nước áp lực để loại bỏ đất bám. Cắt lấy đoạn rễ 0,25g và rửa trong dung dịch PBS để loại bỏ các hạt đất mịn, và các vi khuẩn không bám dính. Đồng nhất hóa các mẫu mô bằng cách sử dụng các hạt thép 3mm trong QIAGEN TissueLyser II. Dịch treo mô đồng thể được pha loãng và dàn trên đĩa trên môi trường thạch SOB. Các khuẩn lạc đơn nhất được tái tạo huyền phù trong môi trường lỏng và phân tích PCR cho ADN ribosom 16S và các đột biến độc nhất đối với chủng chủng nhiễm này. Quy trình phân lập vi khuẩn, gây đột biến, chủng nhiễm, và tái phân lập có thể được lặp đi lặp lại để cải thiện các tính trạng của vi khuẩn, các tính trạng của cây, và khả năng xâm chiếm của vi khuẩn này.

Ví dụ 7: Tính tương thích giữa các vùng địa lý

Khả năng của các vi khuẩn cải tiến trong việc xâm chiếm cây đã chủng nhiễm là yếu tố quan trọng giúp cây sống khỏe mạnh trong các điều kiện thực địa. Trong khi các phương pháp phân lập đã mô tả được thiết kế để chọn lọc từ đất các vi khuẩn mà có thể có mối quan hệ gần gũi với các cây trồng như cây ngô, thì nhiều chủng có thể không xâm chiếm một cách hiệu quả trên phạm vi gồm các kiểu gen cây trồng, môi trường, loại đất, hoặc điều kiện chủng nhiễm. Do xâm chiếm là một quá trình phức tạp đòi hỏi một loạt các tương tác giữa chủng vi khuẩn và cây trồng chủ, nên việc sàng lọc khả năng cạnh tranh xâm chiếm đã trở thành phương pháp trung tâm để chọn lọc các chủng ưu tiên để phát triển tiếp. Các nỗ lực bước đầu nhằm đánh giá mức xâm chiếm sử dụng phương pháp đánh nhãn huỳnh quang cho các chủng, phương pháp này có hiệu quả nhưng mất thời gian và không nhân rộng được trên cơ sở từng chủng. Do hoạt tính xâm chiếm không dễ tuân theo sự cải thiện trực tiếp, nên nhất định các sản phẩm ứng viên tiềm năng phải được chọn từ các chủng mà là chủng xâm chiếm tự nhiên.

Thử nghiệm được thiết kế nhằm kiểm định khả năng xâm chiếm mạnh của các chủng kiểu hoang ở cây trồng chủ bất kỳ đã cho bằng cách sử dụng qPCR và các đoạn mồi đã được thiết kế nhằm đặc hiệu với chủng trong mẫu quần xã. Thử nghiệm này được dự định nhằm xác định nhanh chóng tỷ lệ xâm chiếm của các vi khuẩn từ các mẫu mô cây ngô. Các thử nghiệm ban đầu sử dụng các chủng được đánh giá là chủng xâm chiếm có thể có bằng cách sử dụng kính hiển vi huỳnh quang và kỹ thuật sử dụng đĩa cho thấy rằng phương pháp qPCR có cả tính định lượng và khả năng nhân rộng.

Thử nghiệm thông thường được tiến hành như sau: các cây, chủ yếu là giống cây ngô và cây lúa mỳ, được trồng trong hỗn hợp đất trồng than bùn trong nhà kính, lặp lại 6 chậu cho mỗi chủng. Ở thời điểm 4 hoặc 5 ngày sau khi trồng, nhỏ bằng pipet 1 mL dịch nuôi cấy đầu pha tĩnh gồm các vi khuẩn được pha loãng đến $OD_{590} = 0,6-1,0$ (khoảng $5E+08$ CFU/mL) lên lá bao mầm mới nhú. Các cây chỉ được tưới nước máy và để mọc trong 4 tuần trước khi lấy mẫu, ở thời điểm này, các cây được nhổ rễ và rửa rễ thật sạch để loại bỏ hầu hết cặn than bùn. Cắt các mẫu rễ sạch và đồng nhất hóa để tạo huyền phù gồm các mảnh tế bào thực vật và các tế bào vi khuẩn liên quan. Các tác giả đã phát triển một quy trình tách chiết ADN hiệu suất cao mà

sản xuất một cách hiệu quả hỗn hợp gồm ADN của cây và ADN vi khuẩn để sử dụng làm khuôn mẫu cho qPCR. Dựa trên các thử nghiệm có pha tế bào vi khuẩn, quy trình tách chiết ADN này cung cấp mẫu ADN vi khuẩn có tính định lượng so với trọng lượng tươi của rễ. Mỗi chủng được đánh giá bằng cách sử dụng các đoạn môi đặc hiệu với chủng được thiết kế bằng cách sử dụng Primer BLAST (Ye 2012) và so với mức khuếch đại nền từ các cây không được chủng nhiễm. Do một vài đoạn môi biểu hiện sự khuếch đại lệch đích ở các cây không được chủng nhiễm, nên xác định mức xâm chiếm theo mức khuếch đại hoặc khuếch đại gia tăng của sản phẩm đúng so với mức nền.

Thử nghiệm này được sử dụng để xác định tính tương thích của sản phẩm vi khuẩn trên nền địa lý đất khác nhau. Chất lượng đất thực địa và điều kiện thực địa có thể có ảnh hưởng to lớn đối với tác dụng của sản phẩm vi khuẩn. Độ pH của đất, khả năng giữ nước, và các vi khuẩn cạnh tranh chỉ là một vài ví dụ về các yếu tố trong đất mà có thể ảnh hưởng đến khả năng sống sót và khả năng xâm chiếm của chủng chủng nhiễm. Tiến hành thử nghiệm xâm chiếm bằng cách sử dụng ba loại đất khác nhau lấy mẫu từ thực địa ở California làm môi trường sinh trưởng của cây (Fig.16A). Mật độ chủng nhiễm trung gian được sử dụng để xác định gần đúng điều kiện nông nghiệp thực tiễn. Trong vòng 3 tuần, chủng 5 xâm chiếm tất cả các cây ở mức từ $1E+06$ đến $1E+07$ CFU/g trọng lượng tươi. Sau 7 tuần trồng, phiên bản tiến hóa của chủng 1 đã biểu hiện tỷ lệ xâm chiếm cao ($1E+06$ CFU/g trọng lượng tươi) ở tất cả các loại đất. (Fig.16B).

Ngoài ra, để đánh giá khả năng xâm chiếm trong điều kiện thực địa phức tạp, bắt đầu một khảo nghiệm thực địa trên 1-acre (0,4 ha) ở San Luis Obispo vào tháng 6/2015 để đánh giá tác động và khả năng xâm chiếm của 7 trong số các chủng kiểu hoang trên hai giống ngô thực địa. Tổ chức nghiên cứu thực địa theo hợp đồng, Pacific Ag Research, tiến hành thiết kế nông học và thực hiện khảo nghiệm này. Để chủng nhiễm, sử dụng cùng một kỹ thuật phủ hạt bằng dịch nuôi cấy than bùn đã thử nghiệm trong thử nghiệm về các phương pháp chủng nhiễm. Trong suốt mùa trồng cây, thu gom các mẫu cây để đánh giá khả năng xâm chiếm ở rễ và bên trong thân. Thu gom các mẫu từ ba ô ruộng xử lý lặp lại ở 4 và 8 tuần sau khi trồng, và từ 6 ô xử lý lặp lại ngay trước khi thu hoạch ở tuần 16. Thu hái các mẫu bổ sung từ 6 ô xử lý lặp lại được

chủng nhiễm bằng Chủng 1 và Chủng 2, cũng như ô đối chứng không được xử lý, ở thời điểm tuần 12. Đánh giá số lượng tế bào trong mỗi gam trọng lượng tươi của rễ đã rửa như với các thử nghiệm xâm chiếm khác bằng qPCR và các đoạn mồi đặc hiệu với chủng. Hai chủng, Chủng 1 và Chủng 2, thể hiện khả năng xâm chiếm rễ nhất quán và lan rộng, đạt mức tối đa ở thời điểm tuần 12 và sau đó giảm mạnh (Fig.16C). Trong khi Chủng 2 dường như có mặt với số lượng cấp khuếch đại nhỏ hơn Chủng 1, nó được tìm thấy với số lượng nhất quán hơn giữa các cây. Không có chủng nào có vẻ xâm chiếm hiệu quả bên trong thân. Để củng cố cho các dữ liệu về xâm chiếm theo qPCR, cả hai chủng đã được phân lập lại thành công từ các mẫu rễ bằng cách sử dụng kỹ thuật dàn trên đĩa và giải trình tự 16S để nhận biết các thể phân lập có trình tự trùng khớp.

Việc sử dụng thuật ngữ chỉ số ít “một” và các dạng đề cập tương tự trong ngữ cảnh mô tả sáng chế (đặc biệt là trong ngữ cảnh về các điểm yêu cầu bảo hộ dưới đây) được hiểu là bao hàm cả số ít và số nhiều, trừ khi được nêu khác đi trong bản mô tả này, hoặc nêu trái ngược một cách rõ ràng trong ngữ cảnh. Các thuật ngữ “gồm”, “có”, “bao gồm”, và “chứa” được hiểu dưới dạng các thuật ngữ để ngỏ (tức là, có nghĩa là “bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở”,) trừ khi có lưu ý khác đi. Việc trích dẫn các khoảng giá trị trong bản mô tả này chỉ được dự định là nhằm làm phương pháp tốc ký để đề cập riêng đến từng giá trị riêng biệt nằm trong khoảng này, trừ khi được nêu khác đi trong bản mô tả này, và mỗi giá trị riêng biệt được đưa vào trong bản mô tả như thể giá trị đó được trích dẫn riêng trong bản mô tả này. Ví dụ, nếu đề cập đến khoảng giá trị từ 10 đến 15, thì các giá trị 11, 12, 13, và 14 cũng được đề cập. Tất cả các phương pháp được mô tả trong bản mô tả này có thể được tiến hành theo thứ tự thích hợp bất kỳ trừ khi được nêu khác đi trong bản mô tả này hoặc nêu trái ngược một cách rõ ràng trong ngữ cảnh. Việc sử dụng bất kỳ và tất cả các ví dụ, hoặc ngôn ngữ ví dụ (ví dụ, “như”) được đưa ra trong bản mô tả này, chỉ nhằm minh họa rõ hơn sáng chế và không nhằm giới hạn phạm vi của sáng chế trừ khi được bảo hộ khác đi. Không ngôn từ nào trong bản mô tả này sẽ được hiểu là nêu yếu tố không được bảo hộ bất kỳ là thiết yếu đối với thực tiễn của sáng chế.

Trong khi các phương án được ưu tiên của sáng chế đã được thể hiện và mô tả trong bản mô tả này, sẽ là hiển nhiên đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh

vực này rằng các phương án này được nêu chỉ nhằm mục đích minh họa. Nhiều biến thể, thay đổi và thay thế sẽ là có thể có đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này mà không vượt ra khỏi sáng chế. Cần hiểu rằng nhiều phương án thay thế cho các phương án của sáng chế được mô tả trong bản mô tả này có thể được sử dụng để thực hiện sáng chế. Dự định rằng các điểm yêu cầu bảo hộ dưới đây xác định phạm vi của sáng chế và rằng các phương pháp và cấu trúc trong phạm vi của các điểm yêu cầu bảo hộ này và các dạng tương đương của chúng cũng thuộc phạm vi của sáng chế.

Bảng 3A

Tên	Tối thiểu	Tối đa	Độ dài	Hướng
CDS lipoprotein murein	2.929.898	2.930.134	237	xuôi chiều
CDS màng tế bào	5.217.517	5.217.843	327	xuôi chiều
CDS protein gắn kết kẽm/cadimi	3.479.979	3.480.626	648	xuôi chiều
CDS protein chất mang axyl	4.563.344	4.563.580	237	ngược chiều
CDS ompX	4.251.002	4.251.514	513	xuôi chiều
CDS protein gắn kết ADN HU-beta	375.156	375.428	273	xuôi chiều
sspA CDS	629.998	630.636	639	ngược chiều
tatE CDS	3.199.435	3.199.638	204	ngược chiều
CDS gem kim hãm LexA	1.850.457	1.851.065	609	xuôi chiều
CDS hisS	<3999979	4.001.223	>1245	xuôi chiều

Bảng 3B

Tên	Độ tin cậy tuyệt đối mức biểu hiện vi sai	Tỷ lệ biểu hiện vi sai	Số lượng kết quả đọc ARNSeq_nifL-Raw	Số lượng bản phiên mã ARNSeq_nifL-Raw	Số lượng kết quả đọc ARNSeq_WT-Raw	Số lượng bản phiên mã ARNSeq_WT - Raw
CDS lipoprotein murein	1000	-1,8	12950,5	10078,9	5151,5	4106,8
CDS protein màng	1000	-1,3	9522,5	5371,3	5400	3120
CDS protein gắn kết kẽm/cadimi	3,3	1,1	6461	1839,1	5318	1550,6
CDS protein chất mang axyl	25,6	1,6	1230,5	957,6	1473,5	1174,7
CDS ompX	1,7	1,1	2042	734,2	1687,5	621,5
CDS protein gắn kết ADN HU-beta	6,9	-1,3	1305	881,7	725	501,8
CDS sspA	0,2	1	654	188,8	504,5	149,2

CDS tatE	1,4	1,3	131	118,4	125	115,8
CDS gem kìm hãm LexA	0,1	-1,1	248	75,1	164	50,9
CDS hisS	0	-1,1	467	69,2	325	49,3

Bảng 3C

Tên	Đoạn mồi (theo hướng thuận, vùng từ -250 đến +10)	Trình tự được biểu hiện	Trình tự bên cạnh
CDS lipoprotein murein	GCCTCTCGGGGCGCTT TTTTTTATTCCGGCAC TAGCCGCTATTAATAA AAATGCAAATCGGAA TTTACTATTTAACGCG AGATTATCTAAGATGA ATCCGATGGAAGCGC GCTGTTTTCACTCGCC TTTTTAAAGTTACGTG ATGATTTTCGATGCTTC TTTGAGCGAACGATCA AAAATAAGCGTATTCA GGTAAAAAAATATTCT CATCACAAAAAGTTT GTGTAATACTTGTAAC GCT--- ACATGGAGATTAACCTC	ATGAATCGTACTAAAC TGGTACTGGGCGCGGT AATCCTGGGTTCTACTC TGCTGGCTGGTTGCTCC AGCAATGCTAAAATCG ATCAGCTGTCTTCTGAC GTTTCAGACTCTGAACG CTAAAGTTGACCAGCT GAGCAACGACGTGAAC GCAATGCGTTCCGACG TTCAGGCTGCTAAAGA TGACGCAGCTCGCGCT AACCAGCGTCTGGACA ACGCAGCTACTAAATA CCGTAAGTAA	ATGAAAAAGACCAAAATTG TTTGACCATCGGTCCGAAA ACCGAATCCGAAGAGATGT TGACCAAAATGCTGGACGC GGGCATGAACGTTATGCGTC TGAACCTCTCTCACGGTGAC TATGCGGAACACGGTCAGC GCATCCAGAATCTGCGCAAT GTGATGAGTAAAACCGGTA AGAAAGCGGCAATCCTGCT GGACACCAAAGGTCCGGAA ATCCGTACCATTAAGCTGGA AGGCGGCAACGACGTCTCC CTGAAAGCGGGCCAGACCT TCACCTTACCACCGATAAA TCCGTTGTCCGTAATAACGA AATCGTTGCGGTGACCTATG AAGGCTTCACCAGCGACCTG AGCGTTGGCAACACGCTACT GGTTGACGATGGTCTGATCG GTATGGAAGTGACCGCTATC GAAGGCAACAAAGTTGTTT GTAAAGTGCTGAACAACGG CGACCTCGGCGAGAACAAA GGCGTTAACCTGCCGGGCGT ATCTATCGCGCTGCCGGCGC TGGCTGAAAAAGACAAACA GGATCTGATCTTCGGTTGCG AACAGGGCGTTGACTTTGTT GCGGCATCCTTTATCCGTAA GCGTTCTGACGTTGTTGAAA TCCGTGAGCACCTGAAAGCC CACGGCGGCGAGAAGATCC AGATCATCTCCAAAATCGAA AACCAGGAAGGCCTGAACA ACTTCGACGAAATCCTCGAA GCCTCTGACGGCATCATGGT AGCCCGTGCGACCTGGGC GTTGAAATCCCGGTTGAAGA AGTTATCTTCGCGCAGAAGA TGATGATCGAGAAATGTATC CGCGCGGTAAAGTCGTTAT CACCGCGACCCAGATGCTG GATTCCATGATCAAAAACCC GCGTCCGACCCGTGCGGAA GCAGGCGACGTGGCCAACG CCATCCTCGACGGCACCGAC GCAGTTATGCTGTCCGGCGA ATCCGCGAAAGGTAAATAC CCGCTGGAAGCGGTCACCAT CATGGCGACCATCTGCGAAC

Tên	Đoạn mồi (theo hướng thuận, vùng từ -250 đến +10)	Trình tự được biểu hiện	Trình tự bên cạnh
			GTACCGACCGCGTCATGACC AGCCGTCTTGAGTACAACAA CGACAACCGTAAGCTGCGC ATCACCGAAGCGGTGTGCC GCGGTGCGGTAGAAACGGC TGAAAAACTGGAAGCGCCG CTGATCGTTGTGGCAACCCA GGGCGGTAAATCCGCGCGC GCCGTACGTAAATACTTCCC GGATGCCACTATCCTGGCGC TGACCACCAACGAAACCAC CGCGCGTCAGCTGGTGCTGA GCAAAGGCGTTGTGGCACA GCTGGTTGAAGATATCTCCT CTACCGATGCGTTCTACATC CAGGGTAAAGAACTGGCGC TGCAGAGCGGTCTGGCGCGT AAAGGCGACGTGGTTGTTAT GGTTTCCGGCGCGTTAGTCC CGAGCGGAACCAACATAC CGCTTCCGTGCAGTGTGT AA
CDS protein màng	GGTTCACATAAACATA ATTATCGCCACGGCGA TAGCCGTACGCTTTTT GCGTCACAACATCCAT GGTGAAGCCGGCTTTT TCAAGAACACGCGCC ACCTCATCGGGTCTTA AATACATACTCATTCC TCATTATCTTTTACCG CACGTTAACCTTACCT TATTCATTAAAGGCAA CGCTTTCGGAATATTC CATAAAGGGCTATTTA CAGCATAATTCAAAAT CTTGTCCTACACTTAT AGACTCAATGGAATTA AGGGA	ATGGCCAACCGAGCAA ACCGCAACAACGTAGA AGAGAGCGCTGAAGAT ATCCATAACGATGTCA GCCAATTAGCGGATAC GCTGGAAGAGGTGCTG AAATCGTGGGGCAGCG ACGCCAAAGACGAAGC GGAGGCCGCGCGCAAA AAAGCGCAGGCGCTGC TGAAAGAGACCCGCGC CCGGCTTAACGGAAC AACC GCGTCCAGCAGG CGGCGTGCGACGCCAT GGGCTGCGCTGACAGC TACGTGCGCGACAAAC CGTGGCAAAGCGTCGG CGCCGCAGCAGCCGTT GGGGTATTTATTGGCGT ATTACTGAATTTACGTC GATAA	ATGTATTTAAGACCCGATGA GGTGGCGCGTGTCTTGA AAGCCGGCTTCACCATGGAT GTTGTGACGCAAAAAGCGT ACGGCTATCGCCGTGGCGAT AATTATGTTTATGTGAACCG TGAAGCTCGTATGGGGCGTA CCGCGTTAATTATTCATCCG GCTTTAAAAGAGCGCAGCA CAACGCTTGCGGAGCCCGC GTCGGATATCAAAACCTGCG ATCATTATGAGCAGTTCCCG CTCTATTTAGCGGGGGATGC TCAACAGCATTATGGTATTC CACACGGGTTTCAAGTTCGCGA ATGGCGCTTGAGCGTTTCT GAGTGGCCTGTTTGGCGAAA CGCAGTATAGCTGA
CDS protein gắn kết kẽm/cadimi	GCGCGGAAAATCGAC GCATAGCGCATTCTCA GAAGCCGGCCTGGTCT CGGTGGAAAAGCGAA TCTTTCCACGACCGC CGGGCCTTTAACAAAA GAATCAATGACCTGAT TAATGTCGCTATCCAT TCTCTCTCCGCGTAAT GCGATCTTTTTTCATC ATACCTAACAACTGG CAGAGGGAAAAGCCG CGCGGTTTTTCTGCGA AGTGTATTGTAAGATT TGTTTGATATGTTATA	ATGACCAAAAAGATTT CCGCCCTAGCGTTTGGC ATTGGCATGGTAATGG CGAGCAGCCAGGCTTT TGCCACGGTCACCAT AGTCATGGCCCGGCGC TGACCGAAGCGGAACA AAAGGCGAGTGAAGGC ATTTTTGCTGACCAGGA CGTAAAGGACAGGGCG CTGAGCGACTGGGAGG GGATCTGGCAGTCGGT TAACCCCTATCTGCTGA ACGGGGATTTAGATCC GGTCTGGAGCAGAAG	ATGGATAGCGACATTAATCA GGTCATTGATTCTTTTGTTA AAGGCCCGGCGGTGCGTGGG AAAGATTCGCTTTTCCACCG AGACCAGGCCGGCTTCTGA GAATGCGCTATGCGTCGATT TTCCGCGCCTCGAAATCATG CTTGCGGGTCAGCTTCACGA TCCGGCGATTAAAGCCGATC GCGCCCAGCTCATGCCGCAC GATGTGCTGTATATTCCCGC TGGCGGATGGAATGACCCG CAATGGCTGGCGCCCTCCAC TCTGCTCACTATCTTATTTG GTAAACAGCAGCTGGAATT

Tên	Đoạn mồi (theo hướng thuận, vùng từ -250 đến +10)	Trình tự được biểu hiện	Trình tự bên cạnh
	TCGTAACATATTATTG CAAACAT	GCCAAAAAGGCCGGTA AAAGCGTGGCGGAATA TCGGGAATATTATAAG AAGGGCTACGCTACCG ATGTCGACCAGATTGG TATCGAGGATAACGTC ATGGAGTTTCACGTCG GGAAAACCGTCAACGC CTGTAAGTACAGCTATT CCGGTTACAAAATTCTG ACCTACGCATCCGGTA AAAAAGGCGTGCGCTA CCTGTTTGAATGCCAGC AGGCGGATTCAAAAGC GCCGAAGTTTGTTCAGT TTAGCGATCACACCATC GCGCCACGCAAGTCCC AGCATTTCCACATCTTT ATGGGCAATGAGTCCC AGGAAGCGCTGCTGAA AGAGATGGATAACTGG CCAACCTACTATCCTTA TGCGCTGCATAAAGAG CAGATTGTGCGACGAAA TGCTGCACCACTAA	CGTCCTGCGCCACTGGGACG GCAGCGCGCTTAACGTGCTG GATAAACAGCAGGTTCCGC GCCGCGGTCCCCGGGTCGGC TCTTTTCTGCTGCAGGCGCT GAATGAAATGCAGATGCAG CCGCGGGAGCAGCACACGG CCCGCTTTATTGTACCAGC CTGCTCAGCCACTGTGCCGA TCTGCTGGGCAGCCAGGTAC AAACCTCATCGCGCAGCCA GGCGCTTTTTGAAGCGATTC GTAAGCATATTGACGCCAC TTTGCCGACCCGTTAACCCG GGAGTCGGTGCGCAGGCG TTTTACCTCTCGCCAACTA TCTATCCCACCTGTTCCAGA AATGCGGGCCAATGGGCTTT AACGAGTATCTGAATCACAT CCGCCTGGAGCAGGCCAGA ATGCTGTTAAAAGGCCACG ATATGAAAGTGAAAGATAT CGCCCACGCCTGCGGTTTCG CCGACAGCAACTACTTCTGC CGCCTGTTTCGAAAAACAC CGAACGCTCGCCGTCGGAGT ATCGCCGTCAATATCACAGC CAGCTGACGGAAAAAACAG CCCCGGCAAAAACTAG
CDS protein chất mang axyl	CTGACGAAGCGAGTT ACATCACCGGTGAAA CTCTGCACGTCAACGG CGGAATGTATATGGTC TGACCGAGATTTGCGC AAAACGCTCAGGAAC CGCGCAGTCTGTGCGG TTCAGTGAATGTTTT GTACAAAATGATTTGC GTTATGAGGGCAAAC AGCCGCAAAATAGCG TAAAATCGTGGTAAG ACCTGCCGGGATTTAG TTGCAAATTTTTCAAC ATTTTATACACTACGA AAACCATCGCGAAAG CGAGTTTTGA	ATGAGCACTATCGAAG AACGCGTTAAGAAAAT TATCGGCGAACAGCTG GGCGTTAAGCAGGAAG AAGTTACCAACAATGC TTCCTTCGTTGAAGACC TGGGCGCTGATTCTCTT GACACCGTTGAGCTGG TAATGGCTCTGGAAGA AGAGTTTGATACTGAG ATTCCGGACGAAGAAG CTGAGAAAATCACTAC TGTTTCAAGGCTGCCATTG ATTACATCAACGGCCA CCAGGCGTAA	ATGAGTTTTGAAGGAAAAA TCGCGCTGGTTACCGGTGCA AGTCGCGGGATTGGCCGCG CAATCGCTGAAACGCTCGTT GCCCGTGCGCGAAAGTTAT CGGGACTGCGACCAGCGAA AGCGGCGCGCAGGCGATCA GCGATTATTTAGGTGCTAAC GGTAAAGGTCTGCTGCTGAA TGTGACCGATCCTGCATCTA TTGAATCTGTTCTGGGAAAT ATTGCGCGAGAATTTGGTGA AGTTGATATCCTGGTGAACA ATGCCGGGATCACTCGTGAT AACCTGTTAATGCGCATGAA AGATGATGAGTGGAACGAT ATTATCGAAACCAACCTGTC ATCTGTTTTCCGTCTGTCAA AAGCGGTAATGCGCGCTAT GATGAAAAAGCGTCATGGA CGTATTATCACTATCGGTTT TGTGGTTGGTACCATGGGAA ATGCGGGTCAGGCCAACTA CGCTGCGGCGAAAGCGGGT CTGATTGGCTTCAGTAAATC ACTGGCTCGCGAAGTTGCGT CCCGCGGTATTACTGTAAAC GTTGTTGCTCCGGGCTTTAT

Tên	Đoạn mồi (theo hướng thuận, vùng từ -250 đến +10)	Trình tự được biểu hiện	Trình tự bên cạnh
			TGAAACGGACATGACGCGT GCGCTGACCGATGAGCAGC GTGCGGGTACGCTGGCGGC AGTTCCTGCGGGGCGCCTCG GCTCTCCAAATGAAATCGCC AGTGCGGTGGCATTTTTAGC CTCTGACGAAGCGAGTTACA TCACCGGTGAAACTCTGCAC GTCAACGGCGGAATGTATAT GGTCTGA
CDS ompX	ACGCCTGGGGCGCCG ACCAGCGGGAAGAGT GATTTGGCCAACGAG GCGCCGCTCTGAATGG AAATCATGGCGATTAA AATAACCAGTATCGGC AACCATGCCGGTACCT TACGAGACGAGCCGG GCATCCTTTCTCCTGT CAATTTTGTCAAATGC GGTAAAGGTTCCAGTG TAATTGAATTACCCCG CGCCGGTTGAGCTAAT GTTGAAAAAAGGGT CTTAAAAGCAGTACA ATAGGGCGGGTCTGA AGATAATTTCA	ATGAATAAAATTGCAC GTTTTTCAGCACTGGCC GTTGTTCTGGCTGCATC CGTAGGTACCACTGCTT TCGCTGCGACTTCTACC GTTACCGGTGGCTACG CGCAGAGCGACATGCA GGGTGAAGCGAACAAA GCTGGCGGTTTCAACCT GAAGTACCGCTACGAG CAAGACAACAACCCGC TGGGTGTTATCGGTTCT TTCACCTACACCGAAA AAGATCGTTCTGAATCT GGCGTTTACAAAAAAG GCCAGTACTACGGCAT CACCGCAGGTCCGGCT TACCGTCTGAACGACT GGGCTAGCATCTACGG CGTAGTGGGTGTTGGTT ACGGTAAATTCCAGGA CAACAGCTACCCGAAC AAATCTGATATGAGCG ACTACGTTTCTCTTAC GGCGCTGGTCTGCAGTT CAACCCGATCGAAAAAC GTTGCCCTGGACTTCTC CTACGAGCAGTCTCGC ATTCGTAACGTTGACGT TGGCACCTGGATTGCTG GCGTAGGTTACCGCTTC TAA	ATGCCCCGGCTCGTCTCGTAA GGTACCGGCATGGTTGCCGA TACTGGTTATTTTAATCGCC ATGATTTCCAT
CDS protein gắn kết ADN HU-beta	TCTGATTCTGATGAA AATAAACGCGACCTTG AAGAAATTCCGGATA ACGTTATCGCCGATTT AGATATCCATCCGGTG AAACGAATCGAGGAA GTTCTGGCACTTGCGC TACAGAACGAACCGTT TGGAATGGAAGTCGTC ACGGCAAAATAGTGA TTTCGCGCAAATAGCG CTAAGAAAAATAGGG CTGGTAAGTAAATTCG TACTTGCCAGCCTTTT TTTGTGTAGCTAACTT	GTGAATAAAATCTCAAC TGATTGACAAAATTGCT GCCGGTGCGGACATTT CTAAAGCCGCAGCTGG ACGTGCGTTAGATGCTT TAATCGCTTCTGTTACT GAATCTCTGCAGGCTG GAGATGACGTTGCGCT GGTAGGGTTTGGTACTT TTGCTGTAAAGAGCG CGCTGCCCGTACTGGTC GCAATCCGCAAAACAGG CAAAGAAATCACCATT GCTGCTGCTAAAGTTCC GGGTTTCCGCGCAGGT	ATGAATCCTGAGCGTTCTGA ACGCATTGAAATCCCCGTAT TGCCGTTGCGCGATGTGGTG GTTTATCCGCACATGGTCAT ACCCCTGTTTGTAGGGCGGG AAAAATCTATCCGTTGTCTC GAAGCAGCCATGGACCATG ATAAAAAAATCATGCTGGTT GCGCAGAAAGAAGCCTCGA CGGATGAGCCGGGTGTAAG CGATCTTTTACCCTCGGGA CCGTGGCGTCTATTTTGAA ATGCTGAAGCTACCGGACG GTACTGTTAAAGTGCTGGTC GAAGGTTTGCAGCGCGCGC GCATCTCTGCGCTGTCTGAT

Tên	Đoạn mồi (theo hướng thuận, vùng từ -250 đến +10)	Trình tự được biểu hiện	Trình tự bên cạnh
	AGATCGCTGGCAGGG GGGTCAATT	AAAGCGCTGAAAGACG CGGTAAACTGA	AATGGCGAACATTTTTCGGC GAAGGCGGAATACCTTGAA TCGCCGGCGATTGACGAAC GCGAGCAGGAAGTGCTGGT TCGTACCGCTATCAGCCAGT TTGAAGGCTACATCAAGCTG AACAAAAAATCCCTCCGG AAGTGCTGACGTCGCTGAAT AGCATCGACGATCCGGCGC GTCTGGCGGATACCATCGCT GCGCATATGCCGCTGAAGCT GGCGGACAAACAGTCCGTG CTGGAGATGTCCGACGTAA CGAGCGTCTGGAATATCTGA TGGCGATGATGGAGTCGGA AATCGATCTGCTGCAGGTGG AGAAGCGTATTCGCAACCG CGTGAAAAAGCAGATGGAG AAATCTCAGCGCGAGTACTA TCTGAATGAGCAAATGAAA GCCATTCAAAAAGAGCTCG GCGAGATGGACGACGCCCC GGACGAGAACGAAGCGCTG AAGCGTAAGATCGACGCGG CGAAAAATGCCGAAAGAGGC AAAAGAGAAAACCGAAGCG GAACTGCAAAAACTGAAAA TGATGTCCCCGATGTCGGCG GAAGCGACCGTCGTTTCGCG GCTACATCGACTGGATGGTG CAGGTACCGTGGAACGCTC GCAGCAAGGTTAAAAAAGA CCTGCGTCAGGCTCAGGAG ATCCTCGATACCGATCACTA CGGCCTTGAGCGCGTGAAG GATCGCATTCTTGAGTACCT CGCGGTGCAGAGCCGTGTTA ACAAGCTCAAAGGGCCGAT CCTGTGCCTGGTTGGGCCTC CGGGGGTAGGTAAAACCTC TCTCGGCCAATCCATCGCCA AAGCAACTGGACGCAAATA TGTGCGTATGGCGCTGGGCG GCGTGCGTGATGAAGCGGA AATCCGCGGTCACCGCCGTA CCTATATTGGCTCAATGCCG GGCAAACCTGATCCAGAAAA TGGCTAAAGTGGGCGTTAA AAACCCGCTGTTCTTGCTGG ATGAGATCGACAAGATGTCT TCTGACATGCGCGGCGATCC GGCCTCGGCGCTGCTGGAG GTGTTGGATCCGGAACAGA ACGTGGCCTTTAACGACCAC TATCTGGAAGTGGATTACGA TCTCAGCGACGTGATGTTCTG TTGCGACCTCTAACTCCATG AACATCCCGGCGCCGCTGCT

Tên	Đoạn môi (theo hướng thuận, vùng từ -250 đến +10)	Trình tự được biểu hiện	Trình tự bên cạnh
			GGATCGTATGGAAGTGATCC GCCTCTCCGGCTATAACCGAA GATGAGAAGCTAAACATCG CCAAACGCCATCTGCTGTCA AAACAGATTGAGCGTAACG CGCTCAAGAAAGGCGAGCT GACGGTGGATGACAGCGCG ATTATCGGCATCATTCGCTA CTACACCCGTGAAGCAGGC GTGCGTGGTCTGGAGCGTGA AATCTCGAAACTGTGCCGCA AAGCGGTGAAACAGCTGCT GCTGGATAAGTCGCTGAAA CACATCGAGATTAACGGCG ACAACCTGCACGATTTCTTT GGCGTGCAGCGCTACGACT ATGGTCGTGCGGATAGCGA AAACCGCGTAGGTCAGGTG ACCGGACTGGCGTGGACGG AAGTGGGCGGCGATCTGCT GACCATTGAAACCGCCTGCG TTCCGGGTAAAGGCAAACCT GACCTACACCGGTTCACTGG GTGAAGTCATGCAGGAATC CATCCAGGCGGCGCTGACG GTGGTTCGTTTACGTGCGGA TAAGCTGGGTATTAACCTCAG ACTTTTACGAAAAACGTGAT ATTCACGTTTACGTGCCGGA AGGCGCGACGCCGAAGGAT GGTCCAAGCGCCGGTATCGC GATGTGCACCGCGCTGGTTT CCTGTCTGACGGGTAATCCG GTACGCGCCGACGTGGCGA TGACCGGTGAGATTACCTC CGTGGCCAGGTATTGCCGAT TGGTGGTCTGAAGGAAAAA CTGTTGGCCGCGCATCGCGG CGGCATTAAGACTGTTCTGA TTCCTGATGAAAATAAACGC GACCTTGAAGAAATTCCGG ATAACGTTATCGCCGATTTA GATATCCATCCGGTGAAACG AATCGAGGAAGTTCTGGCA CTTGCGCTACAGAACGAACC GTTTGGAATGGAAGTCGTCA CGGCAAAATAG
CDS sspA	GTAAGAAAGTCGGCC TGCGTAAAGCACGTCTG TCGTCCTCAGTTCTCC AAACGTTAATTGTTTT CTGCTCACGCAGAACAA ATTTGCGAAAAAACCC GCTTCGGCGGGTTTTT TTATGGATAAATTTGC CATTTCCCTCTACAA ACGCCCCATTGTTACC ACTTTTTTCAGCATTTT	ATGGCTGTCGCTGCCA ACAAACGTTTCGGTAAT GACGCTGTTTTCTGGTC CTACTGACATCTATAGC CATCAGGTCCGCATCGT GCTGGCCGAAAAAGGT GTTAGTTTTGAGATAGA GCACGTGGAGAAGGAC AACCCGCTCAGGATC TGATTGACCTCAACCCG AATCAAAGCGTACCGA	ATGGCTGAAAATCAATACTA CGGCACCGGTGCGCGCAAA AGTTCCGCAGCTCGCGTTTT CATCAAACCGGGCAACGGT AAAATCGTTATCAACCAGCG TTCTCTGGAACAGTACTTCG GTCGTGAAACTGCCCGCATG GTAGTTTCGTCAGCCGCTGGA ACTGGTCGACATGGTTGAGA AATTAGATCTGTACATCACC GTAAAGGTGGTGGTATCTC

Tên	Đoạn môi (theo hướng thuận, vùng từ -250 đến +10)	Trình tự được biểu hiện	Trình tự bên cạnh
	CAGAATCCCCTCACCA CAACGTCTTCAAAATC TGGTAAACTATCATCC AATTTTCTGCCCAAAT GCAGGTGATTGTTTCAT TTTT	CGCTTGTGGATCGTGA GCTCACTCTGTGGGAAT CTCGCATCATTATGGAA TATCTGGATGAGCGTTT CCCGCATCCGCCGCTCA TGCCGGTTTACCCGGTG GCGCGTGGGGAAAGCC GTCTGTATATGCAGCGT ATCGAAAAGGACTGGT ATTCGTTGATGAATACC ATTCAGACCGGTACCG CTGCGCAGGCTGATAC TGCGCGTAAGCAGCTG CGTGAAGAACTACAGG CGATTGCGCCAGTTTTC ACCCAGAAGCCCTACT TCCTGAGCGATGAGTTC AGCCTGGTGGACTGCT ACCTGGCACCCTGCT GTGGCGTCTGCCGGTTC TCGGCGTAGAGCTGGT CGGCGCTGGCGCGAAA GAGCTTAAAGGCTATA TGACTCGCGTATTTGAG CGCGACTCTTTCCTCGC TTCTTTAACTGAAGCCG AACGTGAAATGCGTCT CGGTCGGGGCTAA	TGGTCAGGCTGGTGCGATCC GTCACGGTATCACCCGCGCT CTGATGGAGTACGACGAGT CCCTGCGTGGCGAACTGCGT AAAGCTGGTTTCGTTACTCG TGATGCTCGTCAGGTTGAAC GTAAGAAAGTCGGCCTGCG TAAAGCACGTCGTCGTCCTC AGTTCTCCAAACGTAA
CDS tatE	GTCAAAGCCGTATTAT CGACCCCTTAGGGACA ACGCTTGCCGGGGCG GGAGAGCGGCCGAG TTGATTTTGGCCGAAC TTTCAGCTGATTATAT TCAGCAGGTACGCGA GCGCCTGCCGGTGTG CGCAATCGCCGCTTTG CGCCACCGCAATTATT ATGACGTTTTTTTAAA CAAGGCTTGATTACCC TTGTTACAGATTGCTA TTGTGTCCGCGCGTCA AATAGCCGTTAATTGT ATGCGTGTATGATGGC GTATTTCG	ATGGGTGAGATTAGTA TTACCAAACCTGCTGGTA GTCGCAGCGCTGATTAT CCTGGTGTGTTGGTACCA AAAAGTTACGCACGCT GGGTGGAGACCTGGGC TCGGCTATCAAAGGCTT TAAAAAAGCCATGAGC GATGACGATGACAGTG CGAAGAAGACCAGTGC TGAAGAAGCGCCGGCA CAGAAGCTCTCTCATA AAGAGTAA	ATGTTTGTGCTGCCGGACA ATTTGCCGTAACGCCGGACT GGACGGGAAACGCGCAGAC CTGCGTCAGCATGATGCGCC AGGCCGCGGAGCGGGGGC GTCGCTTCTGGTTCTGCCTG AGGCGTTGCTGGCGCGAGA CGATAACGATGCGGATTTAT CGGTTAAATCCGCCCAGCAG CTGGATGGCGGCTTCTTACA GCTCTTGCTGGCGGAGAGCG AAAACAGCGCTTTGACGAC GGTGCTGACCCTGCATATCC CTTCCGGCGAAGGTCGAGC GACGAATACGCTGGTGGCC CTGCGTCAGGGGAAGATTGT GGCGCAATATCAGAACTG CATCTCTATGATGCGTTCAA TATCCAGGAATCCAGGCTGG TCGATGCCGGGCGGCAAATT CCGCCGCTGATCGAAGTCGA CGGGATGCGCGTCGGGCTG ATGACCTGCTACGATTTACG TTTCCCTGAGCTGGCGCTGT CGTTAGCGCTCAGCGGCGCG CAGCTCATAGTGTTCCTGC CGCGTGGGTAAAAGGGCCG CTGAAGGAACATCACTGGG CGACGCTGCTGGCGGCGCG GGCGCTGGATACAACCTGCT

Tên	Đoạn mồi (theo hướng thuận, vùng từ -250 đến +10)	Trình tự được biểu hiện	Trình tự bên cạnh
			ATATTGTCGCCGAGGAGA GTGCGGGACGCGTAATATC GGTCAAAGCCGTATTATCGA CCCCTTAGGGACAACGCTTG CCGGGGCGGGAGAGCGGCC GCAGTTGATTTTTGCCGAAC TTTCAGCTGATTATATTAG CAGGTACGCGAGCGCCTGC CGGTGTTGCGCAATCGCCGC TTTGCGCCACCACAATTATT ATGA
CDS gen kìm hãm LexA	GAGGCGGTGGTTGAC CGTATCGGTCCCGAGC ATCATGAGCTTTTCGGG GCGAGCGAAAGATAT GGGATCGGCGGCGGT ACTGCTGGCGATTATC ATCGCGCTGATCGCGT GGGGAACGCTGCTGT GGGCGAACTACCGCT AAGTCTTGTCGTAGCT GCTCGCAAAACGGAA AGAACTCCTGATTTT TGTGTGAAATGTGGTT CCAAATCACCCTTAG CTGTATATACTCACAG CATAACTGTATATACA CCCAGGGGGC	ATGAAAGCGTTAACGA CCAGGCAGCAAGAGGT GTTTGATCTCATTCGGG ATCATATCAGCCAGAC GGGCATGCCGCCGACG CGTGCGGAGATTGCTC AGCGCTTGGGGTTTCGC TCCCCAAACGCGGCGG AAGAGCATCTGAAAGC GCTGGCGCGTAAAGGC GCAATCGAGATCGTTTC CGGCGCCTCCCGCGGT ATTCGTCTGCTGACGGA AGAAGAAACCGGTCTG CCGCTTATTGGCCGCGT CGCGGCAGGTGAGCCG CTGCTAGCGCAGCAGC ACATTGAAGGCCACTA CCAGGTGGACCCGGCC ATGTTTAAGCCGAACG CCGATTTTCTGCTGCGT GTTAGCGGTATGTCGAT GAAGGATATCGGTATT CTCGATGGCGACCTGCT GGCTGTCCATAAAACG CAGGATGTGCGCAATG GTCAGGTGGTTGTGGC GCGTATCGACGAAGAA GTGACCGTGAAGCGTC TGAAAAAACAGGGTAA CGTCGTGGAATTGCTGC CGGAAAACAGCGAATT CTCGCCGATCGTGCTCG ACCTTCGCGAACAAG CTTTACTATTGAAGGCC TGGCCGTCGGCGTTATC CGCAACGGCAACTGGC AATAA	ATGGCCAATAATACCACTGG GTTAACCCGAATTATTAAAG CGGCCGGGTATTCTTGAAA GGATTCCGTGCGGCGTGGGT CAATGAGGCCGCAATTCGTC AGGAAGGCATCGCGGCCGT TATTGCCGTGGCGATCGCCT GCTGGTTGGACGTCGATGCC ATCACGCGGGTGCTGCTCAT TAGCTCGGTCTGTAGTGA TGATAGTTGAAATTATCAAT AGCGCGATTGAGGCGGTGG TTGACCGTATCGGTCCCGAG CATCATGAGCTTTCGGGGCG AGCGAAAGATATGGGATCG GCGGCGGTACTGCTGGCGAT TATCATCGCGCTGATCGCGT GGGGAACGCTGCTGTGGGC GAACTACCGCTAA
CDS hisS	TAAGAAAAGCGGCCT GTACGAAGACGGCGT ACGTAAAGACAGGCT GGATAACGACGATAT GATCGATCAGCTGGA AGCGCGTATTTCGCGCT AAAGCATCGATGCTG GATGAGGCGCGTCGT ATCGATATCCAGCAGG	...ATGAACGATTATCTG CCGGGCGAAACCGCTC TCTGGCAGCGCATTGA AGGCTCACTGAAGCAG GTGCTTGGTAGCTACG GTTACAGCGAAATCCG TTTGCCGATTGTAGAGC AGACCCCGTTATTCAA ACGCGCTATCGGCGAA	ATGCATAACCAGGCTCCGAT TCAACGTAGAAAATCAAAA CGAATTTACGTTGGGAATGT GCCGATTGGCGATGGCGCCC CCATCGCCGTACAGTCGATG ACAAACACGCGCACCACCG ATGTGGCGGCGACGGTAAA TCAAATTAAGCCCTCGAGC GCGTTGGCGCGGATATCGTG

Tên	Đoạn mỗi (theo hướng thuận, vùng từ -250 đến +10)	Trình tự được biểu hiện	Trình tự bên cạnh
	TTGAAGCGAAATAAC GTGTTGGGAAGCGAT ACGCTTCCCGTGTATG ATTGAACCTGCGGGCG CGAGGCGCCGGGGTT CATTTTTGTATATATA AAGAGAATAAACGTG GCAAAGAACATTCAA	GTGACCGACGTGGTTG AAAAAGAGATGTACAC CTTTGAGGACCGTAAC GGCGATAGCCTGACTC TACGTCCGGAAGGCAC GGCTGGCTGCGTACGC GCCGGTATCGAACATG GTCTCCTGTACAATCAA GAACAGCGCCTGTGGT ACATTGGGCCGATGTTT CGCCACGAACGTCCGC AAAAAGGCCGCTACCG TCAGTTCCACCAGATTG GCGCCGAAGCGTTTGG CCTGCAGGGGCCGGAT ATCGATGCCGAGCTGA TTATGCTGACCGCCCGC TGGTGGCGCGAGCTGG GCATCTCCGGCCACGTT GCGCTGGAGCTGAACT CTATCGGTTTCGCTGGAG GCTCGCGCTAACTATCG CGACGCGCTGGTGGCC TATCTTGAGCAGTTTAA AGATAAGCTGGACGAA GACTGCAAACGCCGCA TGACACCAACCCGCT GCGCGTGCTGGATTCTA AAAACCCGGACGTCCA GGCGCTGCTGAACGAC GCCCCGACGCTGGGCG ACTATCTTGATGAAGA GTCCAAAACGCATTTTG CCGGGCTGTGCGCGCT GCTGGATGATGCCGGT ATTCGCTATACCGTGAA TCAGCGTCTGGTACGC GGTCTCGACTACTACA ACCGCACCGTGTTTGA GTGGGTCAACCACGAC CTCGGTTCCCAGGGCA CCGTCTGCGCCGGAGG CCGTTACGATGGTCTGG TTGAGCAGCTTGGCGG TCGCGCTACCCCTGGCG TCGGCTTTGCGATGGG GCTGGAACGTCTTGT TACTGGTTCAGGCAGT GAATCCGGAATTTAAA GCCGATCCTGTTGTCGA TATATACCTGGTAGCCT CCGGAACCTGACACCCA GTCCGCAGCAATGCGT CTGGCTGAACAGGTAC GCGATGCGTTACCCGG CGTTAAGCTGATGACC AACCATGGCGGCGGCA ACTTTAAGAAGCAGTTT	CGCGTTTCGGTGCCGACGAT GGATGCGGCGGAAGCGTTC AAACTTATCAAACAGCAGG TTAACGTCCCGCTGGTTGCC GATATCCACTTCGATTACCG CATTGCGCTGAAGGTAGCG GAATACGGCGTTGATTGCCT GCGTATTAACCCGGGCAATA TCGGCAACGAAGAGCGTAT CCGCATGGTGGTGGACTGCG CTCGCGATAAAAAATATTCCT ATCCGTATCGGGGTAAACGC CGGTTCTCTGGA AAAAAGATC TCCAGGAAAAATACGGCGA ACCGACTCCGCAGGCGCTGC TGGAATCGGCAATGCGCCAT GTTGATCATCTCGATCGTCT CAACTTCGATCAGTTTAAAG TCAGCGTAAAAGCCTCCGAT GTGTTCTCTCGGTTGGAATC CTATCGCCTGTTGGCGAAAC AGATCGATCAGCCTCTGCAC CTCGGGATCACCGAAGCGG GCGGCGCGCGCAGCGGCGC GGTGAAGTCCGCGATCGGC CTCGGCCTGCTGCTGTCTGA AGGGATTGGCGATACGCTG CGCGTCTCTTGCGGCGGGA TCCCGTTGAAGAGATCAAA GTGGGCTTCGATATTCTCAA GTCGCTGCGTATTGCTCTC GCGGGATCAACTTTATTGCC TGCCCGACCTGTTACGTC GGAGTTTGACGTTATCGGTA CCGTTAACGCGCTGGAGCA GCGCCTGGAAGATATCATTA CGCCGATGGATATTTTCGATC ATTGGCTGCGTGGTAAACGG TCCCGGCGAGGCGCTGGTTT CCACCCTCGGCGTAACCGGC GGCAATAAGAAAAGCGGCC TGACGAAGACGGCGTACG TAAAGACAGGCTGGATAAC GACGATATGATCGATCAGCT GGAAGCGCGTATTGCGGCTA AAGCATCGATGCTGGATGA GGCGCGTCGTATCGATATCC AGCAGGTTGAAGCGAAATA A

Tên	Đoạn môi (theo hướng thuận, vùng từ -250 đến +10)	Trình tự được biểu hiện	Trình tự bên cạnh
		GCGCGCGCTGATAAAT GGGGCGCTCGCGTTGC GCTGGTGCTGGGCGAA TCAGAAATCGCCGACG GAAACGTGGTAGTGAA AGATTTACGCTCAGGT GAGCAAACACTACCGTAA CGCAGGATAGCGTTGC TGCGCATTTGCGCACAC TTCTGGGTAA	

Bảng các chủng

TT	Tham chiếu đầu tiên	Tên hiện hành	Tên thông dụng	Dòng	Mô tả ADN gây đột biến	Kiểu gen	Đột biến gen 1
1	Văn bản đơn	CI006	CI006	Chủng phân lập từ giống <i>Enterobacter</i>	Không có	Kiểu hoang (WT)	
2	Văn bản đơn	CI008	CI008	Chủng phân lập từ giống <i>Burkholderia</i>	Không có	WT	
3	Văn bản đơn	CI010	CI010	Chủng phân lập từ giống <i>Klebsiella</i>	Không có	WT	
4	Văn bản đơn	CI019	CI019	Chủng phân lập từ giống <i>Rahnella</i>	Không có	WT	
5	Văn bản đơn	CI028	CI028	Chủng phân lập từ giống <i>Enterobacter</i>	Không có	WT	
6	Văn bản đơn	CI050	CI050	Chủng phân lập từ giống <i>Klebsiella</i>	Không có	WT	
7	Văn bản đơn	CM002	CM002	Thế đột biến của CI050	Phá vỡ gen nifL bằng cat-xet biểu hiện kháng kanamy xin (KanR) mã hóa gen aminoglycosit O-phosphotransferaza aphI được	$\Delta nifL::KanR$	ATGAGCCATATTCAACGGGAAA CGTCTTGCTCCAGGCCGCGATTA AATTCCAACATGGATGCTGATTT ATATGGGTATAAATGGGCTCGCG ATAATGTCTGGCAATCAGGTGC GACAATCTATCGATTGTATGGGA AGCCCGATGCGCCAGAGTTGTTT CTGAAACATGGCAAAGGTAGCG TTGCCAATGATGTTACAGATGAG ATGGTCAGACTAAACTGGCTGAC GGAATTTATGCCTCTTCCGACCA TCAAGCATTTTATCCGTACTCCT GATGATGCATGGTTACTCACCAC TGCGATCCCCGGGAAAACAGCA TTCCAGGTATTAGAAGAATATCC TGATTGAGGTGAAAATATTGTTG ATGCGCTGGCAGTGTTCTGCGC CGGTTGCATTCTGATTCTGTTTG TAATTGTCCTTTTAAACAGCGATC GCGTATTTTCGTCTCGCTCAGGCG CAATCACGAATGAATAACGGTTT GGTTGATGCGAGTGATTTTGATG

TT	Tham chiếu đầu tiên	Tên hiện hành	Tên thông dụng	Dòng	Mô tả ADN gây đột biến	Kiểu gen	Đột biến gen 1
					cài xen vào.		ACGAGCGTAATGGCTGGCCTGTT GAACAAGTCTGGAAAGAAATGC ATAAGCTTTTGCCATTCTCACCG GATTCAGTCGTCATCATGGTGA TTTCTCACTTGATAACCTTATTTT TGACGAGGGGAAATTAATAGGT TGTATTGATGTTGGACGAGTCGG AATCGCAGACCGATAACCAGGAT CTTGCCATCCTATGGAAGTGCCT CGGTGAGTTTTCTCCTTCATTAC AGAAACGGCTTTTTCAAAAATAT GGTATTGATAATCCTGATATGAA TAAATTGCAGTTTCATTTGATGC TCGATGAGTTTTTCTAATAAGCC TGCCTGGTTCTGCGTTCCCGCT CTTTAATACCCTGACCGGAGGTG AGCAATGA
8	Văn bản đơn	CM011	CM011	Thẻ đột biến của CI019	Phá vỡ gen <i>nifL</i> bằng cat-xet biểu hiện kháng spectin omyxin (SpecR) mã hóa gen streptomycin 3''-O-adenylyltransferase <i>aadA</i> được cài xen vào.	$\Delta nifL::SpecR$	ATGAGCATCACGGCGTTATCAGC ATCATTTCTGAGGGGAATATCG CCAGCCGCTTGTGCTGCAACAT CCTTCACTGTTTTATACCGTGGTT GAACAATCTTCGGTGGCGAGCGT GTTGAGTCATCCTGACTAGCTGA GATGAGGGCTCGCCCCCTCGTCC CGACACTTCCAGATCGCCATAGC GCACAGCGCCTCGAGCGGTGGT AACGGCGCAGTGGCGGTTTTTCAT GGCTTGTTATGACTGTTTTTTTGG GGTACAGTCTATGCCTCGGGCAT CCAAGCAGCAAGCGCGTTACGC CGTGGGTCGATGTTTGATGTTAT GGAGCAGCAACGATGTTACGCA GCAGGGCAGTCGCCCTAAAACA AAGTTAAACATCATGAGGGAAG CGGTGATCGCCGAAGTATCGACT CAACTATCAGAGGTAGTTGGCGT CATCGAGCGCCATCTCGAACC GA CGTTGCTGGCCGTACATTTGTAC GGCTCCGCAGTGGATGGCGGCCT GAAGCCACACAGTGATATTGATT TGCTGGTTACGGTGACCGTAAGG CTTGATGAAACAACGCGGCGAG CTTTGATCAACGACCTTTTGGA ACTTCGGCTTCCCCTGGAGAGAG CGAGATTCTCCGCGCTGTAGAAG TCACCATTGTTGTGCACGACGAC ATCATTCCGTGGCGTTATCCAGC TAAGCGGAACTGCAATTTGGA GAATGGCAGCGCAATGACATTCT TGCAGGTATCTTCGAGCCAGCCA CGATCGACATTGATCTGGCTATC TTGCTGACAAAAGCAAGAGAAC ATAGCGTTGCCTTGGTAGGTCCA GCGGCGGAGGAACTCTTTGATCC GGTTCCTGAACAGGATCTATTTG AGGCGCTAAATGAAACCTTAAC

TT	Tham chiếu đầu tiên	Tên hiện hành	Tên thông dụng	Dòng	Mô tả ADN gây đột biến	Kiểu gen	Đột biến gen 1
							GCTATGGAAC TCGCCGCCGACT GGGCTGGCGATGAGCGAAATGT AGTGCTTACGTTGTCCCGCATTT GGTACAGCGCAGTAACCGGCAA AATCGCGCCGAAGGATGTCGCT GCCGACTGGGCAATGGAGCGCC TGCCGGCCCAGTATCAGCCCGTC ATACTTGAAGCTAGACAGGCTTA TCTTGGACAAGAAGAAGATCGC TTGGCCTCGCGCGCAGATCAGTT GGAAGAATTTGTCCACTACGTGA AAGGCGAGATCACCAAGGTAGT CGGCAAATAATGTCTAACAATTC GTTCAAGCCGACGCCGCTTCGCG GCGCGGCTTAACTCAAGCGTTAG ATGCACTAAGCACATAATTGCTC ACAGCCAAACTATCAGGTCAAG TCTGCTTTTATTATTTTAAAGCGT GCATAATAAGCCCTACACAAAT GGTACCCGACCGGTGGTGAATTT AATCTCGCTGACGTGTAGACATT CCCTTATCCAGACGCTGATCGCC CATCATCGCGTTCTTTAGATCT CTCGGTCCGCCCTGATGGCGGCA CCTTGCTGACGTTACGCCTGCCG GTACAGCAGGTTATCACCGGAG GCTTAAATGA
9	Văn bản đơn	CM013	CM013	Thẻ đột biến của CI006	Phá vỡ gen nifL bằng cat-xet biểu hiện kháng kanamy xin (KanR) mã hóa gen aminoglycosit O-phosphotransferaza aphI được cài xen vào.	Δ nifL:: KanR	CTGATCCTTCAACTCAGCAAAAG TTCGATTTATTCAACAAAGCCAC GTTGTGTCTCAAAATCTCTGATG TTACATTGCACAAGATAAAAATA TATCATCATGAACAATAAACTG TCTGCTTACATAAACAGTAATAC AAGGGGTGTTATGAGCCATATTC AACGGGAAACGTCTTGCTCCAG GCCGCGATTAAATTCCAACATGG ATGCTGATTTATATGGGTATAAA TGGGCTCGCGATAATGTCGGGCA ATCAGGTGCGACAATCTATCGAT TGTATGGGAAGCCCGATGCGCC AGAGTTGTTTCTGAAACATGGCA AAGGTAGCGTTGCCAATGATGTT ACAGATGAGATGGTCAGACTAA ACTGGCTGACGGAATTTATGCCT CTTCCGACCATCAAGCATTTTAT CCGTA CTCTGATGATGCATGGT TACTACCACTGCGATCCCCGGG AAAACAGCATTCCAGGTATTAG AAGAATATCCTGATTCAGGTGAA AATATTGTTGATGCGCTGGCAGT GTTCTGCGCCGGTTGCATTCTGA TTCCTGTTTGTAATTGTCCTTTTA ACAGCGATCGCGTATTTCTGTCTC GCTCAGGCGCAATCACGAATGA ATAACGGTTTGGTTGATGCGAGT GATTTTGATGACGAGCGTAATGG

TT	Tham chiếu đầu tiên	Tên hiện hành	Tên thông dụng	Dòng	Mô tả ADN gây đột biến	Kiểu gen	Đột biến gen 1
							CTGGCCTGTTGAACAAGTCTGGA AAGAAATGCATAAGCTTTTGCCA TTCTCACCGGATTTCAGTCGTCAC TCATGGTGATTCTCACTTGATA ACCTTATTTTTGACGAGGGGAAA TTAATAGGTTGTATTGATGTTGG ACGAGTCGGAATCGCAGACCGA TACCAGGATCTTGCCATCCTATG GAACTGCCTCGGTGAGTTTTCTC CTTCATTACAGAAACGGCTTTTT CAAAAATATGGTATTGATAATCC TGATATGAATAAATTGCAGTTTC ATTTGATGCTCGATGAGTTTTTC TAATAAGCCTTGACCCTACGATT CCCGCTATTTCACTGACCG GAGGTTCAAAATGA
10	Fig.4A	CM004	CM004	Thẻ đột biến của CI010	Phá vỡ gen amtB bằng cat-xet biểu hiện kháng kanamy xin (KanR) mã hóa gen aminoglycosit O-phosphotransferaza aphI được cài xen vào.	Δ amtB:: KanR	ATGAAGATAGCAACAATGAAAA CAGGTCTGGGAGCGTTGGCTCTT CTTCCCTGATCCTTCAACTCAGC AAAAGTTCGATTTATTCAACAAA GCCACGTTGTGTCTCAAAATCTC TGATGTTACATTGCACAAGATAA AAATATATCATCATGAACAATAA AACTGTCTGCTTACATAAACAGT AATACAAGGGGTGTTATGAGCC ATATTCAACGGGAAACGTCTTGC TCCCGTCCGCGCTTAAACTCCAA CATGGACGCTGATTTATATGGGT ATAAATGGGCTCGCGATAATGTC GGGCAATCAGGTGCGACAATCT ATCGCTTGTATGGGAAGCCCGAT GCGCCAGAGTTGTTTCTGAAACA TGGCAAAGGTAGCGTTGCCAAT GATGTTACAGATGAGATGGTCCG TCTCAACTGGCTGACGGAGTTTA TGCCTCTCCCGACCATCAAGCAT TTTATCCGTACTCCTGATGATGC GTGGTTACTCACCACCGCGATTC CTGGGAAAACAGCCTTCCAGGT ATTAGAAGAATATCCTGATTGAG GTGAAAATATTGTTGATGCGCTG GCCGTGTTCTGCGCCGGTTACA TTCGATTCTGTTTGTAATTGTCC TTTTAACAGCGATCGTGATTTTC GTCTTGCTCAGGCGCAATCACGC ATGAATAACGGTTTGTTGATGC GAGTGATTTGATGACGAGCGTA ATGGCTGGCCTGTTGAACAAGTC TGGAAGAAATGCACAAGCTCT TGCCATTCTACCGGATTTCAGTC GTCACTCATGGTGATTTCTCACT TGATAACCTTATTTTTGACGAGG GGAAATTAATAGGTTGTATTGAT GTTGGACGGGTCGGAATCGCAG ACCGTTACCAGGACCTTGCCATT CTTTGGAAGTGCCTCGGTGAGTT

TT	Tham chiếu đầu tiên	Tên hiện hành	Tên thông dụng	Dòng	Mô tả ADN gây đột biến	Kiểu gen	Đột biến gen 1
							TTCTCCTTCATTACAGAAACGGC TTTTCAAAAATATGGTATTGAT AATCCTGATATGAATAAATTGCA GTTTCATTTGATGCTCGATGAGT TTTTCTAATAAGCCTGTGAAGGG CTGGACGTAAACAGCCACGGCG AAAACGCCTACAACGCCTGA
11	Fig.4A	CM005	CM005	Thẻ đột biến của CI010	Phá vỡ gen nifL bằng cat-xet biểu hiện kháng kanamycin (KanR) mã hóa gen aminoglycosit O-phosphotransferaza aphI được cài xen vào.	$\Delta nifL::$ KanR	ATGACCCTGAATATGATGCTCGA TAACGCCGTACCCGAGGCGATTG CCGGCTGATCCTTCAACTCAGCA AAAGTTCGATTTATTCAACAAAG CCACGTTGTGTCTCAAAATCTCT GATGTTACATTGCACAAGATAAA AATATATCATCATGAACAATAAA ACTGTCTGCTTACATAAACAGTA ATACAAGGGGTGTTATGAGCCAT ATTCAACGGGAAACGTCTTGCTC CCGTCCGCGCTTAAACTCCAACA TGGACGCTGATTTATATGGGTAT AAATGGGCTCGCGATAATGTCTG GGCAATCAGGTGCGACAATCTAT CGCTTGATGGGAAGCCCCGATGC GCCAGAGTTGTTTCTGAAACATG GCAAAGGTAGCGTTGCCAATGA TGTTACAGATGAGATGGTCCGTC TCAACTGGCTGACGGAGTTTATG CCTCTCCCGACCATCAAGCATTT TATCCGTACTCCTGATGATGCGT GGTTACTCACCACCGCGATTCTT GGGAAAACAGCCTTCCAGGTATT AGAAGAATATCCTGATTCAGGTG AAAATATTGTTGATGCGCTGGCC GTGTTCTGCGCCGGTTACATTC GATTCCTGTTTGTAAATTGTCCTTT TAACAGCGATCGTGTATTTCTGTC TTGCTCAGGCGCAATCACGCATG AATAACGGTTTGGTTGATGCGAG TGATTTTGATGACGAGCGTAATG GCTGGCCTGTTGAACAAGTCTGG AAAGAAATGCACAAGCTCTTGC CATTCTCACCAGGATTACATCGTC ACTCATGGTGATTTCTCACTTGA TAACCTTATTTTTGACGAGGGGA AATTAATAGGTTGTATTGATGTT GGACGGGTCGGAATCGCAGACC GTTACCAGGACCTTGCCATTCTT TGGAAGTGCCTCGGTGAGTTTTTC TCCTTCATTACAGAAACGGCTTT TTCAAAAATATGGTATTGATAAT CCTGATATGAATAAATTGCAGTT TCATTTGATGCTCGATGAGTTTT TCTAATAAGCCTTGGTTCTGCGT TTCCCGCTCTTTAATACCCTGAC CGGAGGTGAGCAATGA

TT	Tham chiếu đầu tiên	Tên hiện hành	Tên thông dụng	Dòng	Mô tả ADN gây đột biến	Kiểu gen	Đột biến gen 1
12	Fig.4B	CM015	CM015	Thế đột biến của CI006	Phá vỡ gen nifL bằng mảnh của vùng nằm trước gen ompX được cài xen vào (Prm5).	$\Delta nifL::Prm5$	ATGACCCTGAATATGATGATGGA TGCCGGCGGACATCATCGCGAC AAACAATATTAATACCGGCAAC CACACCGGCAATTTACGAGACTG CGCAGGCATCCTTTCTCCCGTCA ATTTCTGTCAAATAAAGTAAAAG AGGCAGTCTACTTGAATTACCCC CGGCTGGTTGAGCGTTTGTGAA AAAAAGTAACTGAAAAATCCGT AGAATAGCGCCACTCTGATGGTT AATTAACCTATTCAATTAAGAAT TATCTGGATGAATGTGCCATTAA ATGCGCAGCATAATGGTGCGTTG TGCGGGAAAAGTCTTTTTTTTG AAAGGGTTGGTCAGTAGCGGAA ACAACTCACTTCACACCCCGAAG GGGGAAGTTGCCTGACCCTACG ATTCCCGCTATTTCACTCACTGA CCGGAGGTTCAAAATGA
13	Fig.4B	CM021	CM021	Thế đột biến của CI006	Phá vỡ gen nifL bằng mảnh của vùng nằm trước gen chưa được chú giải và đoạn 73 cặp bazơ đầu tiên của gen đó được cài xen vào (Prm2).	$\Delta nifL::Prm2$	ATGACCCTGAATATGATGATGGA TGCCGGCTCACCACGGCGATAAC CATAGGTTTTCGGCGTGGCCACA TCCATGGTGAATCCCACTTTTTC CAGCACGCGCGCCACTTCATCGG GTCTTAAATACATAGATTTTCT CGTCATCTTTCCAAAGCCTCGCC ACCTTACATGACTGAGCATGGAC CGTGACTCAGAAAATTCCACAA ACGAACCTGAAAGGCGTGATTG CCGTCTGGCCTTAAAAATTATGG TCTAAACTAAAATTTACATCGAA AACGAGGGAGGATCCTATGTTTA ACAAAACCGAATCGCCGTGACGT AGATGAAGGTGTTGAGGATATT AACCACGATGTTAACCAGCTCGA ACTCACTTCACACCCCGAAGGGG GAAGTTGCCTGACCCTACGATTTC CCGCTATTTCACTCACTGACCGG AGGTTCAAAATGA
14	Fig.4B	CM023	CM023	Thế đột biến của CI006	Phá vỡ gen nifL bằng mảnh của vùng nằm trước gen acpP và đoạn 121 cặp bazơ	$\Delta nifL::Prm4$	ATGACCCTGAATATGATGATGGA TGCCGGCTGACGAGGCAGGTTA CATCACTGGTGAAACCCTGCACG TCAATGGCGGAATGTATATGGTT TAACCACGATGAAAATTATTTGC GTTATTAGGGCGAAAAGGCCTCA AAATAGCGTAAAATCGTGGTAA GAACTGCCGGGATTTAGTTGCAA ATTTTTCACATTTTATACACTA CGAAAACCATCGCGAAAGCGAG TTTTGATAGGAAATTTAAGAGTA TGAGCACTATCGAAGAACGCGTT AAGAAAATTATCGGCGAACAGC TGGGCGTTAAGCAGGAAGAAGT

TT	Tham chiếu đầu tiên	Tên hiện hành	Tên thông dụng	Dòng	Mô tả ADN gây đột biến	Kiểu gen	Đột biến gen 1
					đầu tiên của gen <i>acpP</i> đó được cài xen vào (Prm4).		TACCAACAATGCTTCCTTCGTTG AAGACCTGGGCGCTGATTCTCTT GACACCGAACTCACTTCACACCC CGAAGGGGGAAGTTGCCTGACC CTACGATTCCCGCTATTTTCATTC ACTGACCGGAGGTTCAAAATGA
15	Fig.10A	CM014	CM014	Thẻ đột biến của CI006	Phá vỡ gen <i>nifL</i> bằng mảnh của vùng nằm trước gen <i>lpp</i> và đoạn 29 cặp bazơ đầu tiên của gen <i>lpp</i> đó được cài xen vào (Prm1).	$\Delta nifL::Prm1$	ATGACCCTGAATATGATGATGGA TGCCGGCCGTCCTGTAATAATAA CCGGACAATTCGGACTGATTAAA AAAGCGCCCTTGTGGCGCTTTTT TTATATTCCCGCCTCCATTAAAA ATAAAAAATCCAATCGGATTTC CTATTTAAACTGGCCATTATCTA AGATGAATCCGATGGAAGCTCG CTGTTTTAACACGCGTTTTTTAA CCTTTTATTGAAAGTCGGTGCTT CTTTGAGCGAACGATCAAATTTA AGTGGATTCCCATCAAAAAAAT ATTCTCAACCTAAAAAAGTTTGT GTAATACTTGTAACGCTACATGG AGATTAACCTCAATCTAGAGGGTA TTAATAATGAATCGTACTAAACT GGTACTGGGCGCAACTCACTTCA CACCCCGAAGGGGGAAGTTGCC TGACCCTACGATTCCCGCTATTT CATTCACTGACCGGAGGTTCAAA ATGA
16	Fig.10A	CM016	CM016	Thẻ đột biến của CI006	Phá vỡ gen <i>nifL</i> bằng mảnh của vùng nằm trước gen <i>lexA 3</i> và đoạn 21 cặp bazơ đầu tiên của gen <i>lexA 3</i> đó được cài xen vào (Prm9).	$\Delta nifL::Prm9$	ATGACCCTGAATATGATGATGGA TGCCGGCATATTGACACCATGAC GCGCGTAATGCTGATTGGTTCTG TGACGCTGGTAATGATTGTGCGAA ATTCTGAACAGTGCCATCGAAGC CGTAGTAGACCGTATTGGTGCAG AATTCCATGAACCTTCCGGGCGG GCGAAGGATATGGGGTCGGCGG CGGTGCTGATGTCCATCCTGCTG GCGATGTTTACCTGGATCGCATT ACTCTGGTCACATTTTCGATAAC GCTTCCAGAATTCGATAACGCCC TGGTTTTTTGCTTAAATTTGGTTC CAAAATCGCCTTTAGCTGTATAT ACTCACAGCATAACTGTATATAC ACCCAGGGGGCGGGATGAAAGC ATTAACGGCCAGGAACCTCACTTC ACACCCCGAAGGGGGAAGTTGC CTGACCCTACGATTCCCGCTATT TCATTCACTGACCGGAGGTTCAA AATGA
17	Fig.10A	CM022	CM022	Thẻ đột biến của CI006	Phá vỡ gen <i>nifL</i> bằng mảnh của	$\Delta nifL::Prm3$	ATGACCCTGAATATGATGATGGA TGCCGGCATCATATTGCGCTCCC TGGTTATCATTTGTTACTAAATG AAATGTTATAATATAACAATTAT AAATACCACATCGCTTTCAATTC ACCAGCCAAATGAGAGGAGCGC

TT	Tham chiếu đầu tiên	Tên hiện hành	Tên thông dụng	Dòng	Mô tả ADN gây đột biến	Kiểu gen	Đột biến gen 1
					vùng nằm trước gen mntP 1 và đoạn 53 cặp bazơ đầu tiên của gen mntP 1 đó được cài xen vào (Prm3).		CGTCTGACATAGCCAGCGCTATA AAACATAGCATTATCTATATGTT TATGATTAATAACTGATTTTGC GTTTTGGATTTGGCTGTGGCATC CTTGCCGCTCTTTTCGCAGCGTC TGCGTTTTTGCCCTCCGGTCAGG GCATTTAAGGGTCAGCAATGAGT TTTTACGCAATTACGATTCTTGC CTTCGGCATGTCGATGGATGCTT TAACTCACTTCACACCCCGAAGG GGGAAGTTGCCTGACCCTACGAT TCCCGCTATTTCACTTCACTGACC GGAGGTTCAAAATGA
18	Fig.10A	CM024	CM024	Thẻ đột biến của CI006	Phá vỡ gen nifL bằng mảnh của vùng nằm trước gen sppA được cài xen vào (Prm7).	$\Delta nifL::Prm7$	ATGACCCTGAATATGATGATGGA TGCCGGCCGCGTCAGGTTGAACG TAAAAAAGTCGGTCTGCGCAAA GCACGTCGTCGTCCGCAGTTCTC CAAACGTTAATTGGTTTCTGCTT CGGCAGAACGATTGGCGAAAAA ACCCGGTGCGAACCGGGTTTTT TATGGATAAAGATCGTGTATCC ACAGCAATCCATTGATTATCTCT TCTTTTTTCAGCATTTCCAGAATC CCCTCACCACAAAGCCCCGCAAA ATCTGGTAAACTATCATCCAATT TTCTGCCCAAATGGCTGGGATTG TTCATTTTTTGTTCCTTACAAC GAGAGTGACAGTACGCGCGGGT AGTTAACTCAACATCTGACCGGT CGATAACTCACTTCACACCCCGA AGGGGGAAGTTGCCTGACCCTA CGATTCCCGCTATTTCACTTCACT GACCGGAGGTTCAAAATGA
19	Fig.10A	CM025	CM025	Thẻ đột biến của CI006	Phá vỡ gen nifL bằng mảnh của vùng nằm trước gen hisS và đoạn 52 cặp bazơ đầu tiên của gen hisS đó được cài xen vào	$\Delta nifL::Prm10$	ATGACCCTGAATATGATGATGGA TGCCGGCCCTGTATGAAGATGGC GTGCGCAAAGATCGCCTGGATA ACAGCGATATGATTAGCCAGCTT GAAGCCCGCATTCGCGCGAAAG CGTCAATGCTGGACGAAGCGCG TCGTATCGATGTGCAACAGGTAG AAAAATAAGGTTGCTGGGAAGC GGCAGGCTTCCCGTGTATGATGA ACCCGCCCCGCGCGACCCGTTGT TCGTGCGCGCCCCGAGGGTTCAT TTTTGTATTAATAAAGAGAATA AACGTGGCAAAAAATATTCAAG CCATTCGCGGCATGAACGATTAT CTGCCTGGCGAACTCACTTCACA CCCCGAAGGGGGAAGTTGCCTG ACCCTACGATTCCCGCTATTTCA TTCACTGACCGGAGGTTCAAAAT GA

TT	Tham chiếu đầu tiên	Tên hiện hành	Tên thông dụng	Dòng	Mô tả ADN gây đột biến	Kiểu gen	Đột biến gen 1
					(Prm10).		
20	Fig.10B	CM006	CM006	Thẻ đột biến của CI010	Phá vỡ gen <i>glnB</i> bằng cat-xet biểu hiện kháng kanamy xin (KanR) mã hóa gen aminoglycosit O-phosphotransferaza <i>aph1</i> được cài xen vào.	Δ <i>glnB</i> :: KanR	ATGAAAAAGATTGATGCGATTAT TAAACCTTTCAAACCTGGATGACG TCGCTGATCCTTCAACTCAGCA AAAGTTCGATTTATTCAACAAAG CCACGTTGTGTCTCAAAATCTCT GATGTTACATTGCACAAGATAAA AATATATCATCATGAACAATAAA ACTGTCTGCTTACATAAACAGTA ATACAAGGGGTGTTATGAGCCAT ATTCAACGGGAAACGTCTTGCTC CCGTCCGCGCTTAAACTCCAACA TGGACGCTGATTTATATGGGTAT AAATGGGCTCGCGATAATGTCTG GGCAATCAGGTGCGACAATCTAT CGCTTGTATGGGAAGCCCGATGC GCCAGAGTTGTTTCTGAAACATG GCAAAGGTAGCGTTGCCAATGA TGTTACAGATGAGATGGTCCGTC TCAACTGGCTGACGGAGTTTATG CCTCTCCCGACCATCAAGCATTT TATCCGTACTCCTGATGATGCGT GGTTACTCACCACCGCGATTCTT GGGAAAACAGCCTTCCAGGTATT AGAAGAATATCCTGATTCAGGTG AAAATATTGTTGATGCGCTGGCC GTGTTCTGCGCCGGTTACATTC GATTCTGTTTGTAAATTGTCCTTT TAACAGCGATCGTGTATTTCTGTC TTGCTCAGGCGCAATCACGCATG AATAACGGTTTGGTTGATGCGAG TGATTTTGATGACGAGCGTAATG GCTGGCCTGTTGAACAAGTCTGG AAAGAAATGCACAAGCTCTTGC CATTCTCACCGGATTCAGTCGTC ACTCATGGTGATTTCTCACTTGA TAACCTTATTTTTGACGAGGGGA AATTAATAGGTTGTATTGATGTT GGACGGGTCGGAATCGCAGACC GTTACCAGGACCTTGCCATTCTT TGGAAGTGCCTCGGTGAGTTTTT TCCTTCATTACAGAAACGGCTTT TTCAAAAATATGGTATTGATAAT CCTGATATGAATAAATTGCAGTT TCATTTGATGCTCGATGAGTTTT TCTAATAAGCCTCGCGCGTGATT CGTATCCGCACCGGCGAAGAAG ACGACGCGGCGATTAA
21	Fig.10C	CI028 <i>nifL</i> ::KanR	CM017	Thẻ đột biến của CI028	Phá vỡ gen <i>nifL</i> bằng cat-xet	Δ <i>nifL</i> :: KanR	ATGACCATGAACCTGATGACGG ATGTCGTCTCAGCCACCGGGATC GCCGGGTGCTTTACGACAACA CCCGACGCTGTTTTTACACTAA TTGAACAGGCCCCCGTGCGATC

TT	Tham chiếu đầu tiên	Tên hiện hành	Tên thông dụng	Dòng	Mô tả ADN gây đột biến	Kiểu gen	Đột biến gen 1
					biểu hiện kháng kanamy xin (KanR) mã hóa gen aminoglycosit O-phosphotransferaza aphI được cài xen vào.		ACGCTGACGGATACCGCTGCCCG CATTGTCTATGCCAACCCGGGCG TGTTGAGTCATCCTGACTAGCTG AGATGAGGGCTCGCCTGATCCTT CAACTCAGCAAAAAGTTCGATTTA TTCAACAAAGCCACGTTGTGTCT CAAAATCTCTGATGTTACATTGC ACAAGATAAAAATATATCATCAT GAACAATAAAACTGTCTGCTTAC ATAAACAGTAATACAAGGGGTG TTATGAGCCATATTCAACGGGAA ACGTCTTGCTCCAGGCCGCGATT AAATTCCAACATGGATGCTGATT TATATGGGTATAAATGGGCTCGC GATAATGTCCGGCAATCAGGTG CGACAATCTATCGATTGTATGGG AAGCCCGATGCGCCAGAGTTGTT TCTGAAACATGGCAAAGGTAGC GTTGCCAATGATGTTACAGATGA GATGGTCAGACTAACTGGCTG ACGGAATTTATGCCTCTTCCGAC CATCAAGCATTTTATCCGTACTC CTGATGATGCATGGTTACTCACC ACTGCGATCCCCGGGAAAACAG CATTCCAGGTATTAGAAGAATAT CCTGATTCAGGTGAAAATATTGT TGATGCGCTGGCAGTGTTCCCTGC GCCGGTTGCATTTCGATTCTGTT TGTAATTGTCCTTTTAACAGCGA TCGCGTATTTTCGTCTCGCTCAGG CGCAATCACGAATGAATAACGG TTTGGTTGATGCGAGTGATTTTG ATGACGAGCGTAATGGCTGGCCT GTTGAACAAGTCTGGAAAGAAA TGCATAAGCTTTTGCCATTCTCA CCGGATTCAGTCGTCACTCATGG TGATTTCTCACTTGATAACCTTA TTTTTGACGAGGGGAAATTAATA GGTTGTATTGATGTTGGACGAGT CGGAATCGCAGACCGGATACCAG GATCTTGCCATCCTATGGAAGT CCTCGGTGAGTTTTCTCCTTCATT ACAGAAACGGCTTTTCAAAAAT ATGGTATTGATAATCCTGATATG AATAAATTGCAGTTTCATTTGAT GCTCGATGAGTTTTTCTAATAAG CCTGACCGGTGGTGAATTTAATC TCGCTGACGTGTAGACATTCATC GATCTGCATCCACGGTCCGGCGG CGGTACCTGCCTGACGCTACGTT TACCGCTCTTTTATGAACTGACC GGAGGCCCAAGATGA
22	Fig.10C	CI019 nifL:SpecR	CM011	Thẻ đột biến của CI019	Phá vỡ gen nifL bằng	Δ nifL::SpecR	ATGAGCATCACGGCGTTATCAGC ATCATTTCTGAGGGGAATATCG CCAGCCGCTTGTCGCTGCAACAT CCTTCACTGTTTATACCGTGTT

TT	Tham chiếu đầu tiên	Tên hiện hành	Tên thông dụng	Dòng	Mô tả ADN gây đột biến	Kiểu gen	Đột biến gen 1
					cat-xet biểu hiện kháng spectin omycin (SpecR) mã hóa gen strepto myxin 3''-O- adenyly ltransfe raza aadA được cài xen vào.		GAACAATCTTCGGTGGCGAGCGT GTTGAGTCATCCTGACTAGCTGA GATGAGGGCTCGCCCCCTCGTCC CGACACTTCCAGATCGCCATAGC GCACAGCGCCTCGAGCGGTGGT AACGGCGCAGTGGCGGTTTTTCAT GGCTTGTTATGACTGTTTTTTTGG GGTACAGTCTATGCCTCGGGCAT CCAAGCAGCAAGCGCGTTACGC CGTGGGTCGATGTTTGATGTTAT GGAGCAGCAACGATGTTACGCA GCAGGGCAGTCGCCCTAAAACA AAGTTAAACATCATGAGGGAAG CGGTGATCGCCGAAGTATCGACT CAACTATCAGAGGTAGTTGGCGT CATCGAGCGCCATCTCGAACC GA CGTTGCTGGCCGTACATTTGTAC GGCTCCGCAGTGGATGGCGGCCT GAAGCCACACAGTGATATTGATT TGCTGGTTACGGTGACCGTAAGG CTTGATGAAACAACGCGGCGAG CTTTGATCAACGACCTTTTGGA ACTTCGGCTTCCCCTGGAGAGAG CGAGATTCTCCGCGCTGTAGAAG TCACCATTGTTGTGCACGACGAC ATCATTCCGTGGCGTTATCCAGC TAAGCGCGAACTGCAATTTGGA GAATGGCAGCGCAATGACATTCT TGCAGGTATCTTCGAGCCAGCCA CGATCGACATTGATCTGGCTATC TTGCTGACAAAAGCAAGAGAAC ATAGCGTTGCCTTGGTAGGTCCA GCGGCGGAGGAACTCTTTGATCC GGTTCCTGAACAGGATCTATTTG AGGCGCTAAATGAAACCTTAAC GCTATGGAACCTCGCCGCCGACT GGGCTGGCGATGAGCGAAATGT AGTGCTTACGTTGTCCCGCATTT GGTACAGCGCAGTAACCGGCAA AATCGCGCCGAAGGATGTCGCT GCCGACTGGGCAATGGAGCGCC TGCCGGCCCAGTATCAGCCCGTC ATACTTGAAGCTAGACAGGCTTA TCTTGGACAAGAAGAAGATCGC TTGGCCTCGCGCGCAGATCAGTT GGAAGAATTTGTCCACTACGTGA AAGGCGAGATCACCAAGGTAGT CGGCAAATAATGTCTAACAATTC GTTCAAGCCGACGCCGCTTCGCG GCGCGGCTTAACTCAAGCGTTAG ATGCACTAAGCACATAATTGCTC ACAGCCAACTATCAGGTCAAG TCTGCTTTTATTATTTTAAGCGT GCATAATAAGCCCTACACAAAT GGTACCCGACCGGTGGTGAATTT AATCTCGCTGACGTGTAGACATT

TT	Tham chiếu đầu tiên	Tên hiện hành	Tên thông dụng	Dòng	Mô tả ADN gây đột biến	Kiểu gen	Đột biến gen 1
							CCCTTATCCAGACGCTGATCGCC CATCATCGCGGTTCTTTAGATCT CTCGGTCCGCCCTGATGGCGGCA CCTTGCTGACGTTACGCCTGCCG GTACAGCAGGTTATCACCGGAG GCTTAAAATGA
23	Fig.10C	CI006 nifL:KanR	CM013	Thế đột biến của CI006	Phá vỡ gen nifL bằng cat-xet biểu hiện kháng kanamy xin (KanR) mã hóa gen aminoglycosit O-phosphotransferaza aphI được cài xen vào.	Δ nifL::KanR	CTGATCCTTCAACTCAGCAAAAAG TTCGATTTATTCAACAAAGCCAC GTTGTGTCTCAAAATCTCTGATG TTACATTGCACAAGATAAAAAATA TATCATCATGAACAATAAAACTG TCTGCTTACATAAACAGTAATAC AAGGGGTGTTATGAGCCATATTC AACGGGAAACGTCTTGCTCCAG GCCGCGATTAAATTCCAACATGG ATGCTGATTTATATGGGTATAAA TGGGCTCGCGATAATGTCGGGCA ATCAGGTGCGACAATCTATCGAT TGTATGGGAAGCCCGATGCGCC AGAGTTGTTTCTGAAACATGGCA AAGGTAGCGTTGCCAATGATGTT ACAGATGAGATGGTCAGACTAA ACTGGCTGACGGAATTTATGCCT CTTCCGACCATCAAGCATTTTAT CCGTA CTCTGATGATGCATGGT TACTCACCCTGCGATCCCCGGG AAAACAGCATTCCAGGTATTAG AAGAATATCCTGATTCAGGTGAA AATATTGTTGATGCGCTGGCAGT GTTCTGCGCCGGTTGCATTGCA TTCCTGTTTGTAATTGTCCTTTTA ACAGCGATCGCGTATTTCTGCTC GCTCAGGCGCAATCACGAATGA ATAACGGTTTGTTGATGCGAGT GATTTTGATGACGAGCGTAATGG CTGGCCTGTTGAACAAGTCTGGA AAGAAATGCATAAGCTTTTGCCA TTCTCACCAGGATTCAGTCGTCAC TCATGGTGATTTCTCACTTGATA ACCTTATTTTGACGAGGGGAAA TTAATAGGTTGTATTGATGTTGG ACGAGTCGGAATCGCAGACCGA TACCAGGATCTTGCCATCCTATG GAACTGCCTCGGTGAGTTTCTC CTTCATTACAGAAACGGCTTTTT CAAAAATATGGTATTGATAATCC TGATATGAATAAATTGCAGTTTC ATTTGATGCTCGATGAGTTTTTC TAATAAGCCTTGACCCTACGATT CCCGTATTTCACTTCACTGACCG GAGGTTCAAAAATGA
24	Fig.10C	CI010 nifL:KanR	CM005	Thế đột biến của CI010	Phá vỡ gen nifL bằng cat-xet	Δ nifL::KanR	ATGACCCTGAATATGATGCTCGA TAACGCCGTACCCGAGGCGATTG CCGGCTGATCCTTCAACTCAGCA AAAGTTCGATTTATTCAACAAAG CCACGTTGTGTCTCAAAATCTCT

TT	Tham chiếu đầu tiên	Tên hiện hành	Tên thông dụng	Dòng	Mô tả ADN gây đột biến	Kiểu gen	Đột biến gen 1
					biểu hiện kháng kanamy xin (KanR) mã hóa gen aminoglycosit O-phosphotransferaza aphI được cài xen vào.		GATGTTACATTGCACAAGATAAAA AATATATCATCATGAACAATAAAA ACTGTCTGCTTACATAAACAGTA ATACAAGGGGTGTTATGAGCCAT ATTCAACGGGAAACGTCTTGCTC CCGTCCGCGCTTAAACTCCAACA TGGACGCTGATTTATATGGGTAT AAATGGGCTCGCGATAATGTCG GGCAATCAGGTGCGACAATCTAT CGCTTGTATGGGAAGCCCGATGC GCCAGAGTTGTTTCTGAAACATG GCAAAGGTAGCGTTGCCAATGA TGTTACAGATGAGATGGTCCGTC TCAACTGGCTGACGGAGTTTATG CCTCTCCCGACCATCAAGCATTT TATCCGTACTCCTGATGATGCGT GGTTACTCACCACCGCGATTCTT GGGAAAACAGCCTTCCAGGTATT AGAAGAATATCCTGATTCAGGTG AAAATATTGTTGATGCGCTGGCC GTGTTCTGCGCCGGTTACATTC GATTCCTGTTTGTAAATTGTCCTTT TAACAGCGATCGTGTATTTTCGTC TTGCTCAGGCGCAATCACGCATG AATAACGGTTTGGTTGATGCGAG TGATTTTGTATGACGAGCGTAATG GCTGGCCTGTTGAACAAGTCTGG AAAGAAATGCACAAGCTCTTGC CATTCTCACCAGGATTCAGTCGTC ACTCATGGTGATTTCTCACTTGA TAACCTTATTTTGTACGAGGGGA AATTAATAGGTTGTATTGATGTT GGACGGGTCGGAATCGCAGACC GTTACCAGGACCTTGCCATTCTT TGGAAGTGCCTCGGTGAGTTTTC TCCTTCATTACAGAAACGGCTTT TTCAAAAATATGGTATTGATAAT CCTGATATGAATAAATTGCAGTT TCATTTGATGCTCGATGAGTTTT TCTAATAAGCCTTGGTTCTGCGT TTCCCGCTCTTTAATACCCTGAC CGGAGGTGAGCAATGA
25	Fig.4C	Chủng 2	CI006	Chủng phân lập từ giống <i>Enterobacter</i>	Không có	WT	
26	Fig.4C	Chủng 4	CI010	Chủng phân lập từ giống <i>Klebsiella</i>	Không có	WT	
27	Fig.4C	Chủng 1	CI019	Chủng phân lập từ giống <i>Rahnella</i>	Không có	WT	
28	Fig.4C	Chủng 3	CI028	Chủng phân lập từ giống <i>Enterobacter</i>	Không có	WT	

TT	Tham chiếu đầu tiên	Tên hiện hành	Tên thông dụng	Dòng	Mô tả ADN gây đột biến	Kiểu gen	Đột biến gen 1
29	Fig.4B	Chủng 2	CI006	Chủng phân lập từ giống <i>Enterobacter</i>	Không có	WT	
30	Fig.4B	Cao	CM014	Thế đột biến của CI006	Phá vỡ gen nifL bằng mảnh của vùng nằm trước gen lpp và đoạn 29 cặp bazơ đầu tiên của gen lpp đó được cài xen vào (Prm1).	$\Delta nifL::Prm1$	ATGACCCTGAATATGATGATGGA TGCCGGCCGTCCTGTAATAATAA CCGGACAATTCGGACTGATTAAA AAAGCGCCCTTGTGGCGCTTTTT TTATATTCCCGCCTCCATTTAAA ATAAAAAATCCAATCGGATTTC CTATTTAAACTGGCCATTATCTA AGATGAATCCGATGGAAGCTCG CTGTTTTAACACGCGTTTTTTAA CCTTTTATTGAAAGTCGGTGCTT CTTTGAGCGAACGATCAAATTTA AGTGGATTCCCATCAAAAAAAT ATTCTCAACCTAAAAAAGTTTGT GTAATACTTGTAACGCTACATGG AGATTAACCTCAATCTAGAGGGTA TTAATAATGAATCGTACTAAACT GGTACTGGGCGCAACTCACTTCA CACCCCGAAGGGGGAAGTTGCC TGACCCTACGATTCCCGCTATTT CATTCACTGACCGGAGGTTCAAA ATGA
31	Fig.4B	Trung bình	CM015	Thế đột biến của CI006	Phá vỡ gen nifL bằng mảnh của vùng nằm trước gen ompX được cài xen vào (Prm5).	$\Delta nifL::Prm5$	ATGACCCTGAATATGATGATGGA TGCCGGCGGACATCATCGCGAC AAACAATATTAATACCGGCAAC CACACCGGCAATTTACGAGACTG CGCAGGCATCCTTTCTCCCGTCA ATTTCTGTCAAATAAAGTAAAAG AGGCAGTCTACTTGAATTACCCC CGGCTGGTTGAGCGTTTGTGAA AAAAAGTAACTGAAAAATCCGT AGAATAGCGCCACTCTGATGGTT AATTAACCTATTCAATTAAGAAT TATCTGGATGAATGTGCCATTAA ATGCGCAGCATAATGGTGCGTTG TGCGGGA AAACTGCTTTTTTTTG AAAGGGTTGGTCAGTAGCGGAA ACAACTCACTTCACACCCCGAAG GGGGAAGTTGCCTGACCCTACG ATTCCCGCTATTTCACTCACTGA CCGGAGGTTCAAAAATGA
32	Fig.4B	Thấp	CM023	Thế đột biến của CI006	Phá vỡ gen nifL bằng mảnh của vùng nằm trước gen acpP và đoạn 121 cặp	$\Delta nifL::Prm4$	ATGACCCTGAATATGATGATGGA TGCCGGCTGACGAGGCAGGTTA CATCACTGGTGAAACCCTGCACG TCAATGGCGGAATGTATATGGTT TAACCACGATGAAAATTATTTGC GTTATTAGGGCGAAAAGCCTCA AAATAGCGTAAAATCGTGGTAA GAACTGCCGGGATTTAGTTGCAA ATTTTTCAACATTTTATACACTA CGAAAACCATCGCGAAAGCGAG TTTTGATAGGAAATTTAAGAGTA TGAGCACTATCGAAGAACGCGTT AAGAAAATTATCGGCGAACAGC

TT	Tham chiếu đầu tiên	Tên hiện hành	Tên thông dụng	Dòng	Mô tả ADN gây đột biến	Kiểu gen	Đột biến gen 1
					bazơ đầu tiên của gen <i>acpP</i> đó được cài xen vào (Prm4).		TGGGCGTTAAGCAGGAAGAAGT TACCAACAATGCTTCCTTCGTTG AAGACCTGGGCGCTGATTCTCTT GACACCGAACTCACTTCACACCC CGAAGGGGGAAGTTGCCTGACC CTACGATTCCCGCTATTTTCATTC ACTGACCGGAGGTTCAAAATGA
33	Fig.4D	Chủng 2	CI006	Chủng phân lập từ giống <i>Enterobacter</i>	Không có	WT	
34	Fig.4D	Tiến hóa	CM029	Thế đột biến của CI006	Phá vỡ gen <i>nifL</i> bằng mảnh của vùng nằm trước gen <i>ompX</i> được cài xen vào (Prm5) và làm khuyết 1287 cặp bazơ sau codon khởi đầu của gen <i>glnE</i> chứa miền loại bỏ adenyl của glutama t-amoniac-ligaza adenyl transferaza (Δ <i>glnE-AR_KO1</i>).	Δ <i>nifL::Prm5</i> Δ <i>glnE-AR_KO1</i>	ATGACCCTGAATATGATGATGGA TGCCGGCGGACATCATCGCGAC AAACAATATTAATACCGGCAAC CACACCGGCAATTTACGAGACTG CGCAGGCATCCTTTCTCCCGTCA ATTTCTGTCAAATAAAGTAAAAG AGGCAGTCTACTTGAATTACCCC CGGCTGGTTGAGCGTTTGTTGAA AAAAAGTAACTGAAAAATCCGT AGAATAGCGCCACTCTGATGGTT AATTAACCTATTCAATTAAGAAT TATCTGGATGAATGTGCCATTAA ATGCGCAGCATAATGGTGCGTTG TGCGGGA AAACTGCTTTTTTTTG AAAGGGTTGGTCAGTAGCGGAA ACAACTCACTTCACACCCCGAAG GGGGAAGTTGCCTGACCCTACG ATTCCCGCTATTTTCATTCCTGA CCGGAGGTTCAAAATGA
35	Fig.14 C	Kiểu hoang	CI006	Chủng phân lập từ giống <i>Enterobacter</i>	Không có	WT	

TT	Tham chiếu đầu tiên	Tên hiện hành	Tên thông dụng	Dòng	Mô tả ADN gây đột biến	Kiểu gen	Đột biến gen 1
36	Fig.14 C	Kiểu tiến hóa	CM014	Thế đột biến của CI006	Phá vỡ gen nifL bằng mảnh của vùng nằm trước gen lpp và đoạn 29 cặp bazơ đầu tiên của gen lpp đó được cài xen vào (Prm1).	$\Delta nifL::Prm1$	ATGACCCTGAATATGATGATGGA TGCCGGCCGTCCTGTAATAATAA CCGGACAATTCGGAAGTATTA AAAGCGCCCTTGTGGCGCTTTT TTATATTCCCGCCTCCATTATAA ATAAAAAATCCAATCGGATTTC CTATTTAAACTGGCCATTATCTA AGATGAATCCGATGGAAGCTCG CTGTTTTAACACGCGTTTTTTAA CCTTTTATTGAAAGTCGGTGCTT CTTTGAGCGAACGATCAAATTTA AGTGGATTCCCATCAAAAAAAT ATTCTCAACCTAAAAAGTTTGT GTAATACTTGTAACGCTACATGG AGATTAACCTCAATCTAGAGGGTA TTAATAATGAATCGTACTAAACT GGTACTGGGCGCAACTCACTTCA CACCCCGAAGGGGGAAGTTGCC TGACCCTACGATTCCCGCTATTT CATTCCTGACCGGAGGTTCAAAA ATGA
37	Fig.14B	Kiểu hoang	CI019	Chủng phân lập từ giống <i>Rahnella</i>	Không có	WT	
38	Fig.14B	Kiểu tiến hóa	CM011	Thế đột biến của CI019	Phá vỡ gen nifL bằng cat-xet biểu hiện kháng spectinomycin (SpecR) mã hóa gen streptomycin 3'-O-adenylyltransferase aadA được cài xen vào.	$\Delta nifL::SpecR$	ATGAGCATCACGGCGTTATCAGC ATCATTTCTGAGGGGAATATCG CCAGCCGCTTGTGCTGCAACAT CCTTCACTGTTTTATACCGTGTT GAACAATCTTCGGTGCGGAGCGT GTTGAGTCATCTGACTAGCTGA GATGAGGGCTCGCCCCCTCGTCC CGACACTTCCAGATCGCCATAGC GCACAGCGCCTCGAGCGGTGGT AACGGCGCAGTGGCGGTTTTTCAT GGCTTGTTATGACTGTTTTTTTG GGTACAGTCTATGCCTCGGGCAT CCAAGCAGCAAGCGCGTTACGC CGTGGGTGCGATGTTTGATGTTAT GGAGCAGCAACGATGTTACGCA GCAGGGCAGTCGCCCTAAAACA AAGTTAAACATCATGAGGGAAG CGGTGATCGCCGAAGTATCGACT CAACTATCAGAGGTAGTTGGCGT CATCGAGCGCCATCTCGAACC CGTTGCTGGCCGTACATTTGTAC GGCTCCGCGAGTGGATGGCGGCCT GAAGCCACACAGTGATATTGATT TGCTGGTTACGGTGACCGTAAGG CTTGATGAAACAACGCGGCGAG CTTTGATCAACGACCTTTTGGAA ACTTCGGCTTCCCTGGAGAGAG CGAGATTCTCCGCGCTGTAGAAG TCACCATTGTTGTGCACGACGAC ATCATTCCGTGGCGTTATCCAGC TAAGCGCGAACTGCAATTTGGA GAATGGCAGCGCAATGACATTCT

TT	Tham chiếu đầu tiên	Tên hiện hành	Tên thông dụng	Dòng	Mô tả ADN gây đột biến	Kiểu gen	Đột biến gen 1
							TGCAGGTATCTTCGAGCCAGCCA CGATCGACATTGATCTGGCTATC TTGCTGACAAAAGCAAGAGAAC ATAGCGTTGCCTTGGTAGGTCCA GCGGCGGAGGAACCTTTTGATCC GGTTCCTGAACAGGATCTATTTG AGGCGCTAAATGAAACCTTAAC GCTATGGAACCTCGCCGCCGACT GGGCTGGCGATGAGCGAAATGT AGTGCTTACGTTGTCCCGCATTT GGTACAGCGCAGTAACCGGCAA AATCGCGCCGAAGGATGTCGCT GCCGACTGGGCAATGGAGCGCC TGCCGGCCCAGTATCAGCCCGTC ATACTTGAAGCTAGACAGGCTTA TCTTGACAAGAAGAAGATCGC TTGGCCTCGCGCGCAGATCAGTT GGAAGAATTTGTCCACTACGTGA AAGGCGAGATCACCAAGGTAGT CGGCAAATAATGTCTAACAATTC GTTCAAGCCGACGCCGCTTCGCG GCGCGGCTTAACTCAAGCGTTAG ATGCACTAAGCACATAATTGCTC ACAGCCAACTATCAGGTCAAG TCTGCTTTTATTATTTTAAAGCGT GCATAATAAGCCCTACACAAAT GGTACCCGACCGGTGGTGAATTT AATCTCGCTGACGTGTAGACATT CCCTTATCCAGACGCTGATCGCC CATCATCGCGTTCTTTAGATCT CTCGGTCCGCCCTGATGGCGGCA CCTTGCTGACGTTACGCCTGCCG GTACAGCAGGTTATCACCGGAG GCTTAAATGA
39	Fig.14A	Kiểu tiến hóa	CM011	Thẻ đột biến của CI019	Phá vỡ gen nifL bằng cat-xet biểu hiện kháng spectinomycin (SpecR) mã hóa gen streptomycin 3''-O-adenylyl transferase aadA được	$\Delta nifL::S_{pecR}$	ATGAGCATCACGGCGTTATCAGC ATCATTTCTGAGGGGAATATCG CCAGCCGCTTGTCGCTGCAACAT CCTTCACTGTTTTATACCGTGGTT GAACAATCTTCGGTGGCGAGCGT GTTGAGTCATCCTGACTAGCTGA GATGAGGGCTCGCCCCCTCGTCC CGACACTCCAGATCGCCATAGC GCACAGCGCCTCGAGCGGTGGT AACGGCGCAGTGGCGGTTTTCAT GGCTTGTTATGACTGTTTTTTTGG GGTACAGTCTATGCCTCGGGCAT CCAAGCAGCAAGCGCGTTACGC CGTGGGTCGATGTTTGATGTTAT GGAGCAGCAACGATGTTACGCA GCAGGGCAGTCGCCCTAAAACA AAGTTAAACATCATGAGGGAAG CGGTGATCGCCGAAGTATCGACT CAACTATCAGAGGTAGTTGGCGT CATCGAGCGCCATCTCGAACC GA CGTTGCTGGCCGTACATTTGTAC GGCTCCGCAGTGGATGGCGGCCT

TT	Tham chiếu đầu tiên	Tên hiện hành	Tên thông dụng	Dòng	Mô tả ADN gây đột biến	Kiểu gen	Đột biến gen 1
					cài xen vào.		GAAGCCACACAGTGATATTGATT TGCTGGTTACGGTGACCGTAAGG CTTGATGAAACAACGCGGCGAG CTTTGATCAACGACCTTTTGGA ACTTCGGCTTCCCCTGGAGAGAG CGAGATTCTCCGCGCTGTAGAAG TCACCATTGTTGTGCACGACGAC ATCATTCCGTGGCGTTATCCAGC TAAGCGCGAACTGCAATTTGGA GAATGGCAGCGCAATGACATTCT TGCAGGTATCTTCGAGCCAGCCA CGATCGACATTGATCTGGCTATC TTGCTGACAAAAGCAAGAGAAC ATAGCGTTGCCTTGGTAGGTCCA GCGGCGGAGGAACTCTTTGATCC GGTTCCTGAACAGGATCTATTTG AGGCGCTAAATGAAACCTTAAC GCTATGGAACCTCGCCGCCGACT GGGCTGGCGATGAGCGAAATGT AGTGCTTACGTTGTCCCGCATTT GGTACAGCGCAGTAACCGGCAA AATCGCGCCGAAGGATGTCGCT GCCGACTGGGCAATGGAGCGCC TGCCGGCCAGTATCAGCCCGTC ATACTGAAGCTAGACAGGCTTA TCTTGGACAAGAAGAAGATCGC TTGGCCTCGCGCGCAGATCAGTT GGAAGAATTTGTCCACTACGTGA AAGGCGAGATCACCAAGGTAGT CGGCAAATAATGTCTAACAATTC GTTCAAGCCGACGCCGCTTCGCG GCGCGGCTTAAGTCAAGCGTTAG ATGCACTAAGCACATAATTGCTC ACAGCCAACTATCAGGTCAAG TCTGCTTTTATTATTTTAAAGCGT GCATAATAAGCCCTACACAAAT GGTACCCGACCGGTGGTGAATTT AATCTCGCTGACGTGTAGACATT CCCTTATCCAGACGCTGATCGCC CATCATCGCGGTTCTTTAGATCT CTCGGTCCGCCCTGATGGCGGCA CCTTGCTGACGTTACGCCTGCCG GTACAGCAGGTTATCACCGGAG GCTTAAATGA
40	Fig.15A	Kiểu hoang	CI006	Chủng phân lập từ giống <i>Enterobacter</i>	Không có	WT	
41	Fig.15A	Kiểu tiến hóa	CM013	Thế đột biến của CI006	Phá vỡ gen nifL bằng cat-xet biểu hiện kháng kanamy	Δ nifL:: KanR	CTGATCCTTCAACTCAGCAAAAG TTCGATTATTCAACAAAGCCAC GTTGTGTCTCAAAATCTCTGATG TTACATTGCACAAGATAAAAATA TATCATCATGAACAATAAACTG TCTGCTTACATAAACAGTAATAC AAGGGGTGTTATGAGCCATATTC AACGGGAAACGTCTTGCTCCAG GCCGCGATTAAATTCCAACATGG

TT	Tham chiếu đầu tiên	Tên hiện hành	Tên thông dụng	Dòng	Mô tả ADN gây đột biến	Kiểu gen	Đột biến gen 1
					xin (KanR) mã hóa gen aminoglycosit O-phosphotransferaza aphI được cài xen vào.		ATGCTGATTTATATGGGTATAAA TGGGCTCGCGATAATGTCGGGCA ATCAGGTGCGACAATCTATCGAT TGTATGGGAAGCCCGATGCGCC AGAGTTGTTTCTGAAACATGGCA AAGGTAGCGTTGCCAATGATGTT ACAGATGAGATGGTCAGACTAA ACTGGCTGACGGAATTTATGCCT CTTCCGACCATCAAGCATTTTAT CCGTACTCCTGATGATGCATGGT TACTCACCCTGCGATCCCCGGG AAAACAGCATTCCAGGTATTAG AAGAATATCCTGATTGAGGTGAA AATATTGTTGATGCGCTGGCAGT GTTCCTGCGCCGGTTGCATTCTGA TTCCTGTTTGTAATTGTCCTTTTA ACAGCGATCGCGTATTTTCGTCTC GCTCAGGCGCAATCACGAATGA ATAACGGTTTGGTTGATGCGAGT GATTTTGATGACGAGCGTAATGG CTGGCCTGTTGAACAAGTCTGGA AAGAAATGCATAAGCTTTTGCCA TTCTCACCAGATTGAGTCGTAC TCATGGTGATTTCTCACTTGATA ACCTTATTTTGGACGAGGGGAAA TTAATAGGTTGTATTGATGTTGG ACGAGTCGGAATCGCAGACCGA TACCAGGATCTTGCCATCCTATG GAACTGCCTCGGTGAGTTTCTC CTTTATTACAGAAACGGCTTTT CAAAAATATGGTATTGATAATCC TGATATGAATAAATTGCAGTTTC ATTTGATGCTCGATGAGTTTTC TAATAAGCCTTGACCCTACGATT CCCGCTATTTCACTGACCG GAGGTTCAAAATGA
42	Fig.15B	Không tên	CM011	Thẻ đột biến của CI019	Phá vỡ gen nifL bằng cat-xet biểu hiện kháng spectinomycin (SpecR) mã hóa gen streptomycin 3'-O-adenylyltransferaza aadA	$\Delta nifL::S_{pecR}$	ATGAGCATCACGGCGTTATCAGC ATCATTTCTGAGGGGAATATCG CCAGCCGCTTGTCGCTGCAACAT CCTTCACTGTTTTATACCGTGGTT GAACAATCTTCGGTGGCGAGCGT GTTGAGTCATCCTGACTAGCTGA GATGAGGGCTCGCCCCCTCGTCC CGACACTTCCAGATCGCCATAGC GCACAGCGCCTCGAGCGGTGGT AACGGCGCAGTGGCGGTTTTTCAT GGCTTGTTATGACTGTTTTTTTGG GGTACAGTCTATGCCTCGGGCAT CCAAGCAGCAAGCGCGTTACGC CGTGGGTGATGTTTGTATGTTAT GGAGCAGCAACGATGTTACGCA GCAGGGCAGTCGCCCTAAAACA AAGTTAAACATCATGAGGGAAG CGGTGATCGCCGAAGTATCGACT CAACTATCAGAGGTAGTTGGCGT CATCGAGCGCCATCTCGAACCGA

TT	Tham chiếu đầu tiên	Tên hiện hành	Tên thông dụng	Dòng	Mô tả ADN gây đột biến	Kiểu gen	Đột biến gen 1
					được cài xen vào.		CGTTGCTGGCCGTACATTTGTAC GGCTCCGCAGTGGATGGCGGCCT GAAGCCACACAGTGATATTGATT TGCTGGTTACGGTGACCGTAAGG CTTGATGAAACAACGCGGCGAG CTTTGATCAACGACCTTTTGAA ACTTCGGCTTCCCCTGGAGAGAG CGAGATTCTCCGCGCTGTAGAAG TCACCATTGTTGTGCACGACGAC ATCATTCCGTGGCGTTATCCAGC TAAGCGCGAACTGCAATTTGGA GAATGGCAGCGCAATGACATTCT TGCAGGTATCTTCGAGCCAGCCA CGATCGACATTGATCTGGCTATC TTGCTGACAAAAGCAAGAGAAC ATAGCGTTGCCCTTGGTAGGTCCA GCGGCGGAGGAACTCTTTGATCC GGTTCCTGAACAGGATCTATTTG AGGCGCTAAATGAAACCTTAAC GCTATGGAACTCGCCGCCCGACT GGGCTGGCGATGAGCGAAATGT AGTGCTTACGTTGTCCCGATTT GGTACAGCGCAGTAACCGGCAA AATCGCGCCGAAGGATGTCGCT GCCGACTGGGCAATGGAGCGCC TGCCGGCCCAGTATCAGCCCGTC ATACTTGAAGCTAGACAGGCTTA TCTTGGACAAGAAGAAGATCGC TTGGCCTCGCGCGCAGATCAGTT GGAAGAATTTGTCCACTACGTGA AAGGCGAGATCACCAAGGTAGT CGGCAAATAATGTCTAACAATTC GTTCAAGCCGACGCCGCTTCGCG GCGCGGCTTAACTCAAGCGTTAG ATGCACTAAGCACATAATTGCTC ACAGCCAACTATCAGGTCAAG TCTGCTTTTATTATTTTAAAGCGT GCATAATAAGCCCTACACAAAT GGTACCCGACCGGTGGTGAATTT AATCTCGCTGACGTGTAGACATT CCCTTATCCAGACGCTGATCGCC CATCATCGCGGTTCTTTAGATCT CTCGGTCCGCCCTGATGGCGGCA CCTTGCTGACGTTACGCCTGCCG GTACAGCAGGTTATCACCGGAG GCTTAAATGA
43	Fig.16B	Chủng 5	CI008	Chủng phân lập từ giống <i>Burkholderia</i>	Không có	WT	
44	Fig.16B	Chủng 1	CM011	Thế đột biến của CI019	Phá vỡ gen <i>nifL</i> bằng cat-xet biểu hiện	$\Delta nifL::S_{pecR}$	ATGAGCATCACGGCGTTATCAGC ATCATTTCTGAGGGGAATATCG CCAGCCGCTTGTGCTGCAACAT CCTTCACTGTTTTATACCGTGGTT GAACAATCTTCGGTGGCGAGCGT GTTGAGTCATCTGACTAGCTGA GATGAGGGCTCGCCCCCTCGTCC

TT	Tham chiếu đầu tiên	Tên hiện hành	Tên thông dụng	Dòng	Mô tả ADN gây đột biến	Kiểu gen	Đột biến gen 1
					kháng spectin omyxin (SpecR) mã hóa gen strepto myxin 3''-O- adenyly ltransfe raza aadA được cài xen vào.		CGACACTTCCAGATCGCCATAGC GCACAGCGCCTCGAGCGGTGGT AACGGCGCAGTGGCGGTTTTTCAT GGCTTGTTATGACTGTTTTTTTGG GGTACAGTCTATGCCTCGGGCAT CCAAGCAGCAAGCGCGTTACGC CGTGGGTCGATGTTTGATGTTAT GGAGCAGCAACGATGTTACGCA GCAGGGCAGTCGCCCTAAAACA AAGTTAAACATCATGAGGGAAG CGGTGATCGCCGAAGTATCGACT CAACTATCAGAGGTAGTTGGCGT CATCGAGCGCCATCTCGAACCGA CGTTGCTGGCCGTACATTTGTAC GGCTCCGCAGTGGATGGCGGCCT GAAGCCACACAGTGATATTGATT TGCTGGTTACGGTGACCGTAAGG CTTGATGAAACAACGCGGCGAG CTTTGATCAACGACCTTTTGGA ACTTCGGCTTCCCCTGGAGAGAG CGAGATTCTCCGCGCTGTAGAAG TCACCATTGTTGTGCACGACGAC ATCATTCCGTGGCGTTATCCAGC TAAGCGCGAACTGCAATTTGGA GAATGGCAGCGCAATGACATTCT TGCAGGTATCTTCGAGCCAGCCA CGATCGACATTGATCTGGCTATC TTGCTGACAAAAGCAAGAGAAC ATAGCGTTGCCTTGGTAGGTCCA GCGGCGGAGGAACTCTTTGATCC GGTTCTGAACAGGATCTATTTG AGGCGCTAAATGAAACCTTAAC GCTATGGAACTCGCCGCCCGACT GGGCTGGCGATGAGCGAAATGT AGTGCTTACGTTGTCCCGCATTT GGTACAGCGCAGTAACCGGCAA AATCGCGCCGAAGGATGTCGCT GCCGACTGGGCAATGGAGCGCC TGCCGGCCCAGTATCAGCCCGTC ATACTTGAAGCTAGACAGGCTTA TCTTGGACAAGAAGAAGATCGC TTGGCCTCGCGCGCAGATCAGTT GGAAGAATTTGTCCACTACGTGA AAGGCGAGATCACCAAGGTAGT CGGCAAATAATGTCTAACAATTC GTTCAAGCCGACGCCGCTTCGCG GCGCGGCTTAACTCAAGCGTTAG ATGCACTAAGCACATAATTGCTC ACAGCCAACTATCAGGTCAAG TCTGCTTTTATTATTTTAAGCGT GCATAATAAGCCCTACACAAAT GGTACCCGACCGGTGGTGAATTT AATCTCGCTGACGTGTAGACATT CCCTTATCCAGACGCTGATCGCC CATCATCGCGGTTCTTTAGATCT CTCGGTCCGCCCTGATGGCGGCA

TT	Tham chiếu đầu tiên	Tên hiện hành	Tên thông dụng	Dòng	Mô tả ADN gây đột biến	Kiểu gen	Đột biến gen 1
							CCTTGCTGACGTTACGCCTGCCG GTACAGCAGGTTATCACCGGAG GCTTAAAATGA

Bảng các chủng (tiếp theo)

Thứ tự	Tham chiếu đầu tiên	Tên hiện hành	Tên thông dụng	Dòng	Mô tả ADN gây đột biến	Kiểu gen	Đột biến gen 2
34	Fig.4 D	Tiến hóa	CM0 29	Thẻ đột biến của CI006	Phá vỡ gen nifL bằng mảnh của vùng nằm trước gen ompX được cài xen vào (Prm5) và làm khuyết 1287 cặp bazơ sau codon khởi đầu	Δ nifL:: Prm5 Δ glnE-AR_K O1	ATGTTTAACGATCTGATTGGCGATGA TGAAACGGATTTCGCCGAAGATGCG CTTCTGAGAGCTGGCGCAATTGTG GCAGGATGCGTTGCAGGAGGAGGAT TCCACGCCCCGTGCTGGCGCATCTCTC AGAGGACGATCGCCGCCGCGTGGTG GCGCTGATTGCCGATTTTCGCAAAG AGTTGGATAAACGCACCATTGGCCC GCGAGGGCGGCAGGTA CTGATCAC TTAATGCCGCATCTGCTCAGCGATGT ATGCTCGCGCGACGATGCGCCAGTA CCGCTGTCACGCCTGACGCCGCTGCT CACCGGAATTATTACCCGCACCACTT ACCTTGAGCTGCTAAGTGAATTTCCC GGCGCACTGAAACACCTCATTTCCCT GTGTGCCGCGTCGCCGATGGTTGCC AGTCAGCTGGCGCGCTACCCGATCC TGCTTGATGAATTGCTCGACCCGAAT ACGCTCTATCAACCGACGGCGATGA ATGCCTATCGCGATGAGCTGCGCCA ATACCTGCTGCGCGTGCCGGAAGAT GATGAAGAGCAACAGCTTGAGGCGC TGCGGCAGTTTAAGCAGGCGCAGTT GCTGCGCGTGGCGGCGGCGGATATT GCCGGTACGTTGCCAGTAATGAAAG TGAGCGATCACTTAACCTGGCTGGC

					của gen glnE chứa miền loại bỏ adenyl yl của gluta mat- amoni ac- ligaza adenyl yltrans feraza (Δgln E- AR_K O1).	GGAAGCGATTATTGATGCGGTGGTG CAGCAAGCCTGGGGGCAGATGGTGG CGCGTTATGGCCAGCCAACGCATCT GCACGATCGCGAAGGGCGCGGTTTT GCGGTGGTCGGTTATGGCAAGCTGG GCGGCTGGGAGCTGGGTACAGCTC CGATCTGGATCTGGTATTCCTGCACG ACTGCCCCGATGGATGTGATGACCGA TGGCGAGCGTGAAATCGATGGTCGC CAGTTCTATTTGCGTCTCGCGCAGCG CGTGATGCACCTGTTTAGCACGCGC ACGTCGTCCGGCATCCTTTATGAAGT TGATGCGCGTCTGCGTCCATCTGGCG CTGCGGGGATGCTGGTCACTACTAC GGAATCGTTCGCCGATTACCAGCAA AACGAAGCCTGGACGTGGGAACATC AGGCGCTGGCCCGTGCGCGCGTGGT GTACGGCGATCCGCAACTGACCGCC GAATTTGACGCCATTCGCCGCGATAT TCTGATGACGCCTCGCGACGGCGCA ACGCTGCAAACCGACGTGCGAGAAA TGCGCGAGAAAATGCGTGCCCATCT TGGCAACAAGCATAAAGACCGCTTC GATCTGAAAGCCGATGAAGGCGGTA TCACCGACATCGAGTTTATCGCCCCA TATCTGGTGCTGCGCTTTGCCCATGA CAAGCCGAAACTGACGCGCTGGTCG GATAATGTGCGCATCTCGAAGGGC TGGCGCAAAACGGCATCATGGAGGA GCAGGAAGCGCAGGCATTGACGCTG GCGTACACCACATTGCGTGATGAGC TGCACCACCTGGCGCTGCAAGAGTT GCCGGGACATGTGGCGCTCTCCTGTT TTGTCGCCGAGCGTGCGCTTATTA ACCAGCTGGGACAAGTGGCTGGTGG AACCGTGCGCCCCGGCGTAA
--	--	--	--	--	--	---

Cho dù có các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo, bản mô tả nêu ở đây còn được xác định theo các khoản dưới đây:

1. Phương pháp sản xuất một hoặc nhiều vi khuẩn, bao gồm các bước:
 - (a) phân lập vi khuẩn từ mô hoặc đất của cây thứ nhất;
 - (b) đưa biến dị di truyền vào một hoặc nhiều vi khuẩn này để tạo ra một hoặc nhiều vi khuẩn biến thể;
 - (c) phơi nhiễm nhiều cây với vi khuẩn biến thể;
 - (d) phân lập vi khuẩn từ mô hoặc đất của một trong số các cây này, trong đó cây mà vi khuẩn được phân lập từ đó có tính trạng được cải thiện so với các cây còn lại trong số các cây đó; và
 - (e) lặp lại các bước từ (b) đến (d) với các vi khuẩn được phân lập ở bước (d).
2. Phương pháp theo khoản 1, trong đó tính trạng được cải thiện là khả năng cố định nitơ được tăng cường ở cây mà vi khuẩn được phân lập từ đó.
3. Phương pháp theo khoản 1, trong đó biến dị di truyền là sự biến đổi ở gen được chọn từ nhóm gồm: nifA, nifL, ntrB, ntrC, glnA, glnB, glnK, draT, amtB, glnD, glnE, nifJ, nifH, nifD, nifK, nifY, nifE, nifN, nifU, nifS, nifV, nifW, nifZ, nifM, nifF, nifB, và nifQ.
4. Phương pháp theo khoản 1, trong đó biến dị di truyền là sự biến đổi ở gen mã hóa protein có nhóm chức được chọn từ nhóm gồm: glutamin synthetaza, glutaminaza, glutamin synthetaza adenylyltransferaza, chất hoạt hóa phiên mã, chất chống hoạt hóa phiên mã, pyruvat flavodoxin oxidoreductaza, flavodoxin, hoặc NAD⁺-dinitơ-reductaza ADP-D-ribosyltransferaza.
5. Phương pháp theo khoản 1, trong đó biến dị di truyền là đột biến dẫn đến một hoặc nhiều đặc tính trong số: tăng biểu hiện hoặc hoạt tính của NifA hoặc glutaminaza; giảm biểu hiện hoặc hoạt tính của NifL, NtrB, glutamin synthetaza, GlnB, GlnK, DraT, AmtB; giảm hoạt tính loại bỏ adenylyl của GlnE; hoặc giảm hoạt tính loại bỏ uridylyl của GlnD.

6. Phương pháp theo khoản 1, trong đó biến dị di truyền là đột biến bất hoạt gen.
7. Phương pháp theo khoản 1, trong đó biến dị di truyền dẫn đến loại bỏ hoặc làm mất hoạt tính của miền protein.
8. Phương pháp theo khoản 1, trong đó biến dị di truyền làm biến đổi hoặc làm mất trình tự điều hoà của gen đích.
9. Phương pháp theo khoản 1, trong đó biến dị di truyền bao gồm cải biến cài xen trình tự điều hoà khác loài.
10. Phương pháp theo khoản 1, trong đó biến dị di truyền bao gồm cải biến cài xen trình tự điều hoà tìm thấy trong hệ gen của loài hoặc giống vi khuẩn tương ứng với vi khuẩn mà biến dị di truyền được đưa vào.
11. Phương pháp theo khoản 10, trong đó trình tự điều hoà được chọn dựa trên mức biểu hiện của gen trong giống cây vi khuẩn hoặc trong mô cây.
12. Phương pháp theo khoản 1, trong đó biến dị di truyền được tạo ra bằng cách gây đột biến hóa học.
13. Phương pháp theo khoản 1, trong đó bước (c) còn bao gồm việc phơi nhiễm các cây với các tác nhân gây stress sinh học hoặc phi sinh học.
14. Phương pháp theo khoản 2, trong đó các vi khuẩn được phân lập sau khi lặp lại các bước từ (b) đến (d) một hoặc nhiều lần sản sinh nitor ở mức 1% hoặc nhiều hơn ở cây thứ hai cùng loại với cây thứ nhất.
15. Phương pháp theo khoản 2, trong đó các vi khuẩn được phân lập sau khi lặp lại các bước từ (b) đến (d) một hoặc nhiều lần độ cố định nitor tăng lên ít nhất 2 lần so với các vi khuẩn được phân lập từ cây thứ nhất.
16. Phương pháp theo khoản 14, trong đó cây thứ hai được trồng với sự có mặt của phân bón có bổ sung glutamin, amoniac, hoặc nguồn hóa chất nitor khác.
17. Phương pháp theo khoản 1, trong đó cây thứ nhất là cây trồng nông nghiệp.

18. Phương pháp theo khoản 17, trong đó cây trồng nông nghiệp được chọn từ cây lúa mạch, cây lúa gạo, cây ngô, cây lúa mỳ, cây lúa miến, cây ngô ngọt, cây mía, cây hành, cây cà chua, cây dâu tây, hoặc cây măng tây.

19. Phương pháp theo khoản 1, trong đó cây thứ nhất hoặc các cây trong số nhiều cây là cây mô hình.

20. Phương pháp theo khoản 19, trong đó cây mô hình được chọn từ *Setaria*, *Brachypodium*, hoặc *Arabidopsis*.

21. Phương pháp theo khoản 1, trong đó biến dị di truyền là biến dị di truyền định trước được đưa một cách đặc hiệu vào vị trí đích.

22. Phương pháp theo khoản 1, trong đó biến dị di truyền là đột biến ngẫu nhiên trong phạm vi vị trí đích.

23. Phương pháp theo khoản 1, trong đó bước (a) còn bao gồm việc tiến hành phân tích di truyền vi khuẩn đã phân lập.

24. Phương pháp theo khoản 1, trong đó bước (b) còn bao gồm việc đưa áp lực chọn lọc vào để làm giàu các vi khuẩn chứa biến dị di truyền.

25. Phương pháp theo khoản 24, trong đó áp lực chọn lọc bao gồm việc phân cắt các hệ gen thiếu biến dị di truyền đã được đưa vào vị trí đích, trong đó việc phân cắt diễn ra ở phạm vi 100 nucleotit của vị trí đích.

26. Phương pháp theo khoản 24, phương pháp này còn bao gồm bước phân lập vi khuẩn còn sống sau áp lực chọn lọc.

27. Phương pháp theo khoản 25, trong đó việc phân cắt được định hướng bằng nucleaza đặc hiệu vị trí được chọn từ nhóm gồm nucleaza ngón tay kềm, nucleaza CRISPR, nucleaza TALE, hoặc meganucleaza.

28. Phương pháp theo khoản 27, trong đó nucleaza đặc hiệu vị trí là nucleaza CRISPR.

29. Phương pháp theo khoản 1, trong đó biến dị di truyền là cải biến cài xen hoặc làm khuyết một hoặc nhiều nucleotit.

30. Phương pháp theo khoản 1, trong đó các vi khuẩn được phân lập sau khi lặp lại các bước từ (b) đến (d) một hoặc nhiều lần sống nội sinh, biểu sinh, hoặc sống trong bầu rễ.

31. Phương pháp theo khoản 1, trong đó các vi khuẩn được phân lập sau khi lặp lại các bước từ (b) đến (d) một hoặc nhiều lần bao gồm nhiều taxon vi khuẩn khác nhau.

32. Phương pháp theo khoản 1, trong đó vi khuẩn được phân lập từ mô cây.

33. Phương pháp theo khoản 1, trong đó công đoạn phân lập vi khuẩn ở bước (a) bao gồm việc phân lập vi khuẩn từ hạt của cây thứ nhất.

34. Phương pháp tăng độ cố định nitơ ở cây, bao gồm bước phơi nhiễm cây này với các vi khuẩn chứa một hoặc nhiều biến dị di truyền đã được đưa vào một hoặc nhiều gen điều hoà sự cố định nitơ, trong đó vi khuẩn này sản sinh nitơ ở mức 1% hoặc cao hơn ở cây này.

35. Phương pháp theo khoản 34, trong đó vi khuẩn này sản sinh nitơ ở mức 5% hoặc cao hơn ở cây này.

36. Phương pháp theo khoản 34, trong đó vi khuẩn này sản sinh nitơ ở mức 10% hoặc cao hơn ở cây này.

37. Phương pháp theo khoản 34, trong đó vi khuẩn này sản sinh nitơ khi có mặt phân bón có bổ sung glutamin, amoniac, hoặc nguồn hóa chất nitơ bổ sung khác.

38. Phương pháp theo khoản 34, trong đó biến dị di truyền là sự biến đổi ở gen được chọn từ nhóm gồm: *nifA*, *nifL*, *ntrB*, *ntrC*, glutamin synthetaza, *glnA*, *glnB*, *glnK*, *draT*, *amtB*, glutaminaza, *glnD*, *glnE*, *nifJ*, *nifH*, *nifD*, *nifK*, *nifY*, *nifE*, *nifN*, *nifU*, *nifS*, *nifV*, *nifW*, *nifZ*, *nifM*, *nifF*, *nifB*, và *nifQ*.

39. Phương pháp theo khoản 34, trong đó biến dị di truyền là đột biến dẫn đến một hoặc nhiều đặc tính trong số: tăng biểu hiện hoặc hoạt tính của *nifA* hoặc glutaminaza; giảm biểu hiện hoặc hoạt tính của *nifL*, *ntrB*, glutamin synthetaza, *glnB*, *glnK*, *draT*, *amtB*; giảm hoạt tính loại bỏ adenylyl của *GlnE*; hoặc giảm hoạt tính loại bỏ uridylyl của *GlnD*.

40. Phương pháp theo khoản 34, trong đó biến dị di truyền (a) là đột biến bất hoạt gen; (b) làm biến đổi hoặc làm mất trình tự điều hoà của gen đích; hoặc (c) bao gồm cải biến cải xen trình tự điều hoà khác loài.

41. Phương pháp theo khoản 34, trong đó vi khuẩn này thuộc giống *Enterobacter*.

42. Phương pháp theo khoản 34, trong đó vi khuẩn này thuộc giống *Rahnella*.

43. Phương pháp theo khoản 34, trong đó vi khuẩn này sống nội sinh, biểu sinh, hoặc sống trong bầu rễ.

44. Phương pháp theo khoản 34, trong đó vi khuẩn này bao gồm nhiều taxon vi khuẩn khác nhau.

45. Phương pháp theo khoản 34, trong đó cây là cây trồng nông nghiệp.

46. Phương pháp theo khoản bất kỳ trong số các khoản từ 34 đến 45, trong đó cây này là cây không phải họ đậu.

47. Phương pháp theo khoản 45, trong đó cây trồng nông nghiệp được chọn từ cây lúa miến, cây cải dầu, cây cà chua, cây dâu tây, cây lúa mạch, cây lúa gạo, cây ngô, và cây lúa mỳ.

48. Phương pháp theo khoản 45, trong đó cây này là sinh vật biến đổi gen (GMO).

49. Phương pháp theo khoản 45, trong đó cây này không phải là sinh vật biến đổi gen (GMO).

50. Phương pháp theo khoản 45, trong đó cây này đã được thiết kế di truyền hoặc nhân giống để sử dụng nitơ hiệu quả.

51. Quần thể vi khuẩn bao gồm các vi khuẩn chứa một hoặc nhiều biến dị di truyền đã được đưa vào một hoặc nhiều gen điều hoà quá trình cố định nitơ, trong đó vi khuẩn này sản sinh nitơ ở mức 1% hoặc cao hơn ở cây được trồng cùng với sự có mặt của quần thể vi khuẩn này.

52. Quần thể vi khuẩn theo khoản 51, trong đó vi khuẩn sản sinh nitơ khi có mặt phân bón có bổ sung glutamin, amoniac, hoặc nguồn hóa chất nitơ bổ sung khác.

53. Quần thể vi khuẩn theo khoản 51, trong đó biến dị di truyền là sự biến đổi ở gen được chọn từ nhóm gồm: *nifA*, *nifL*, *ntrB*, *ntrC*, glutamin synthetaza, *glnA*, *glnB*, *glnK*, *draT*, *amtB*, glutaminaza, *glnD*, *glnE*, *nifJ*, *nifH*, *nifD*, *nifK*, *nifY*, *nifE*, *nifN*, *nifU*, *nifS*, *nifV*, *nifW*, *nifZ*, *nifM*, *nifF*, *nifB*, và *nifQ*.

54. Quần thể vi khuẩn theo khoản 51, trong đó biến dị di truyền là đột biến dẫn đến một hoặc nhiều đặc tính trong số: biểu hiện tăng của *nifA* hoặc glutaminaza; biểu hiện giảm của *nifL*, *ntrB*, glutamin synthetaza, *glnB*, *glnK*, *draT*, *amtB*; hoạt tính loại bỏ adenylyl giảm của *GlnE*; hoặc hoạt tính loại bỏ uridylyl giảm của *GlnD*.

55. Quần thể vi khuẩn theo khoản 51, trong đó biến dị di truyền (a) là đột biến bất hoạt gen; (b) làm biến đổi hoặc làm mất trình tự điều hoà của gen đích; hoặc (c) bao gồm cả biến cải xen trình tự điều hoà khác loài.

56. Quần thể vi khuẩn theo khoản 51, trong đó vi khuẩn này là *Enterobacter*.

57. Quần thể vi khuẩn theo khoản 51, trong đó vi khuẩn này là *Rahnella*.

58. Quần thể vi khuẩn theo khoản 51, trong đó vi khuẩn này sống nội sinh, biểu sinh, hoặc sống trong bầu rễ.

59. Quần thể vi khuẩn theo khoản 51, trong đó các vi khuẩn bao gồm nhiều taxon vi khuẩn khác nhau.

60. Chế phẩm chứa quần thể vi khuẩn theo khoản bất kỳ trong số các khoản từ 51 đến 59.

61. Chế phẩm theo khoản 60, trong đó chế phẩm này chứa quần thể vi khuẩn được phủ lên bề mặt hạt.

62. Chế phẩm theo khoản 60, trong đó chế phẩm này được phối trộn dưới dạng lỏng hoặc dạng bột.

63. Vi khuẩn có số nộp lưu ATCC PTA-122293 hoặc PTA-122294.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Sinh vật cố định nitơ không liên giống đã được xử lý kỹ thuật có hoạt tính cố định nitơ tăng so với sinh vật chưa cải biến thuộc cùng loài với sinh vật cố định nitơ không liên giống đã được xử lý kỹ thuật nêu trên, trong đó sinh vật cố định nitơ không liên giống đã được xử lý kỹ thuật nêu trên chứa biến dị di truyền ở một hoặc nhiều gen để điều hòa sự cố định hoặc đồng hóa nitơ, biến dị di truyền này bao gồm vật liệu di truyền có nguồn gốc từ ít nhất một sinh vật thuộc cùng loài với sinh vật cố định nitơ không liên giống đã được xử lý kỹ thuật nêu trên.
2. Sinh vật cố định nitơ không liên giống đã được xử lý kỹ thuật theo điểm 1, trong đó sinh vật cố định nitơ không liên giống đã được xử lý kỹ thuật này là vi khuẩn được xử lý kỹ thuật.
3. Sinh vật cố định nitơ không liên giống đã được xử lý kỹ thuật theo điểm 1, trong đó biến dị di truyền là nằm trong gen trong con đường điều hòa di truyền cố định nitơ.
4. Sinh vật cố định nitơ không liên giống đã được xử lý kỹ thuật theo điểm 3, trong đó biến dị di truyền trong một hoặc nhiều gen để điều hòa sự cố định hoặc đồng hóa nitơ làm thay đổi hoạt tính hoặc sự biểu hiện của gen được chọn từ nhóm bao gồm NifA, NifL và NifH.
5. Sinh vật cố định nitơ không liên giống đã được xử lý kỹ thuật theo điểm 1, trong đó biến dị di truyền là nằm trong gen trong con đường điều hòa di truyền đồng hóa nitơ.
6. Sinh vật cố định nitơ không liên giống đã được xử lý kỹ thuật theo điểm 5, trong đó biến dị di truyền trong một hoặc nhiều gen để điều hòa sự cố định hoặc đồng hóa nitơ làm thay đổi hoạt tính hoặc sự biểu hiện của gen được chọn từ nhóm bao gồm GlnE, AmtB, ntrB, ntrC, polynucleotit mã hóa glutamin synthetaza, glnA, glnB, glnK, draT, polynucleotit mã hóa glutaminaza và glnD.
7. Sinh vật cố định nitơ không liên giống đã được xử lý kỹ thuật theo điểm 1, trong đó vật liệu di truyền bao gồm phân tử điều hòa.
8. Sinh vật cố định nitơ không liên giống đã được xử lý kỹ thuật theo điểm 7, trong đó phân tử điều hòa là phân tử điều hòa khác loài.

9. Sinh vật cố định nitơ không liên giống đã được xử lý kỹ thuật theo điểm 7, trong đó phần tử điều hòa là trình tự khởi đầu.

10. Sinh vật cố định nitơ không liên giống đã được xử lý kỹ thuật theo điểm 1, trong đó sinh vật cố định nitơ không liên giống đã được xử lý kỹ thuật này có hoạt tính cố định nitơ tăng khi có mặt nitơ đã cố định với nồng độ ít nhất là 0,01 mM, so với sinh vật cố định nitơ chưa cải biến thuộc cùng loài, khi có mặt nitơ đã cố định với cùng nồng độ.

11. Sinh vật cố định nitơ không liên giống đã được xử lý kỹ thuật theo điểm 1, trong đó sinh vật cố định nitơ không liên giống đã được xử lý kỹ thuật này có hoạt tính cố định nitơ tăng KHI có mặt nitơ đã cố định với nồng độ ít nhất là 0,1 mM, so với sinh vật cố định nitơ chưa cải biến thuộc cùng loài, khi có mặt nitơ đã cố định với cùng nồng độ.

12. Sinh vật cố định nitơ không liên giống đã được xử lý kỹ thuật theo điểm 1, trong đó sinh vật cố định nitơ không liên giống đã được xử lý kỹ thuật này có hoạt tính cố định nitơ tăng khi có mặt nitơ đã cố định với nồng độ ít nhất là 0,5 mM, so với sinh vật cố định nitơ chưa cải biến thuộc cùng loài, khi có mặt nitơ đã cố định với cùng nồng độ.

13. Sinh vật cố định nitơ không liên giống đã được xử lý kỹ thuật theo điểm 1, trong đó sinh vật cố định nitơ không liên giống đã được xử lý kỹ thuật này có hoạt tính cố định nitơ tăng trong thực địa, so với sinh vật cố định nitơ chưa cải biến thuộc cùng loài, trong cùng thực địa đó.

14. Sinh vật cố định nitơ không liên giống đã được xử lý kỹ thuật theo điểm 13, trong đó thực địa nêu trên có nồng độ nitơ đã cố định ít nhất là 0,01mM.

15. Sinh vật cố định nitơ không liên giống đã được xử lý kỹ thuật theo điểm 13, trong đó thực địa nêu trên có nồng độ nitơ đã cố định ít nhất là 0,1mM.

16. Sinh vật cố định nitơ không liên giống đã được xử lý kỹ thuật theo điểm 13, trong đó thực địa nêu trên có nồng độ nitơ đã cố định ít nhất là 0,5mM.

17. Sinh vật cố định nitơ không liên giống đã được xử lý kỹ thuật theo điểm 1, trong đó sinh vật cố định nitơ không liên giống đã được xử lý kỹ thuật này là sinh vật biểu

sinh.

18. Sinh vật cố định nitơ không liên giống đã được xử lý kỹ thuật theo điểm 1, trong đó sinh vật cố định nitơ không liên giống đã được xử lý kỹ thuật này là sinh vật nội sinh.

19. Sinh vật cố định nitơ không liên giống đã được xử lý kỹ thuật theo điểm 1, trong đó sinh vật cố định nitơ không liên giống đã được xử lý kỹ thuật này là sinh vật sống trong bầu rễ.

20. Sinh vật cố định nitơ không liên giống đã được xử lý kỹ thuật theo điểm 1, trong đó vật liệu di truyền của sinh vật cố định nitơ không liên giống đã được xử lý kỹ thuật nêu trên về cơ bản bao gồm vật liệu di truyền có nguồn gốc từ ít nhất một sinh vật thuộc cùng loài với sinh vật cố định nitơ không liên giống đã được xử lý kỹ thuật này.

21. Chế phẩm chứa sinh vật cố định nitơ không liên giống đã được xử lý kỹ thuật theo điểm 1 và hạt giống.

22. Chế phẩm theo điểm 21, trong đó hạt giống là hạt giống của cây không phải họ đậu.

23. Chế phẩm theo điểm 21, trong đó hạt giống là hạt giống cây ngũ cốc.

24. Chế phẩm theo điểm 21, trong đó hạt giống là hạt giống của cây được chọn từ nhóm bao gồm: cây ngô, cây lúa mì và cây lúa miến.

25. Chế phẩm theo điểm 21, trong đó sinh vật cố định nitơ không liên giống đã được xử lý kỹ thuật được phủ lên hạt giống.

26. Chế phẩm theo điểm 25, trong đó sinh vật cố định nitơ không liên giống đã được xử lý kỹ thuật nằm trong lớp phủ hạt mà được phủ lên trên hạt giống.

27. Sinh vật cố định nitơ không liên giống đã được xử lý kỹ thuật theo điểm 1, trong đó một hoặc nhiều gen điều hòa sự cố định hoặc đồng hóa nitơ được chọn từ nhóm bao gồm nifA, nifL, ntrB, ntrC, glnA, glnB, glnK, draT, amtB, glnD, glnE, nifH, nifJ, nifD, nifK, nifY, nifE, nifN, nifU, nifS, nifV, nifW, nifZ, nifM, nifF, nifB và nifQ.

28. Sinh vật cố định nitơ không liên giống đã được xử lý kỹ thuật theo điểm 1, trong đó biến dị di truyền trong một hoặc nhiều gen để điều hòa sự cố định hoặc đồng hóa nitơ dẫn đến một hoặc nhiều đặc tính trong số tăng biểu hiện hoặc hoạt tính của NifA

hoặc glutaminaza; giảm biểu hiện hoặc hoạt tính của NifL, NtrB, glutamin synthetaza, GlnB, GlnK, DraT, hoặc AmtB; giảm hoạt tính loại bỏ adenylyl của GlnE; hoặc giảm hoạt tính loại bỏ uridylyl của GlnD.

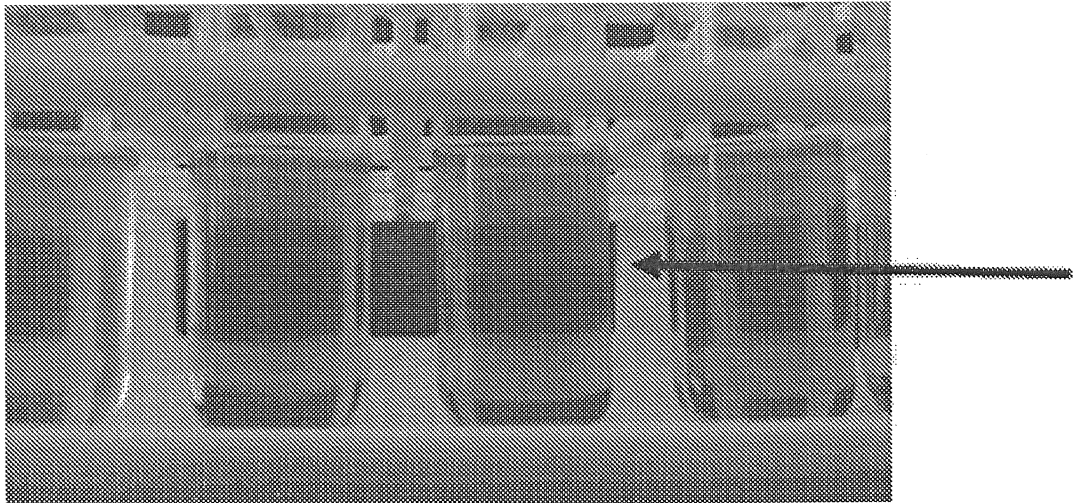
29. Sinh vật cố định nitơ không liên giống đã được xử lý kỹ thuật theo điểm 1, trong đó sinh vật cố định nitơ này là vi khuẩn proteobacteria.

32716

1/17
FIG. 1A



FIG. 1B



2/17

FIG. 2

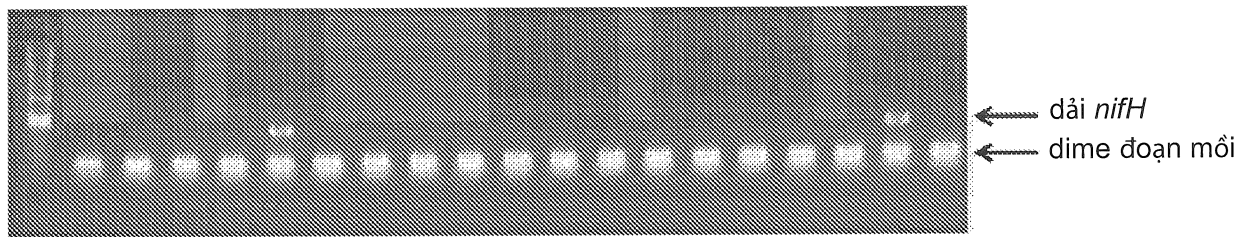
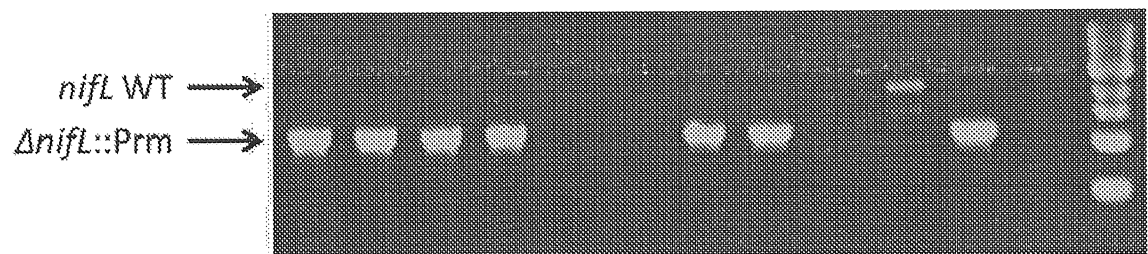


FIG. 3



3/17

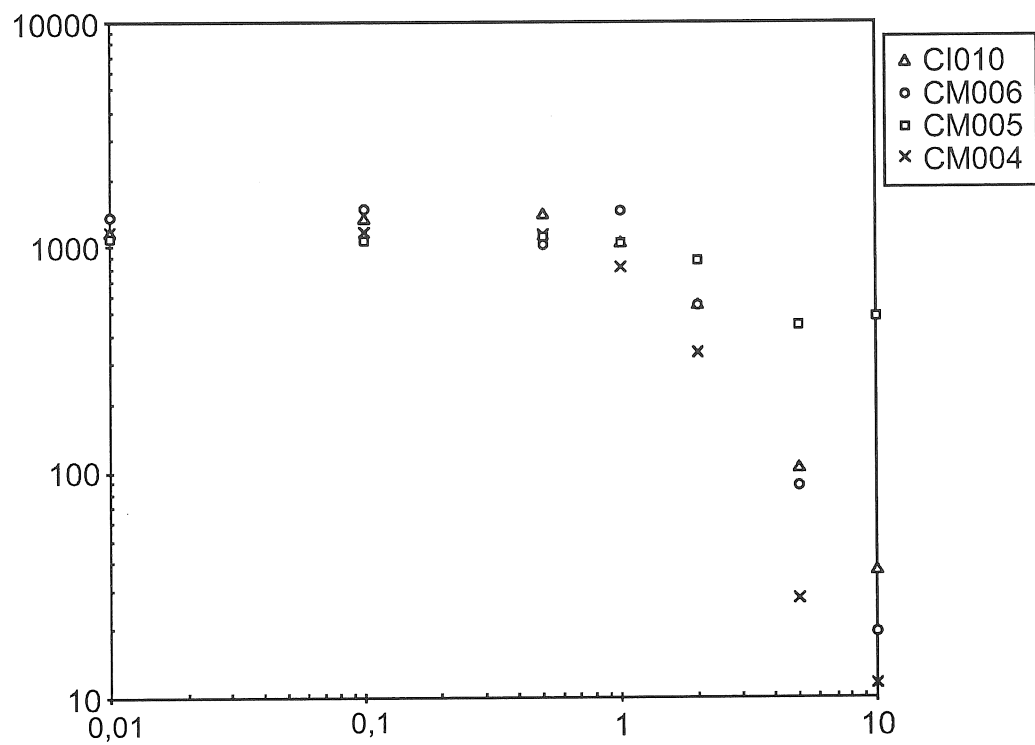


FIG. 4A

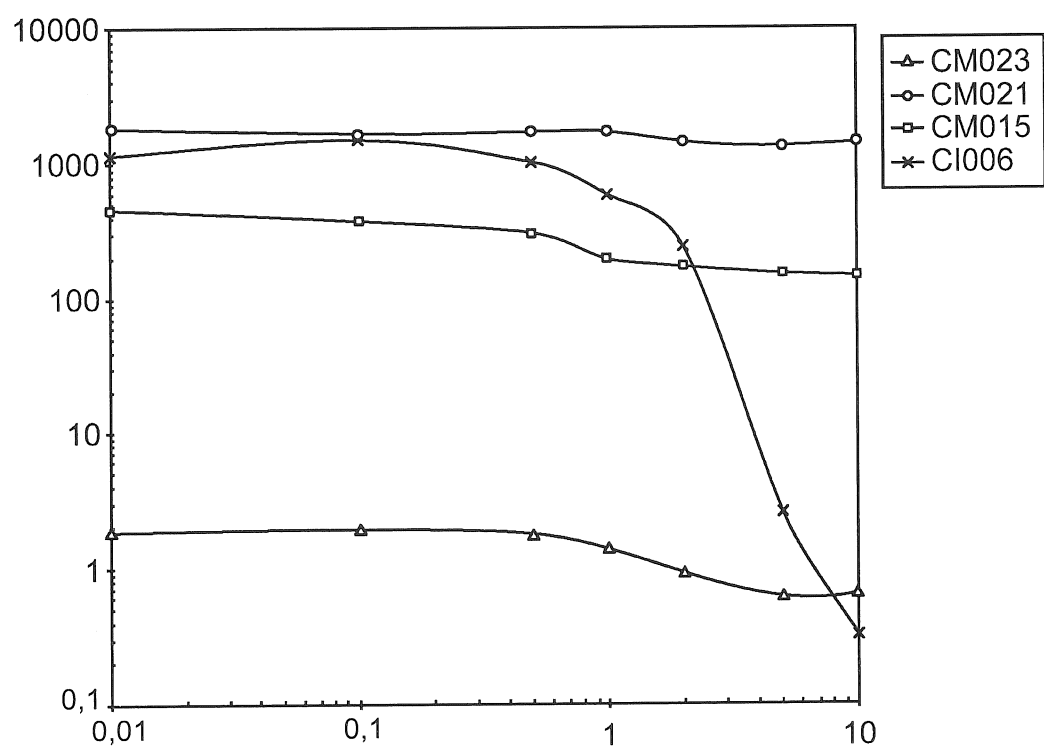


FIG. 4B

Hoạt tính ARA khi có mặt 10mM Glutamin

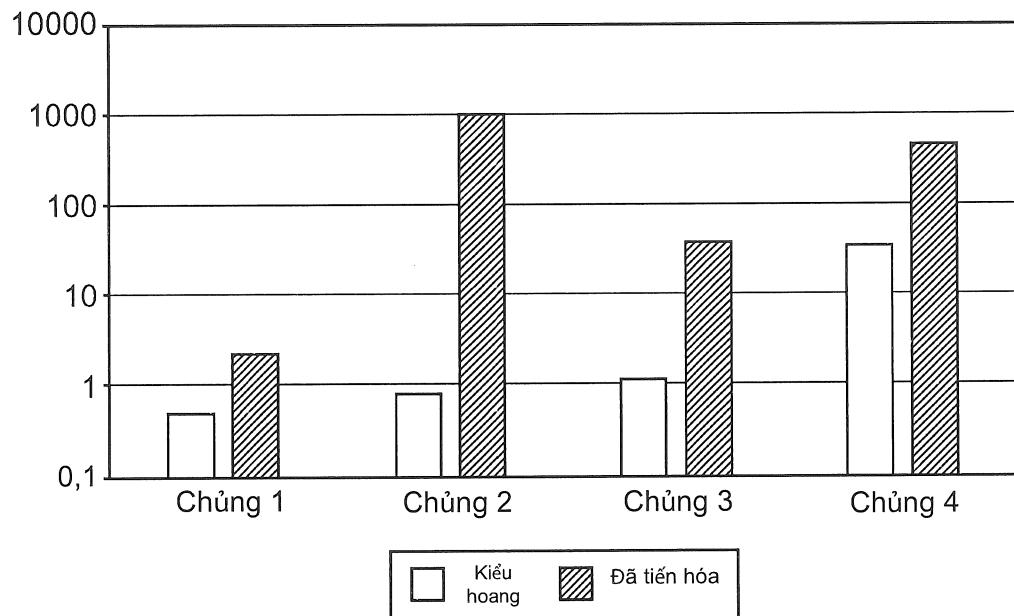


FIG. 4C

Profin bài tiết amoni

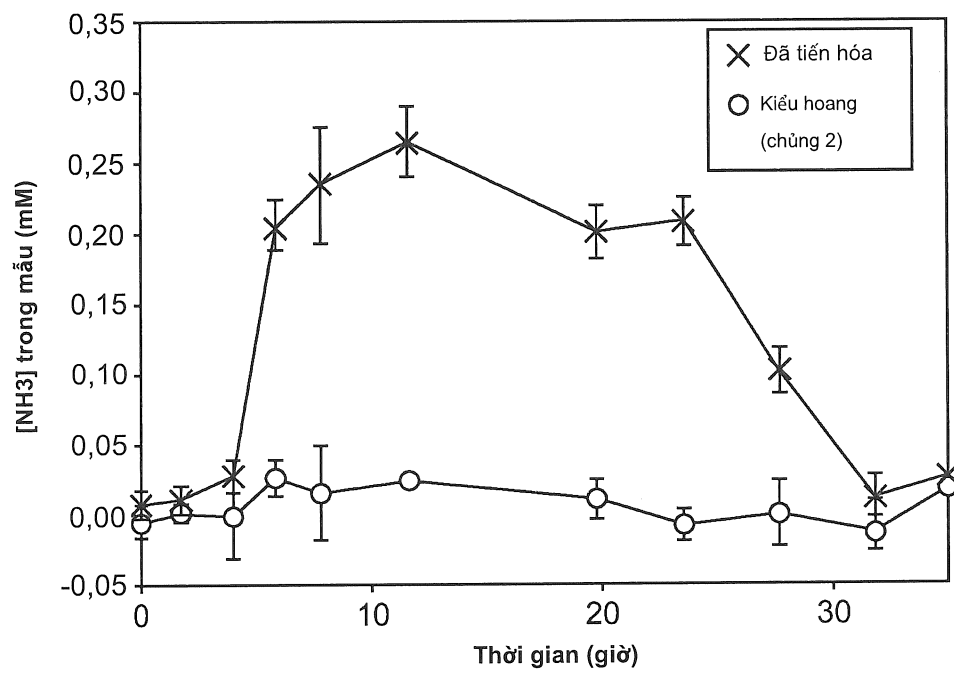


FIG. 4D

	Không glutamin	1 mM Glutamin	10 mM Glutamin	
amtB	716462	175150	1045	0% không khí
galK	15	405	814	
glnB	8025	10275	7493	
glnK	752360	183994	320	
nifA	306663	92963	194	
nifH	12387186	3599183	161	
nifL	226368	42825	123	
ntrB	50439	25236	1081	
ntrC	78056	35760	1216	
amtB	241247	139599	1207	10% không khí
galK	404	770	1012	
glnB	8296	6899	9376	
glnK	241645	158973	288	
nifA	237483	115545	197	
nifH	4702957	2448758	108	
nifL	173765	66818	75	
ntrB	25676	19630	1118	
ntrC	40312	30703	1295	
amtB	160293	167736	1353	20% không khí
galK	1311	976	1200	
glnB	8522	8185	9445	
glnK	166653	191992	366	
nifA	200774	164973	198	
nifH	862984	2337297	80	
nifL	129054	99096	80	
ntrB	17326	21370	1146	
ntrC	24115	31446	1370	

FIG. 5

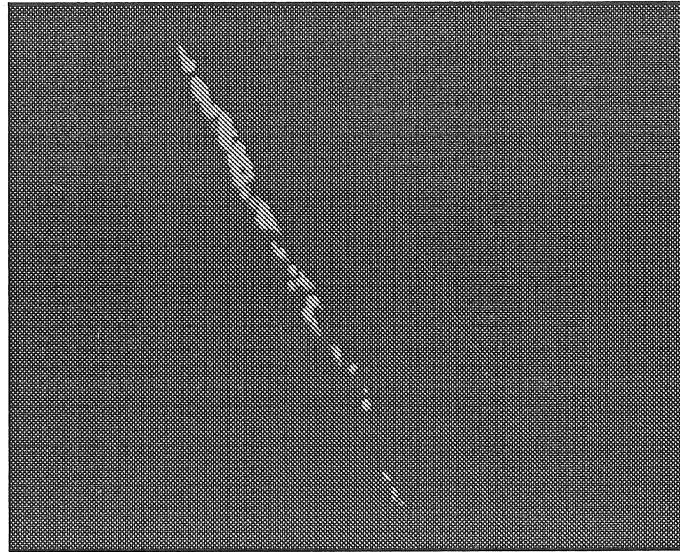


FIG. 6

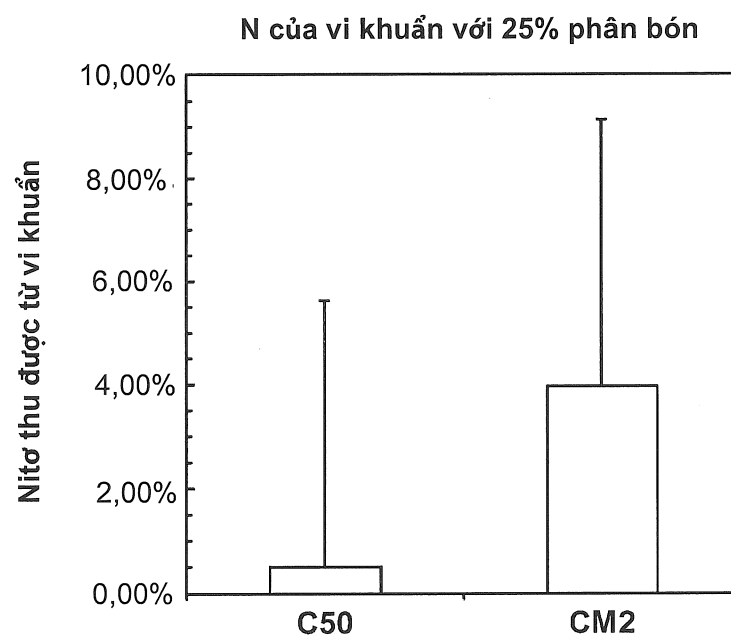


FIG. 7

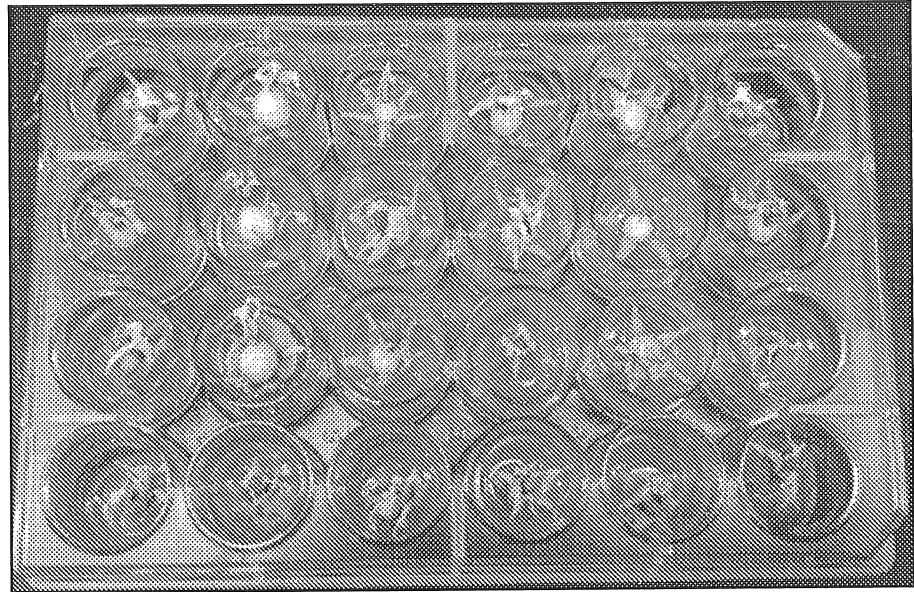


FIG. 8

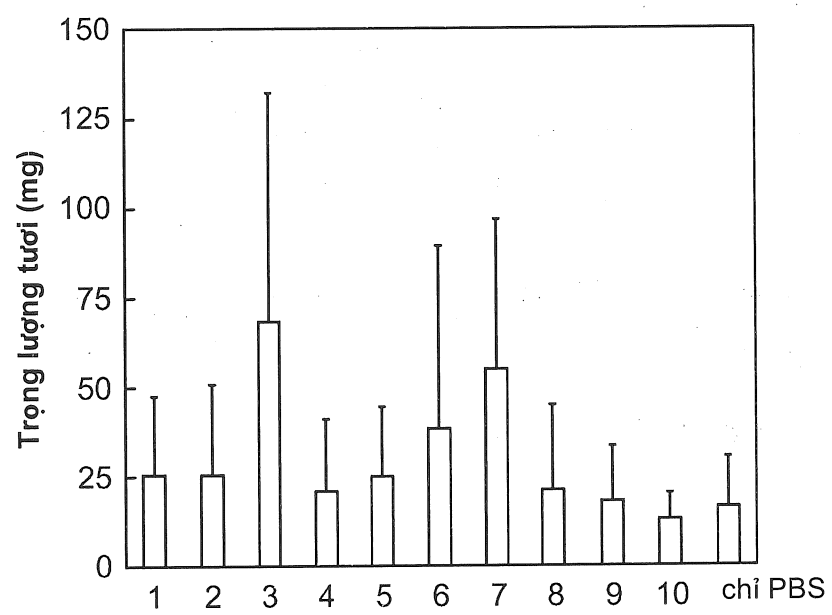
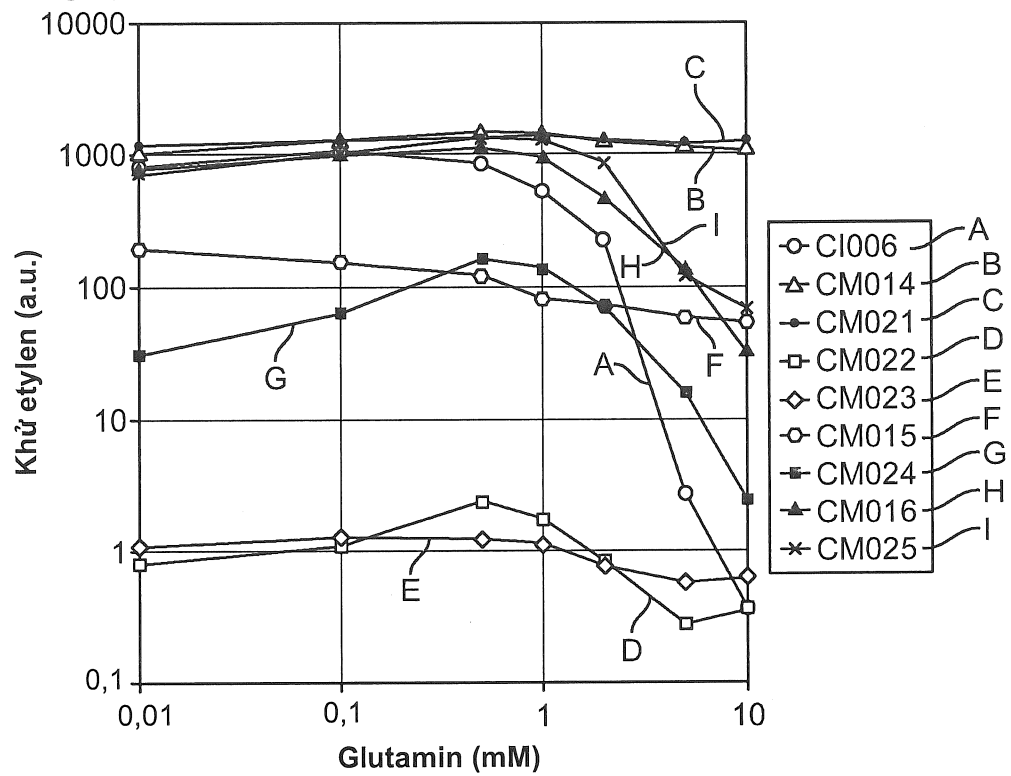
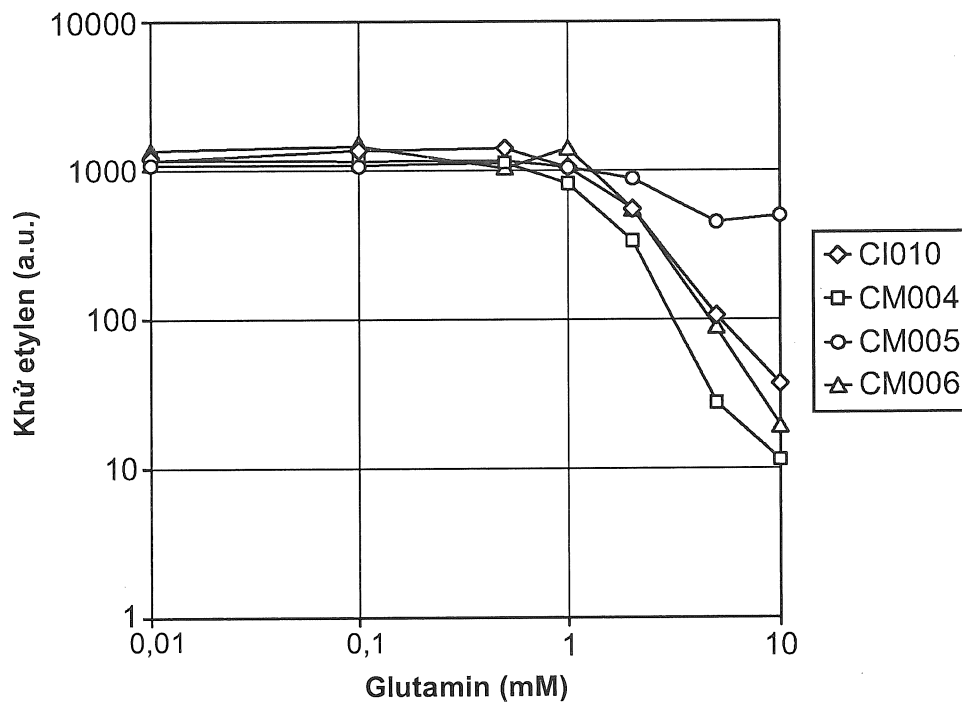


FIG. 9

Thử nghiệm ARA: So sánh sự trao đổi gen khởi đầu trong CI006



Thử nghiệm ARA: atmB, glnB, và nifL KO trong CI010



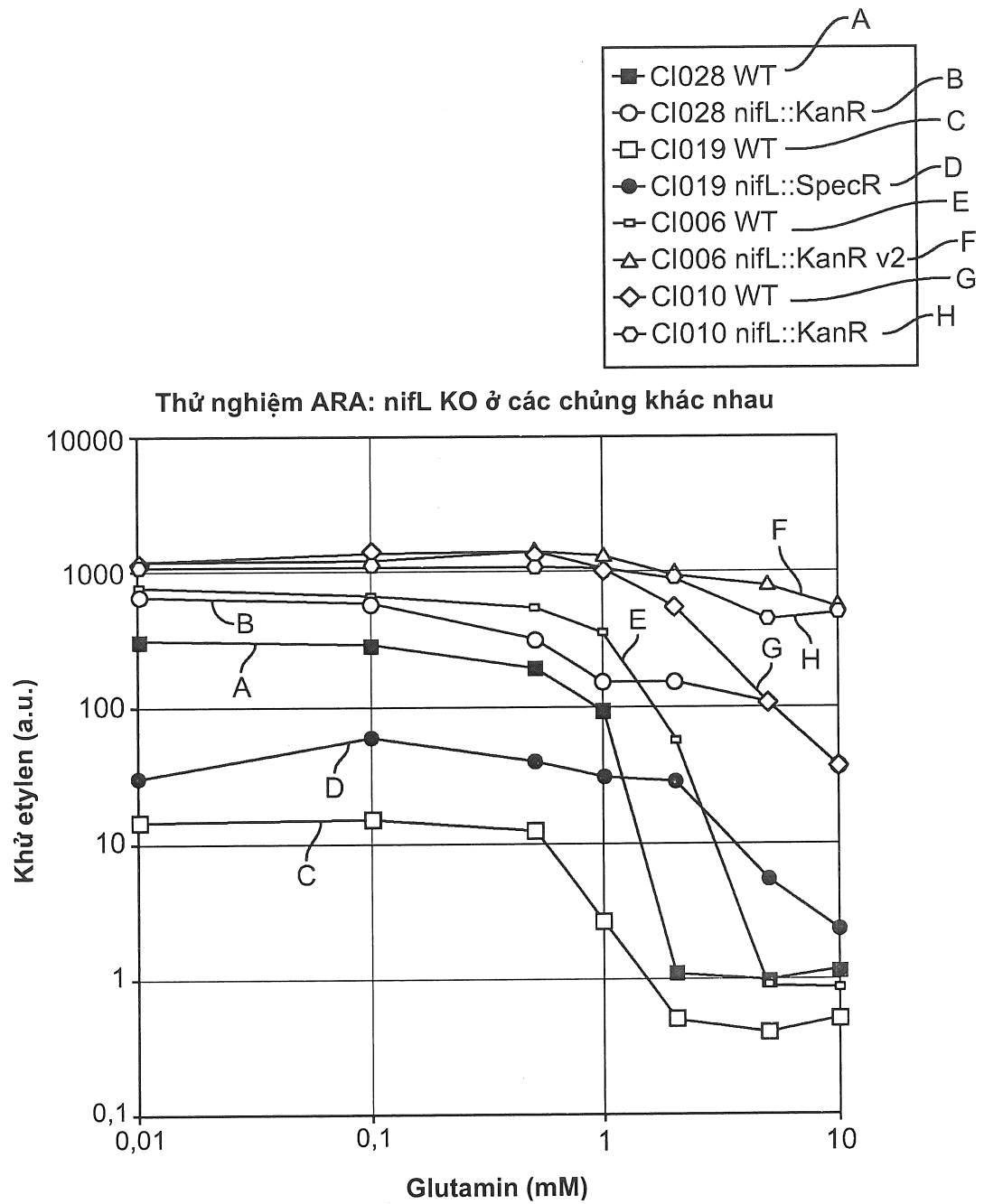


FIG. 10C

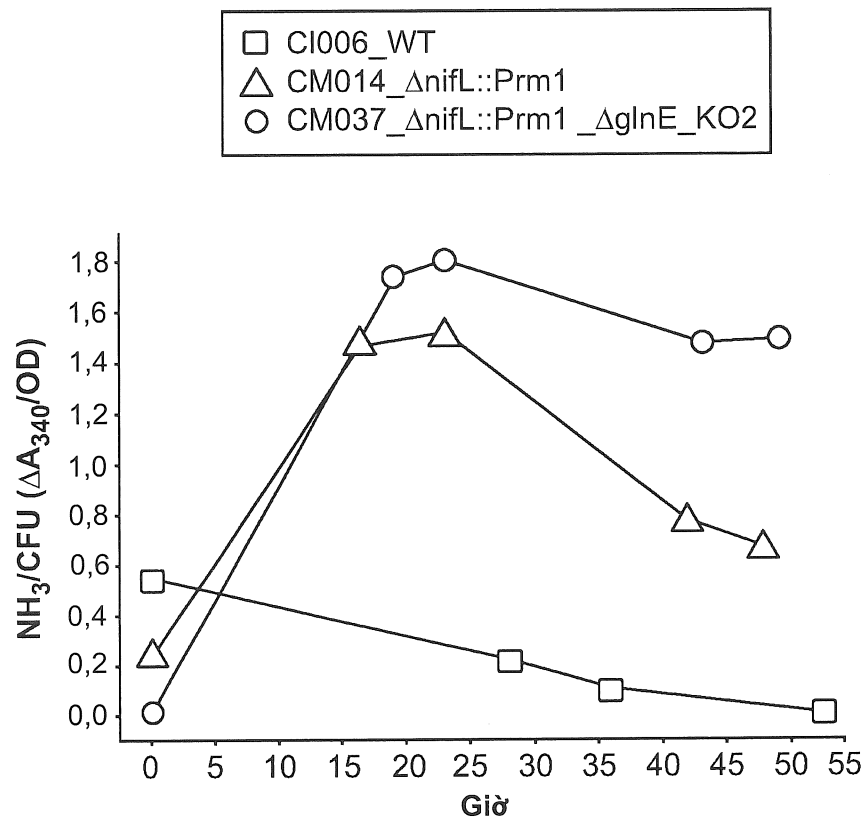
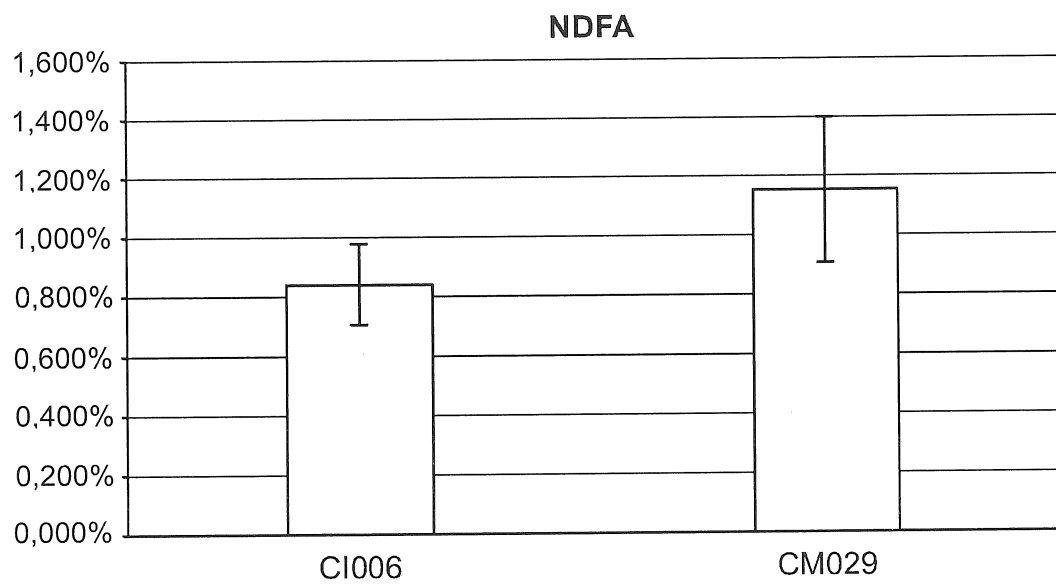
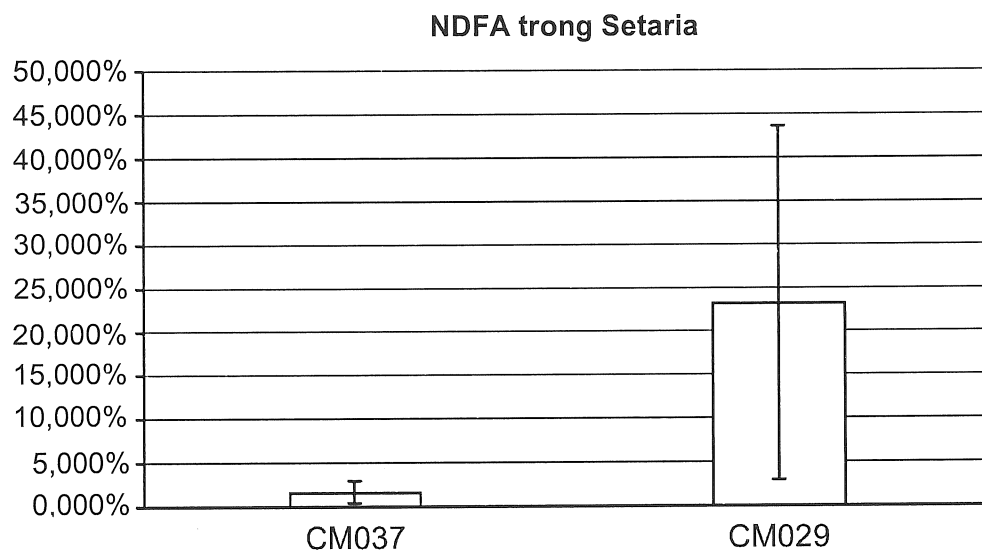


FIG. 11

11/17

**FIG. 12**

12/17

**FIG. 13**

13/17

FIG. 14A

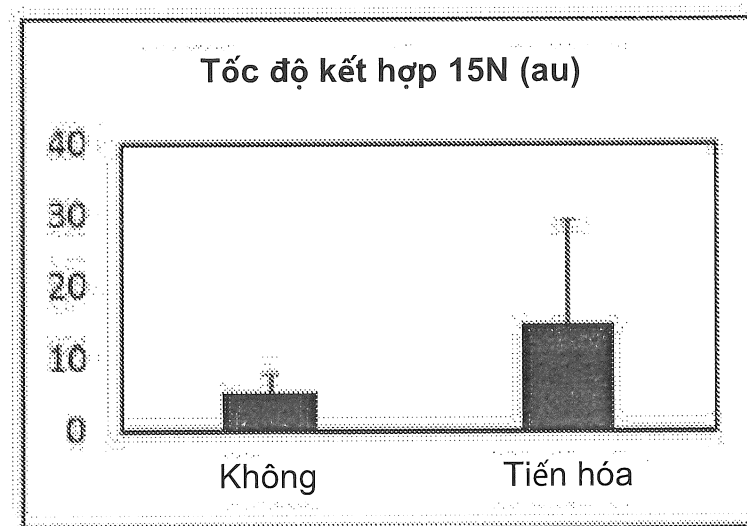
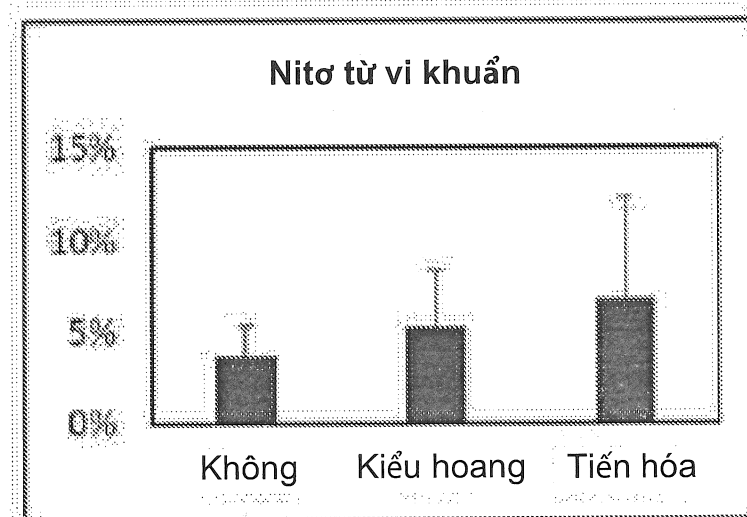
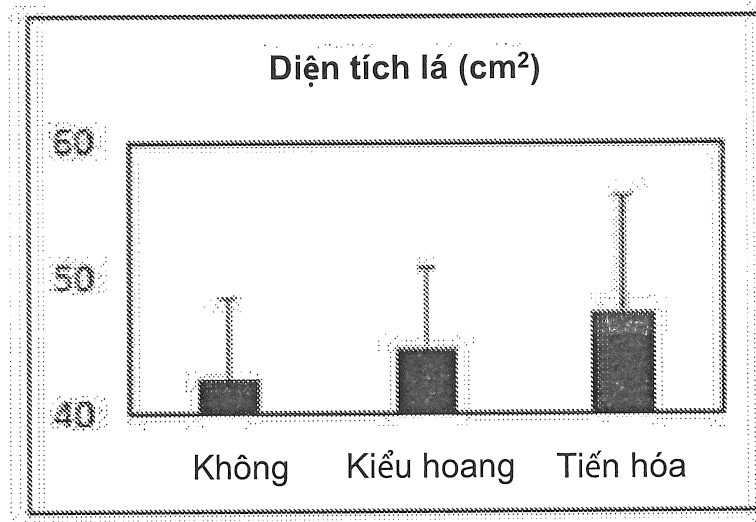


FIG. 14B



14/17
FIG. 14C



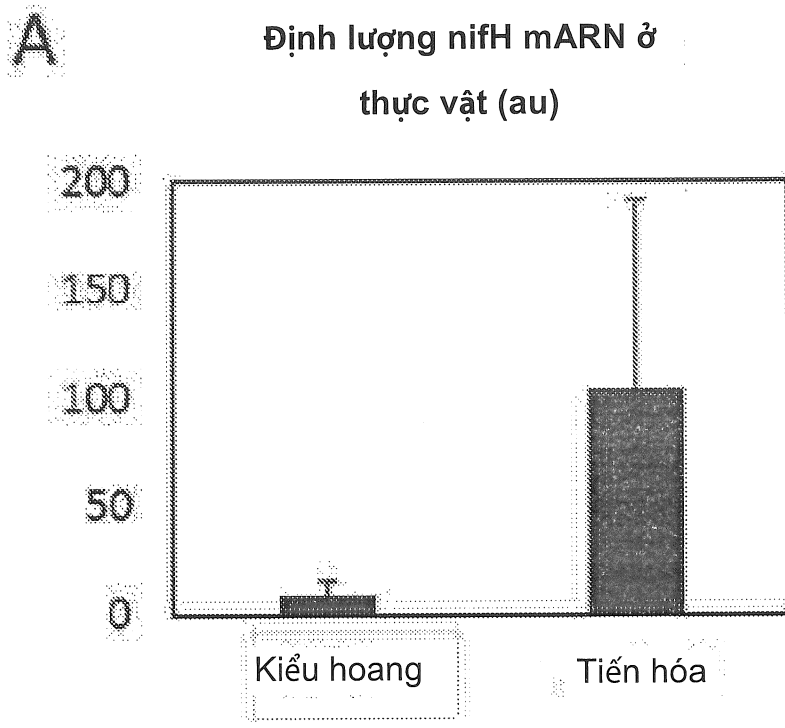
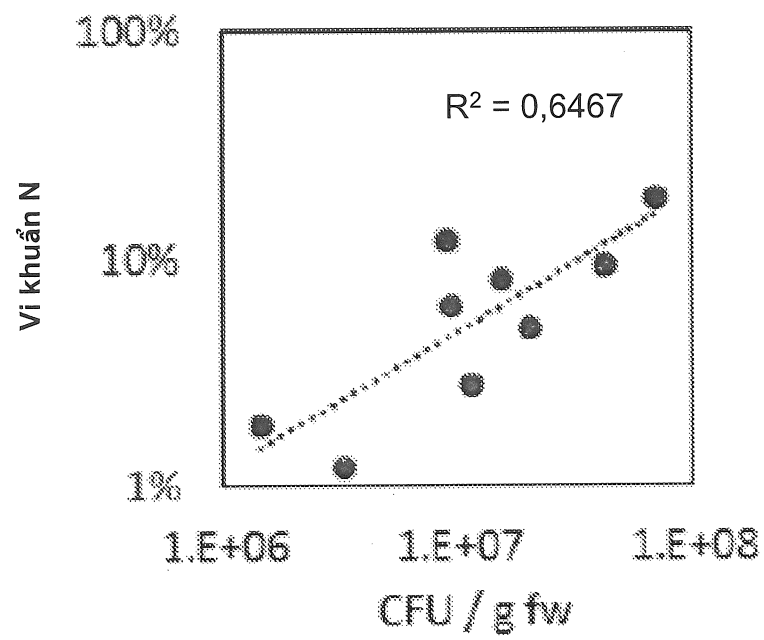
15/17
FIG. 15A

FIG. 15B

B

Mức xâm chiếm so với nitơ



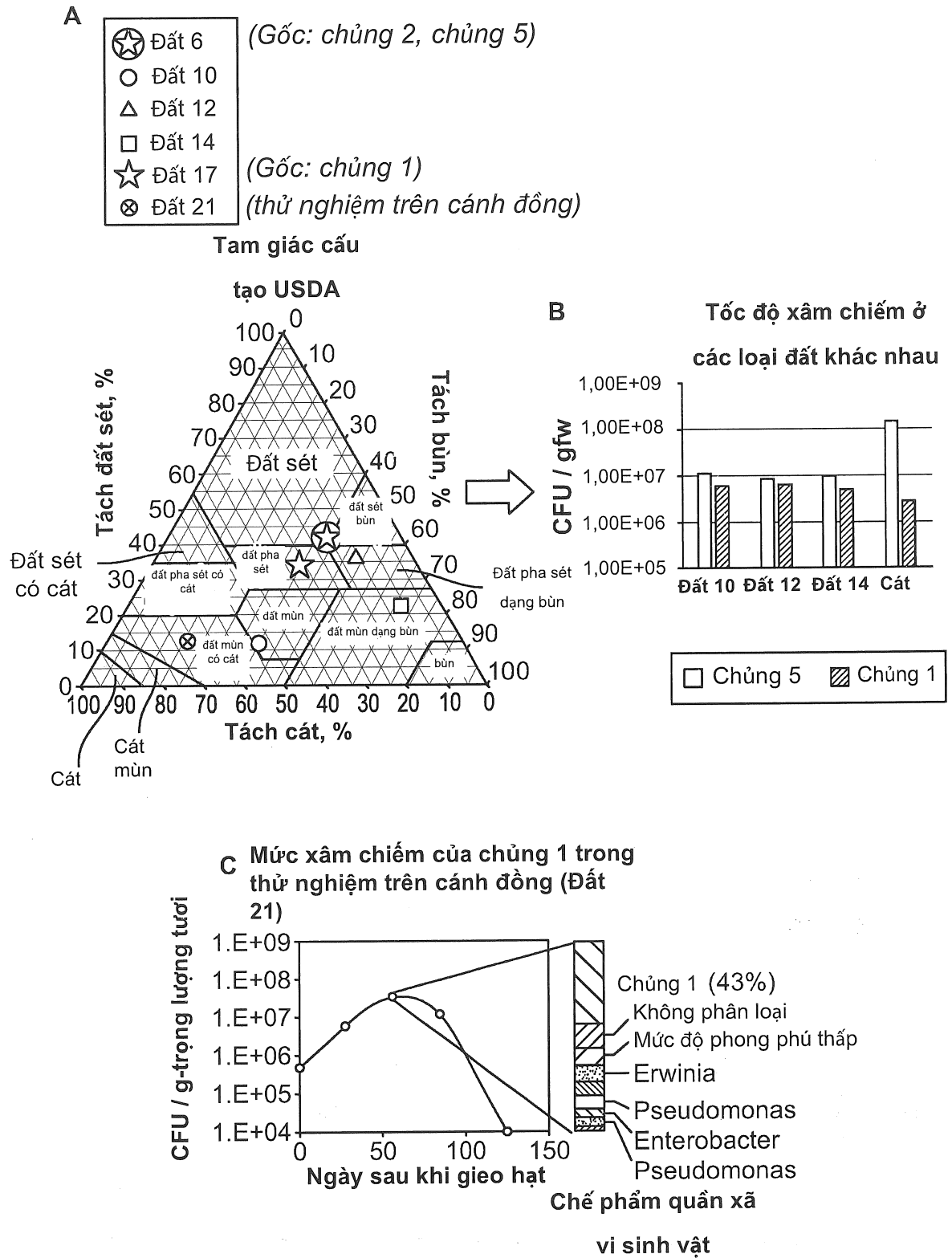


FIG. 16