



(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)



1-0039377

(51)⁸ A01H 5/10; C12N 9/24

(13) B

(21) 1-2018-02592

(22) 17/11/2016

(86) PCT/AU2016/051106 17/11/2016

(87) WO/2017/083920 26/05/2017

(30) 2015904754 18/11/2015 AU

(45) 25/04/2024 433

(43) 25/01/2019 370A

(73) 1. COMMONWEALTH SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL RESEARCH
ORGANISATION (AU)

Clunies Ross St, Acton, Australian Capital Territory 2601, Australia

2. INSTITUTE OF BOTANY, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES (CN)

20 Nanxincun, Beijing 100093, People's Republic of China

(72) Ronald Chun Wai YU (AU); Crispin Alexander HOWITT (AU); Philip John
LARKIN (AU); Chun-Ming LIU (CN); Xiao-Ba WU (AU); Jinxin LIU (CN).

(74) Công ty cổ phần tư vấn Trung Thực (TRUNG THUC.,JSC)

(54) HẠT CỦA CÂY LÚA, CÂY LÚA, PHƯƠNG PHÁP TẠO RA CÂY LÚA, VÀ
PHƯƠNG PHÁP TẠO RA THỰC PHẨM HOẶC ĐỒ UỐNG TỪ HẠT NÀY

(57) Sáng chế đề xuất hạt lúa có aloron dày. Sáng chế còn đề xuất cây lúa chứa ít nhất là một biến dị di truyền mà làm giảm hoạt tính của ít nhất là một gen *ROS1a* ở cây này. Hạt theo sáng chế, hoặc aloron từ nó, có các tính chất dinh dưỡng tốt hơn, và do đó là sản phẩm đặc biệt hữu ích cho người và làm thức ăn chăn nuôi.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến hạt lúa có aloron dày. Sáng chế còn đề cập đến cây lúa chứa ít nhất là một biến dị di truyền mà làm giảm hoạt tính của ít nhất là một gen *ROS1a* ở cây này. Hạt theo sáng chế, hoặc aloron của nó, có các tính chất dinh dưỡng tốt hơn, và do đó là đặc biệt hữu ích đối với thực phẩm dùng cho người và thức ăn chăn nuôi.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Trên thế giới, hạt ngũ cốc như lúa mỳ, gạo, ngô và ở mức độ thấp hơn lúa mạch, yến mạch và lúa mạch đen là nguồn chính cung cấp calo cho người từ tinh bột của hạt. Hạt ngũ cốc còn là quan trọng trong việc cung cấp các thành phần dinh dưỡng khác như protein, các vitamin, các chất khoáng và chất xơ từ chế độ ăn. Các phần khác nhau của hạt đóng góp một cách khác nhau về các thành phần dinh dưỡng này. Tinh bột được bảo quản trong nội nhũ tinh bột của hạt ngũ cốc, trong khi các thành phần dinh dưỡng khác tập trung nhiều hơn ở phôi và cám (xem tài liệu: Buri *et al.*, 2004). Tuy nhiên, cám thường được loại ra trước khi dùng ở thực phẩm, đặc biệt là ở gạo mà sau này được ăn ở dạng gạo trắng.

Hạt ngũ cốc hình thành từ các hiện tượng thụ thai kép giữa thể giao tử mẹ và thể giao tử bố. Một trong hai tế bào tinh từ ống phấn hoa hợp nhất với trứng để tạo ra một hợp tử mà phát triển thành phôi, và tế bào tinh khác hợp nhất với tế bào trung tâm lưỡng bội của thể đại giao tử để tạo ra nhân chính của nội nhũ, từ đó phát triển nội nhũ tam bội về mặt di truyền. Do đó, nội nhũ bao gồm cả aloron là tam bội, có hai bản sao của hệ gen đơn bội của mẹ và một bản sao của hệ gen đơn bội của bố. Ở hạt hai lá mầm, nội nhũ bị tiêu thụ bởi phôi đang phát triển trong khi ở các loại một lá mầm như lúa, nội nhũ vẫn tạo nên phần chính của hạt chín.

Nội nhũ thành thực của ngũ cốc có bốn loại tế bào với các tính chất khác biệt, cụ thể là nội nhũ tinh bột mà được đặc trưng bởi lượng lớn hạt nhỏ tinh bột và protein dự trữ của nó, aloron kiểu biểu bì mà thường là lớp tế bào dày xung quanh đa phần nội nhũ tinh bột, vận chuyển các tế bào ở đáy hạt trên hệ mạch chính của mẹ, và lớp tế bào xung quanh phôi mà tạo nên mô bọc mặt trong của phôi ở giai đoạn đầu trong quá trình phát triển của hạt nhưng sau đó có thể chỉ bao quanh cuống noãn mà liên kết phôi và nội nhũ tinh bột (xem tài liệu: Becraft *et al.*, 2001a). Phôi tạo thành trong khoang trong nội nhũ tinh bột. Do đó, mô aloron của ngũ cốc chứa (các) lớp ngoài cùng của nội nhũ trong hạt ngũ cốc, và bao quanh nội nhũ tinh bột và một phần của phôi.

Các tế bào aloron khác biệt với các tế bào nội nhũ tinh bột ở hình thái học, thành phần sinh hóa và biên dạng biểu hiện gen của chúng (xem tài liệu: Becraft and Yi, 2011). Các tế bào aloron thường giàu protein và dầu và tiết ra các enzym cho phép huy động nội nhũ dự trữ trong quá trình nảy mầm của hạt. Mỗi tế bào aloron được bao trong thành tế bào xơ mà là dày hơn thành tế bào nội nhũ và chủ yếu gồm arabinoxylan và beta glucan theo các tỷ lệ khác nhau và tự phát huỳnh quang ở mức độ cao. Lớp aloron là lớp duy nhất của nội nhũ mà ở ngũ cốc đôi khi tạo màu với antoxyan.

Aloron của ngũ cốc chỉ là một lớp tế bào dày ở lúa mỳ và ngô loại thường (xem tài liệu: Buttrose 1963; Walbot, 1994), hầu hết là một nhưng có thể đến ba lớp tế bào ở vùng sống lưng của nội nhũ ở lúa (xem tài liệu: Hoshikawa, 1993), và ba lớp tế bào ở lúa mạch loại thường (xem tài liệu: Jones, 1969). Ở nội nhũ bình thường, aloron là rất đều và các mẫu hình phân chia tế bào là rất trật tự. Các tế bào aloron thường thành thực gần như là hình khối ở phần có tế bào chất đặc kể cả hạt, các không bào nhỏ và các thể vùi được tạo nên bởi protein, lipid và phytin hoặc protein cộng với hydrat cacbon. Ở hạt ngũ cốc thành thực, aloron là mô nội nhũ duy nhất còn sống, mặc dù ở dạng ngũ đã được sấy khô. Sau khi hút hơi ẩm, phôi tạo ra gibberelin mà nó gây ra quá trình tổng hợp amylaza và các hydrolaza khác nhờ aloron được giải phóng vào nội nhũ tinh bột để phân hủy các hợp chất dự trữ để tạo ra đường và các axit amin cho giai đoạn sinh trưởng ban đầu của phôi thành cây con.

Sự điều tiết quá trình hình thành aloron ở hạt ngũ cốc đã được xem xét bởi Becraft và Yi (2011). Nhiều mức độ điều tiết về mặt di truyền kiểm soát số phận, mức độ biệt hóa và tổ chức của tế bào aloron, và nhiều gen tham gia vào các quy trình này, chỉ một vài trong số các gen đó đã được xác định. Ví dụ, đột biến mất chức năng *hạt nhân lỗi* (*defective kernal1 - dek1*) ở ngô không có lớp aloron cho thấy rằng polypeptit Dek1 loại thường là cần thiết để định rõ lớp ngoài cùng của tế bào là aloron (Becraft *et al.*, 2002). Polypeptit Dek1 là protein màng tròn vện lớn có 21 miền dãn qua màng và một miền bào chất chứa calpain proteaza hoạt tính. Một gen khác ở ngô, CRINKLY4 (CR4) mã hóa kinaza thụ thể mà thực hiện chức năng như tác nhân điều biến tích cực của số phận aloron, và đột biến *cr4* đã khử bớt aloron (Becraft *et al.*, 2001b).

Trong các tài liệu đã có thông báo một số ví dụ về aloron dày ở thể đột biến của hạt ngũ cốc, nhưng không đột biến nào được chứng minh là hữu dụng do tác dụng đa hiệu của gen, hoặc vấn đề nông học hoặc vấn đề sản xuất.

Shen và các đồng tác giả (2003) đã thông báo về việc xác định các thể đột biến ngô ở gen *lớp aloron dư thừa 1* (*supernumary aleuron layers 1 - sal1*) mà ở các thể đột biến khác nhau có 2 đến 3 hoặc đến bảy lớp tế bào aloron thay vì chỉ có một lớp thông thường. Polypeptit SAL1 được xác định là protein phân loại không bào nhóm E. Hạt đột

biến *sal1-1* đồng hợp tử có phôi lõi mà chúng không nảy mầm được và có nội nhũ tinh bột giảm nhiều. Thể đột biến kém hoàn chỉnh hơn mà là đồng hợp tử đối với alen *sal1-2* thể hiện aloron 2 lớp tế bào. Tuy nhiên, các cây đột biến chỉ sinh trưởng đến chiều cao bằng 30% loại thường, có khối lượng rễ giảm và kém về sự bố trí hạt (Shen *et al.* 2003). Các cây này là không hữu dụng về mặt nông học.

Yi và các đồng tác giả (2011) đã thông báo về việc xác định đột biến aloron dày 1 (*thk1*) ở ngô. Các hạt nhân đột biến là aloron đa lớp. Tuy nhiên, các hạt nhân đột biến này thiếu phôi phát triển tốt và không nảy mầm khi được gieo hạt. Gen *Thk1* loại thường mã hóa polypeptit Thk1 mà tác động xuôi đến polypeptit Dek1 vốn là cần thiết cho sự phát triển của aloron ở ngô (Becraft *et al.*, 2002).

Đột biến gen *thêm lớp tế bào* (*extra cell layer - Xcl*) ở ngô được xác định bởi tác động của nó đến hình thái học của lá. Nó tạo ra lớp aloron kép cũng như biểu bì lá đa lớp (xem tài liệu: Kessler *et al.*, 2002). Đột biến *Xcl* là đột biến bán trội mà phá vỡ kiểu hình phân chia tế bào và kiểu hình biệt hóa ở ngô, tạo ra lá dày và hẹp với hình thức bóng một cách bất thường.

Các thể đột biến ở ngô ở các gen *disorgall1* và *disorgall2* (*dil1* và *dil2*) là các aloron có số lớp thay đổi và các tế bào có hình dáng và kích thước bất thường (xem tài liệu: Lid *et al.*, 2004). Tuy nhiên, hạt đột biến *dil1* và *dil2* đồng hợp tử bị teo do mức tích lũy tinh bột giảm, và hạt đột biến thành thực nảy mầm ở tỷ lệ thấp và không phát triển thành cây sống được.

Ở lúa mạch, đột biến *elo2* thể hiện các tế bào mất trật tự theo cách tương tự và các bất thường ở các lớp aloron, tạo ra từ sự phân chia tế bào bất thường song song với mặt bằng (Lewis *et al.*, 2009). Các cây còn thể hiện số lớp tế bào tăng ở biểu bì lá, với các tế bào lõi và bị méo trên biểu bì. Quan trọng là, các cây đột biến đồng hợp tử bị còi, tạo ra trọng lượng hạt thấp hơn 60% so với loại thường, và không hữu dụng để tạo hạt.

Ở lúa, hai yếu tố phiên mã mà kiểm soát sự biểu hiện của các protein dự trữ của hạt cũng ảnh hưởng đến số phận của tế bào aloron (Kawakatsu *et al.*, 2009). Hiện tượng giảm mức độ biểu hiện của các cấu trúc kim hãm đồng thời của gen ghi mã polypeptit yếu tố liên kết hộp prolamin ở lúa (rice prolamin box binding factor - RPBF), mà vốn thuộc nhóm yếu tố phiên mã ngón tay kẽm DOF, tạo nên aloron đa lớp rời rạc bao gồm các tế bào to lộn xộn. Còn có hiện tượng giảm đáng kể về mức độ biểu hiện và tích trữ protein dự trữ của hạt, và tinh bột và lipit được tích trữ ở mức thấp hơn đáng kể. Mức độ biểu hiện của các thể tương đồng của các gen Dek1, CR4 và SAL1 của ngô ở lúa cũng bị giảm, cho thấy rằng các yếu tố RPBF và RISBZ1 hoạt động theo cùng một chu trình điều tiết như các gen này.

Loại metyl đối với ADN

Theo khía cạnh hoàn toàn khác của thực vật học, quá trình loại metyl đối với ADN được tóm tắt lại dưới đây. Các cây metyl hóa một số xytosin nucleotit ở ADN của nhân ở nguyên tử cacbon 5 của nhân pyrimidin, tạo ra 5-metylxytosin (5-meC). Xytosin đã được metyl hóa có thể xuất hiện ở một trong ba tình huống, cụ thể là metyl hóa CG, CHG (trong đó H=A, C hoặc T) và CHH, mỗi loại được xúc tác bởi metyltransferaza khác nhau. Ít nhất ở *Arabidopsis thaliana* và có lẽ ở hầu hết các cây, kể cả lúa (xem tài liệu: Zemach *et al.*, 2010), quá trình metyl hóa CG được xúc tác bởi các enzym thuộc họ metyltransferaza 1 (Met1), quá trình metyl hóa CHG được xúc tác bởi các metylaza thuộc họ chromometylaza, và quá trình metyl hóa CHH xảy ra thông qua phản ứng gián tiếp qua ARN được xúc tác bởi metylaza nằm ở cuối các miền (Domains Rear-ranged Methylases - DRM) bằng cách sử dụng các ARN nhỏ làm các trình tự dẫn dắt (xem tài liệu: Law and Jacobsen, 2010). Việc metyl hóa xytosin, mà xảy ra chỉ đối với tỷ lệ nhỏ trong số tất cả các xytosin, thường xảy ra nhất ở ADN dị nhiễm sắc và ở các vùng giàu ADN lặp lại và gen nhảy, ức chế hoạt tính của chúng. Hiện tượng này còn xảy ra ở các vùng đã được sao mã của ADN của nhân, kể cả ở vùng khởi động của gen, và do đó liên quan đến việc kiểm soát mức độ biểu hiện của nhiều gen.

Quá trình metyl hóa xytosin của ADN là thuận nghịch thông qua việc loại metyl, mà có thể xảy ra một cách bị động thông qua sự sao chép ADN hoặc một cách chủ động thông qua hoạt tính của các enzym loại metyl. Một chu trình để loại metyl tích cực đối với ADN ở thực vật là thông qua chu trình sửa chữa cắt bazơ (base excision repair - BER) mà sử dụng các enzym ADN glycosylaza. Các enzym này loại bỏ 5-meC ra khỏi khung ADN sợi đôi và sau đó phân cắt khung ADN (hoạt tính lyaza) tại vị trí không có purin hoặc pyrimidin theo các phản ứng lần lượt loại bỏ β và δ . Việc sửa chữa được hoàn thành bằng cách cài xen nucleotit xytosin không được metyl hóa nhờ hoạt tính ADN polymeraza.

Có bốn ADN glycosylaza/lyaza 5-meC trong hệ gen *Arabidopsis*, được gọi là Demeter (DME), kiểu Demeter 2 (DML2), kiểu Demeter 3 (DML3) và gen kìm hãm của gen câm (ROS1). Phân tích di truyền và phân tích sinh hóa cho thấy rằng cả bốn enzym này đều thực hiện chức năng của ADN demetylaza (xem các tài liệu: Gong *et al.*, 2002; Agius *et al.*, 2006; Morales-Ruiz *et al.*, 2006), trong đó DME chủ yếu thực hiện chức năng ở tế bào trứng và nội nhũ và còn các enzym khác thực hiện chức năng ở các mô khác. Tương tự, các cây khác thể hiện chỉ số đa bội của demetylaza (xem tài liệu: Zemach *et al.*, 2010).

Cần có hạt lúa có aloron dày từ các cây, đặc biệt là cây lúa mà còn là bình thường về kiểu hình và hữu dụng về mặt nông học.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất hạt của cây lúa, hạt này chứa aloron, nội nhũ tinh bột, gen *ROS1a* ghi mã polypeptit ROS1a và (i) một hoặc nhiều biến dị di truyền mỗi biến dị trong số đó làm giảm hoạt tính của ít nhất là một gen *ROS1a* ở cây khi so với cây lúa loại thường tương ứng, và/hoặc (ii) aloron đó dày hơn so với aloron từ hạt loại thường tương ứng.

Theo một phương án, polypeptit ROS1a có hoạt tính ADN glycosylaza. Theo một phương án, polypeptit ROS1a có mức độ hoạt tính ADN glycosylaza nằm từ 2% đến 60% mức độ hoạt tính ADN glycosylaza của polypeptit ROS1a loại thường tương ứng và/hoặc của polypeptit ROS1a với các axit amin có trình tự nêu ở SEQ ID NO: 2.

Theo phương án khác, polypeptit ROS1a là biến thể của polypeptit ROS1a loại thường tương ứng ở chỗ các trình tự axit amin của chúng là khác nhau. Theo một phương án được ưu tiên, hạt lúa chứa polypeptit ROS1a (Ta2) biến thể mà có trình tự axit amin như SEQ ID NO:1, polypeptit này là biến thể của polypeptit ROS1a loại thường có trình tự axit amin như SEQ ID NO:2.

Theo một phương án, hạt chứa nồng độ polypeptit ROS1a nằm trong khoảng từ 2% đến 60% lượng có ở hạt so với nồng độ của polypeptit ROS1a ở hạt loại thường tương ứng.

Theo một phương án, aloron dày có ít nhất là hai, ít nhất là ba, ít nhất là bốn hoặc ít nhất là năm lớp tế bào, khoảng 3, khoảng 4, khoảng 5 hoặc khoảng 6 lớp tế bào, hoặc 2 đến 8, 2 đến 7, 2 đến 6 hoặc 2 đến 5 lớp tế bào. Theo một phương án, hạt này là từ cây lúa và aloron dày có 5 đến 8, 5 đến 7, 5 đến 6 hoặc 2 đến 5 lớp tế bào. Theo một phương án, lớp aloron tăng về độ dày so với aloron của hạt lúa loại thường khoảng 100%, hoặc khoảng 150% hoặc khoảng 200%, hoặc khoảng 250%.

Biến dị di truyền, tốt hơn là biến dị di truyền được đưa vào, mà làm giảm hoạt tính của ít nhất là một gen *ROS1a* ở thực vật, có thể là loại xử lý di truyền bất kỳ mà làm giảm hoặc sút kém sản lượng của hàm lượng polypeptit ROS1a thông thường ở hạt lúa. Các ví dụ về các biến dị di truyền này bao gồm, nhưng không nhất thiết bị giới hạn ở,

(a) gen *ROS1a* ghi mã polypeptit ROS1a đột biến có hoạt tính ADN glycosylaza thấp hơn so với polypeptit ROS1a loại thường (SEQ ID NO:2);

(b) gen *ROS1a* mà khi được biểu hiện tạo ra hàm lượng polypeptit ROS1a loại thường thấp hơn, ví dụ, mà chứa đột biến tại vị trí nối ghép mà gây ra mức độ biểu hiện

giảm của gen *ROS1a*, so với gen *ROS1a* loại thường mà trình tự ADN bổ trợ của nó được thể hiện ở SEQ ID NO:8, hoặc gen *ROS1a* chứa đột biến ở gen khởi đầu của nó mà làm giảm mức độ biểu hiện của gen *ROS1a* so với gen *ROS1a* loại thường;

(c) cấu trúc axit nucleic ngoại sinh mà ghi mã polynucleotit mà làm giảm mức độ biểu hiện của gen *ROS1a* ở cây lúa, tốt hơn nếu cấu trúc axit nucleic chứa vùng ADN ghi mã polynucleotit được liên kết khi hoạt động với gen khởi đầu mà được biểu hiện ở hạt đang phát triển của cây lúa ít nhất tại một thời điểm giữa thời điểm nở hoa và 7 ngày sau khi nở hoa, và

(d) gen *ROS1a* chứa codon dừng dịch mã sớm trong vùng mã hóa protein của nó sao cho gen mã hóa, nhưng có thể hoặc không thể tạo ra, polypeptit cắt so với polypeptit *ROS1a* loại thường.

Theo phương án được ưu tiên, hạt lúa chứa (i) aloron, (ii) nội nhũ tinh bột, (iii) gen *ROS1a* mà chứa biến dị di truyền mà làm giảm hoạt tính của gen *ROS1a* ở cây lúa so với gen *ROS1a* loại thường, trong đó gen *ROS1a* này chứa biến dị di truyền ghi mã polypeptit *ROS1a* biến dị so với trình tự SEQ ID NO:2, và trong đó aloron dày hơn so với aloron từ hạt lúa loại thường tương ứng. Theo một phương án, biến dị di truyền ở gen *ROS1a* là cải biến di truyền đã được đưa vào. Theo một phương án được ưu tiên, polypeptit biến thể *ROS1a* là khác nhau về trình tự axit amin so với trình tự đã được nêu ở SEQ ID NO:2 ít nhất ở cải xen hoặc loại bỏ một hoặc nhiều axit amin hoặc thay thế axit amin so với trình tự SEQ ID NO:2. Theo một phương án được ưu tiên hơn nữa, polypeptit biến thể *ROS1a* là khác nhau trong trình tự axit amin so với trình tự đã được nêu ở SEQ ID NO:2 ở sự cải xen một hoặc nhiều axit amin hoặc một thay thế axit amin so với trình tự SEQ ID NO:2, ví dụ, một trong số các thay thế axit amin như liệt kê trong Bảng 3. Hạt lúa có thể được xử lý sao cho nó không còn khả năng nảy mầm, ví dụ, đã được làm chín, hoặc nó có thể không được xử lý sao cho nó có khả năng nảy mầm và sinh trưởng và bằng cách đó tạo ra cây lúa theo sáng chế. Theo phương án được ưu tiên nhất, aloron của hạt lúa được nhuộm màu, ví dụ, hạt lúa là gạo màu đen như được xác định trong bản mô tả này.

Theo phương án được ưu tiên khác, hạt lúa chứa (i) aloron, (ii) nội nhũ tinh bột, (iii) gen *ROS1a* mà chứa biến dị di truyền mà làm giảm hoạt tính của gen *ROS1a* ở cây lúa so với gen *ROS1a* loại thường, trong đó gen *ROS1a* này mà chứa biến dị di truyền mã hóa polypeptit *ROS1a* mà trình tự axit amin của nó giống hệt như polypeptit *ROS1a* loại thường, ví dụ, SEQ ID NO:2, trong đó gen *ROS1a* này được biểu hiện ở cây lúa ở mức độ thấp hơn so với gen *ROS1a* loại thường, trong đó aloron dày hơn so với aloron từ hạt lúa loại thường tương ứng. Theo một phương án, biến dị di truyền ở gen *ROS1a* là cải biến di truyền đã được đưa vào mà khiến cho gen *ROS1a* được biểu hiện ở mức

độ thấp hơn. Theo một phương án, biến dị di truyền được chọn từ nhóm bao gồm (i) đột biến tại vị trí nối ghép mà khiến gen *ROS1a* biểu hiện ở mức độ thấp hơn so với gen *ROS1a* loại thường mà trình tự ADN bổ trợ của nó được thể hiện ở SEQ ID NO:8, (ii) đột biến ở phần khởi đầu của gen *ROS1a* mà làm giảm mức độ biểu hiện của gen *ROS1a* so với gen *ROS1a* loại thường, và (iii) phân tử axit nucleic ngoại sinh, tốt hơn nếu được tích hợp vào hệ gen nhân của cây lúa, mà nó ghi mã polynucleotit của ARN mà làm giảm mức độ biểu hiện của gen *ROS1a* ở cây lúa. Hạt lúa có thể được xử lý sao cho nó không còn khả năng nảy mầm, ví dụ, đã được làm chín, hoặc nó có thể không được xử lý sao cho nó có khả năng nảy mầm và sinh trưởng và bằng cách đó tạo ra cây lúa theo sáng chế. Theo phương án được ưu tiên nhất, aloron của hạt lúa được nhuộm màu, ví dụ, hạt lúa là gạo màu đen như được xác định trong bản mô tả này.

Theo một phương án, cây lúa có mức độ hoạt tính ADN glycosylaza trong hạt đang phát triển của nó nằm trong khoảng từ 2% đến 60% mức độ hoạt tính ADN glycosylaza ở hạt loại thường tương ứng đang phát triển. Theo một phương án được ưu tiên, cây lúa có mức độ hoạt tính ADN glycosylaza trong hạt đang phát triển của nó nằm trong khoảng từ 2% đến 50%, hoặc nằm trong khoảng từ 2% đến 40%, hoặc nằm trong khoảng từ 2% đến 30%, hoặc nằm trong khoảng từ 2% đến 20% mức độ hoạt tính ADN glycosylaza ở hạt loại thường tương ứng đang phát triển.

Theo một phương án, hoạt tính của ít nhất là một gen *ROS1a* ở cây lúa bị giảm ở một hoặc nhiều hoặc tất cả các aloron, vỏ quả, phần lõi ra ở nhân, bầu nhụy, vỏ ngoài của hạt và nội nhũ tinh bột của hạt đang phát triển.

Theo một phương án, hoạt tính của gen *ROS1a* bị giảm ít nhất tại thời điểm giữa thời điểm nở hoa và 7 ngày sau khi nở hoa và/hoặc ở tế bào trứng trước khi nở hoa. Theo một phương án, phân tử axit nucleic ngoại sinh có thể được liên kết khi hoạt động với gen khởi đầu mà được biểu hiện ít nhất tại thời điểm giữa thời điểm nở hoa và 7 ngày sau khi nở hoa, sao cho polynucleotit của ARN đã được mã hóa làm giảm mức độ biểu hiện của gen *ROS1a* ở cây lúa trong khoảng thời gian đó.

Theo một phương án, cây lúa là hữu dục đực và hữu dục cái.

Theo một phương án, cây lúa thể hiện quá trình thành thực hạt trễ. Theo một phương án, sự thành thực của hạt bị trễ 2 ngày đến 10 ngày hoặc 2 ngày đến 15 ngày so với cây lúa loại thường.

Theo một phương án, hạt này, so với hạt loại thường tương ứng, có một hoặc nhiều hoặc toàn bộ các mức dưới đây, tất cả các mức đều tính theo trọng lượng,

- i) hàm lượng khoáng cao hơn, tốt hơn nếu hàm lượng khoáng là hàm lượng của một hoặc nhiều hoặc tất cả các kẽm, sắt kali, magie, phospho và lưu huỳnh,
- ii) hàm lượng chất chống oxy hóa cao hơn,

- iii) hàm lượng phytat cao hơn,
- iv) hàm lượng của một hoặc nhiều hoặc tất cả các vitamin B3, B6 và B9 cao hơn,
- v) hàm lượng chất xơ trong chế độ dinh dưỡng và/hoặc hàm lượng chất xơ không hòa tan cao hơn,
- vi) hàm lượng tinh bột nằm trong khoảng từ 90% đến 100% trọng lượng so với hàm lượng tinh bột của hạt loại thường tương ứng;
- vii) hàm lượng sucroza cao hơn,
- viii) hàm lượng monosacarit cao hơn, và
- ix) hàm lượng lipit ít nhất là 90% hoặc ít nhất là 100% so với hàm lượng lipit của hạt loại thường tương ứng. Theo một phương án, hàm lượng của thành phần được tăng 10% đến 50% hoặc tốt hơn là 10% đến 100% so với hàm lượng tương ứng ở hạt lúa loại thường.

Theo một phương án, hạt này chứa phôi.

Theo một phương án, hạt này là nguyên hạt hoặc hạt nứt vỡ.

Theo một phương án, hạt này đã được xử lý sao cho nó không còn khả năng nảy mầm, tốt hơn là bằng cách xử lý nhiệt. Ví dụ, hạt đã được nấu chín bằng nước ở nhiệt độ 100°C trong thời gian ít nhất 5 phút. Theo một phương án, hạt này là hạt nứt vỡ hoặc hạt đã được nghiền.

Theo phương án thay thế, hạt này có tỷ lệ nảy mầm nằm trong khoảng từ 70% đến 100% so với tỷ lệ nảy mầm của hạt loại thường tương ứng. Tức là, phần gom gồm ít nhất là 100 hạt có tỷ lệ nảy mầm trung bình nằm trong khoảng từ 70% đến 100% so với loại thường. Khi hạt nảy mầm và sinh trưởng, cây lúa theo sáng chế được tạo ra.

Theo một phương án, hạt này chứa gen *ROS1a* mà ghi mã polypeptit ROS1a vốn có hoạt tính ADN glycosylaza, tốt hơn là ở một hoặc nhiều aloron, vỏ ngoài của hạt và nội nhũ tinh bột của hạt, trong đó tốt hơn, nếu polypeptit ROS1a mà có hoạt tính ADN glycosylaza là polypeptit ROS1a đột biến.

Theo phương án khác, hạt này chứa polypeptit ROS1a đột biến có làm hoạt tính ADN glycosylaza giảm khi được biểu hiện ở cây lúa so với polypeptit ROS1a loại thường tương ứng, tốt hơn nếu trong đó polypeptit ROS1a đột biến chứa một hoặc nhiều thay thế, loại bỏ hoặc cài xen axit amin mà làm giảm hoạt tính ADN glycosylaza so với polypeptit ROS1a loại thường tương ứng. polypeptit ROS1a đột biến có thể không có hoạt tính ADN glycosylaza, với điều kiện hạt chứa polypeptit ROS1a khác mà có hoạt tính ADN glycosylaza. Ví dụ, gen *ROS1a* có thể ghi mã hai polypeptit ROS1a thông qua ghép nối thay thế, một trong số chúng có hoạt tính ADN glycosylaza polypeptit còn lại không có. Theo một phương án được ưu tiên, polypeptit ROS1a đột

biến có cài xen bảy axit amin so với polypeptit ROS1a loại thường, ví dụ polypeptit ROS1a đột biến mà trình tự axit amin của nó được thể hiện ở SEQ ID NO:1.

Theo phương án khác nữa, hạt có tổng lượng polypeptit ROS1a giảm so với hạt loại thường tương ứng, tốt hơn là giảm ở một hoặc nhiều aloron, vỏ ngoài của hạt và nội nhũ tinh bột của hạt, với điều kiện hạt chứa gen *ROS1a* mà ghi mã polypeptit ROS1a có hoạt tính ADN glycosylaza. Tổng lượng polypeptit ROS1a cũng có thể bị giảm ở phần của cây lúa.

Theo phương án khác, biến dị di truyền, tốt hơn là biến dị di truyền được đưa vào, là cấu trúc axit nucleic ngoại sinh mà ghi mã polynucleotit mà làm giảm mức độ biểu hiện của gen *ROS1a* ở cây lúa, tốt hơn là giảm ở cây lúa ít nhất tại thời điểm giữa thời điểm nở hoa và 7 ngày sau khi nở hoa, với điều kiện hạt chứa ít nhất là một gen *ROS1a* mà ghi mã polypeptit ROS1a có hoạt tính ADN glycosylaza.

Theo một phương án, hạt được nhuộm màu ở (các) lớp ngoài cùng của nó, ví dụ, hạt là hạt lúa màu nâu hoặc hạt lúa màu đen, hạt này chứa (i) aloron có độ dày ít nhất là 2 lớp tế bào, hoặc 2 đến 7 lớp tế bào, và (ii) gen *ROS1a* đột biến mà ghi mã polypeptit ROS1a mà chứa một hoặc nhiều thay thế, cài xen hoặc xóa bỏ axit amin mà làm giảm hoạt tính ADN glycosylaza so với polypeptit ROS1a của lúa loại thường tương ứng, hoạt tính ADN glycosylaza giảm xuất hiện ở cây lúa ít nhất tại thời điểm giữa thời điểm nở hoa và 7 ngày sau khi nở hoa, với điều kiện ít nhất tại thời điểm giữa thời điểm nở hoa và 7 ngày sau khi nở hoa cây lúa có mức độ hoạt tính ADN glycosylaza nằm trong khoảng từ 2% đến 60% ở hạt đang phát triển so với cây lúa loại thường.

Theo một phương án, hạt được nhuộm màu ở (các) lớp ngoài cùng của nó, ví dụ, hạt là hạt lúa màu nâu hoặc hạt lúa màu đen, hạt này chứa (i) aloron có độ dày ít nhất là 2 lớp tế bào, hoặc 2 đến 7 lớp tế bào, và (ii) cấu trúc axit nucleic ngoại sinh mà ghi mã polynucleotit mà làm giảm mức độ biểu hiện của gen *ROS1a* ở cây lúa, trong đó cấu trúc axit nucleic ngoại sinh chứa vùng ADN ghi mã polynucleotit được liên kết khi hoạt động với gen khởi đầu mà được biểu hiện ở hạt đang phát triển của cây lúa ít nhất tại thời điểm giữa thời điểm nở hoa và 7 ngày sau khi nở hoa, sao cho ít nhất tại thời điểm giữa thời điểm nở hoa và 7 ngày sau khi nở hoa cây lúa này có mức độ hoạt tính ADN glycosylaza ở hạt đang phát triển nằm trong khoảng từ 2% đến 60% so với cây lúa loại thường. Theo một phương án được ưu tiên, gen khởi đầu này là gen khởi đầu khác gen khởi đầu cơ định, ví dụ, gen khởi đầu mà được biểu hiện ở nội nhũ của hạt đang phát triển. theo phương án được ưu tiên nhất, gen khởi đầu này là gen khởi đầu LTP.

Theo phương án khác, polypeptit ROS1a chứa các axit amin mà trình tự của nó ít nhất là 95% đồng nhất với trình tự SEQ ID NO: 2, hoặc (các) polypeptit ROS1a chứa các axit amin mà trình tự của chúng đồng nhất ít nhất là 95%, ít nhất là 97,5%, hoặc ít

nhất là 99% đồng nhất với SEQ ID NO: 2 và các trình tự là khác trình tự axit amin của polypeptit ROS1a loại thường tương ứng.

Theo một phương án, polypeptit ROS1a chứa một hoặc nhiều hoặc toàn bộ các motif dưới đây; DHGSIDLEWLR (SEQ ID NO: 44), GLGLKSVECVRLTLHH (SEQ ID NO: 45), AFPVDTNVGRI (SEQ ID NO: 46), VRLGWVPLQPLPESLQLH-LLE (SEQ ID NO: 47), ELHYQMITFGKVFCTKSKPNCN (SEQ ID NO: 48) và HFASAFASARLALP (SEQ ID NO: 49).

Sáng chế còn đề xuất nhóm hạt lúa, mỗi hạt mà chứa cùng (các) biến dị di truyền, cùng gen *ROS1a*, cùng polypeptit ROS1a và/hoặc có cùng các đặc tính như đã được bộc lộ trong các phương án nêu trên. Tức là nhóm này là đồng nhất về mặt di truyền và/hoặc kiểu hình. Nhóm hạt gạo này có thể thu được hoặc có nguồn gốc từ một hạt hoặc cây lúa tổ tiên, ví dụ, có thể có nguồn gốc từ một hạt hoặc cây tổ tiên cách ít nhất là 2, ít nhất là 3 hoặc ít nhất là 4 thế hệ cây con.

Các tác giả sáng chế đã xác định được polypeptit biến thể ROS1a có hoạt tính ADN glycosylaza giảm. Do đó, theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất polypeptit ROS1a tinh khiết và/hoặc tái tổ hợp mà trình tự axit amin của nó là khác trình tự axit amin của polypeptit ROS1a loại thường tương ứng và có hoạt tính ADN glycosylaza giảm, tốt hơn là không có, so với polypeptit ROS1a loại thường tương ứng.

Theo một phương án, polypeptit ROS1a tinh khiết và/hoặc tái tổ hợp chứa các axit amin có trình tự mà là đồng nhất ít nhất là 95%, đồng nhất ít nhất là 97,5%, hoặc đồng nhất ít nhất là 99%, với SEQ ID NO: 2.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất polynucleotit phân lập và/hoặc ngoại sinh ghi mã polypeptit ROS1a theo sáng chế.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất polynucleotit phân lập và/hoặc ngoại sinh mà, khi có mặt ở cây lúa, làm giảm mức độ biểu hiện của gen *ROS1a*.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này biết rõ về các loại polynucleotit khác nhau mà có thể được dùng để làm giảm mức độ biểu hiện của gen đích, và các polynucleotit này có thể được thiết kế như thế nào. Các ví dụ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, polynucleotit đối nghĩa, polynucleotit có nghĩa, polynucleotit xúc tác, ARN cỡ micron, phân tử ARN sợi đôi (dsRNA) hoặc sản phẩm ARN đã được xử lý của chúng.

Theo một phương án, polynucleotit là phân tử ARN sợi đôi, hoặc sản phẩm ARN đã được xử lý của chúng, chứa ít nhất là 19 nucleotit liên tục mà đồng nhất ít nhất là 95% với trình tự bổ trợ của trình tự SEQ ID NO: 7 hoặc 8 (trong đó thymine (T) là uracil (U)), hoặc đồng nhất ít nhất là 95% với trình tự bổ trợ của ARN thông tin ghi mã polypeptit ROS1a mà trình tự axit amin của nó đã được nêu ở SEQ ID NO: 1 hoặc 2.

Theo phương án khác, phân tử ARN sợi đôi là tiền ARN cỡ micron (ARN micro) và/hoặc trong đó sản phẩm ARN đã được xử lý của chúng là ARN cỡ micro.

Theo một phương án, polynucleotit được dùng để làm giảm mức độ biểu hiện của gen *ROS1a* ở hạt đang phát triển của cây lúa ít nhất tại thời điểm giữa thời điểm nở hoa và 7 ngày sau khi nở hoa.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất cấu trúc axit nucleic và/hoặc vật truyền ghi mã polynucleotit theo sáng chế, trong đó cấu trúc axit nucleic hoặc vật truyền chứa vùng ADN ghi mã polynucleotit được liên kết khi hoạt động với gen khởi đầu mà được biểu hiện ở hạt đang phát triển của cây lúa ít nhất tại thời điểm giữa thời điểm nở hoa và 7 ngày sau khi nở hoa.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất tế bào tái tổ hợp chứa polynucleotit ngoại sinh theo sáng chế, hoặc cấu trúc axit nucleic và/hoặc vật truyền theo sáng chế.

Theo một phương án, tế bào là tế bào của cây lúa như tế bào của hạt lúa, tốt hơn là aloron của lúa.

Theo một phương án, polynucleotit ngoại sinh, cấu trúc axit nucleic hoặc vật truyền được tích hợp vào hệ gen của tế bào, tốt hơn là vào hệ gen của nhân.

Sáng chế còn đề xuất tế bào của cây lúa chứa gen *ROS1a* ghi mã polypeptit *ROS1a* và biến dị di truyền, tốt hơn là biến dị di truyền được đưa vào, mà làm giảm hoạt tính của ít nhất là một gen *ROS1a* trong tế bào so với tế bào tương ứng loại thường.

Theo một phương án, tế bào là tế bào aloron, vỏ quả, phần lõi ra ở nhân, bầu nhụy, vỏ ngoài của hạt hoặc nội nhũ tinh bột.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất cây lúa, hoặc quần thể cây lúa, mà tạo ra hạt theo sáng chế, polypeptit theo sáng chế, polynucleotit theo sáng chế, cấu trúc axit nucleic và/hoặc vật truyền theo sáng chế và/hoặc mà chứa tế bào theo sáng chế. Theo một phương án, mỗi cây lúa

Sáng chế còn đề xuất quần thể gồm ít nhất là 100, hoặc ít nhất là 1.000 cây lúa theo sáng chế sinh trưởng trên cánh đồng. Theo phương án được ưu tiên, hầu hết (>50%), tốt hơn là tất cả các cây lúa trên cánh đồng là cây lúa theo sáng chế. Theo phương án được ưu tiên nhất, ít nhất là 100, hoặc ít nhất là 1.000 cây lúa là giống nhau về mặt di truyền và/hoặc kiểu hình, ví dụ, chứa cùng một loại biến dị di truyền.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra tế bào theo sáng chế, phương pháp này bao gồm bước đưa polynucleotit ngoại sinh theo sáng chế, hoặc cấu trúc axit nucleic và/hoặc vật truyền theo sáng chế, vào trong tế bào, tốt hơn là tế bào lúa.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra cây lúa theo sáng chế hoặc hạt chuyển gen thu được từ đó, phương pháp này bao gồm các bước dưới đây:

i) đưa vào tế bào lúa, polynucleotit ngoại sinh theo sáng chế, hoặc cấu trúc axit nucleic và/hoặc vật truyền theo sáng chế,

ii) thu nhận cây lúa chuyển gen từ tế bào thu được theo bước i), cây lúa chuyển gen là chuyển gen đối với polynucleotit ngoại sinh, cấu trúc axit nucleic hoặc vật truyền hoặc phần của chúng, và

iii) tùy ý thu hoạch hạt từ cây theo bước ii), hạt này là chuyển gen đối với polynucleotit ngoại sinh, cấu trúc axit nucleic hoặc vật truyền, và

iv) tùy ý tạo ra một hoặc nhiều cây con chuyển gen từ hạt chuyển gen, các cây con này là chuyển gen đối với polynucleotit ngoại sinh, cấu trúc axit nucleic hoặc vật truyền,

nhờ đó tạo ra cây lúa hoặc hạt lúa chuyển gen.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra cây lúa theo sáng chế hoặc hạt từ nó, phương pháp này bao gồm các bước

i) đưa vào tế bào lúa đột biến của gen *ROS1a* nội sinh sao cho gen *ROS1a* đột biến mã hóa polypeptit ROS1a theo sáng chế, hoặc không ghi mã polypeptit ROS1a,

ii) thu nhận cây lúa từ tế bào thu được theo bước i), cây lúa này chứa đột biến của gen *ROS1a* nội sinh, và

iii) tùy ý thu hoạch hạt từ cây theo bước ii), hạt này chứa đột biến của gen *ROS1a* nội sinh, và

iv) tùy ý tạo ra một hoặc nhiều thế hệ cây con từ hạt, thế hệ cây con chứa đột biến của gen *ROS1a* nội sinh,

nhờ đó tạo ra cây lúa hoặc hạt lúa.

Theo một phương án, cây lúa hoặc hạt lúa chứa ít nhất là một gen *ROS1a* mà ghi mã polypeptit ROS1a mà có hoạt tính ADN glycosylaza.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp chọn lọc cây lúa hoặc hạt lúa theo sáng chế, phương pháp này bao gồm các bước

i) sàng lọc quần thể cây lúa hoặc hạt lúa mỗi cây hoặc hạt trong số này thu được từ xử lý đột biến đối với tế bào, hạt hoặc cây lúa tổ tiên, để tạo ra hạt theo sáng chế hoặc về sự có mặt của đột biến ở gen *ROS1a*, hoặc sự có mặt của hạt lúa theo sáng chế, và

ii) chọn lọc từ quần thể theo bước (i) cây lúa mà tạo ra hạt theo sáng chế hoặc mà chứa gen *ROS1a* đột biến, hoặc hạt lúa theo bước (i) mà là hạt lúa theo sáng chế, bằng cách đó chọn lọc được cây lúa hoặc hạt lúa.

Phương pháp có thể bao gồm bước tạo ra một hoặc nhiều cây con hoặc hạt từ cây lúa chọn lọc, hoặc ít nhất là hai thế hệ cây con, và/hoặc thu hoạch hạt từ thế hệ cây con. Tốt hơn, nếu các cây con này là đồng hợp tử đối với biến dị di truyền.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp chọn lọc cây lúa theo sáng chế, phương pháp này bao gồm các bước

i) tạo ra một hoặc nhiều cây con từ hạt lúa, hạt lúa này thu được từ việc lai hai cây lúa bố mẹ,

ii) sàng lọc một hoặc nhiều cây con theo bước i) để tạo ra hạt theo sáng chế, và

iii) chọn cây con mà tạo ra hạt,

bằng cách đó chọn lọc cây lúa. Theo một phương án được ưu tiên, hạt lúa là hạt lúa màu đen.

Theo một phương án, bước sàng lọc i) hoặc bước ii) bao gồm một hoặc nhiều hoặc tất cả các công đoạn sau:

i) phân tích mẫu chứa ADN từ cây con về biến dị di truyền,

ii) phân tích độ dày của aloron của hạt thu được từ cây con, và

iii) phân tích hàm lượng dinh dưỡng của hạt hoặc một phần của nó.

Tốt hơn, nếu biến dị di truyền là biến dị di truyền được đưa vào.

Theo một phương án, bước iii) bao gồm một hoặc nhiều hoặc tất cả các công đoạn:

i) chọn cây con là đồng hợp tử đối với biến dị di truyền, trong đó biến dị di truyền này làm giảm hoạt tính ADN glycosylaza ở cây lúa khi so với cây lúa loại thường tương ứng,

ii) chọn cây con mà hạt của nó có aloron dày hơn so với hạt loại thường tương ứng,

iii) chọn cây con mà hạt của nó hoặc phần của chúng có hàm lượng dinh dưỡng thay đổi so với hạt loại thường tương ứng hoặc phần của chúng.

Theo phương án khác nữa, phương pháp còn bao gồm các bước

i) lai hai cây lúa bố mẹ, tốt hơn là trong đó một trong số các cây lúa bố mẹ tạo ra hạt theo sáng chế, hoặc

ii) lai ngược một hoặc nhiều cây con thu được theo bước i) với các cây có cùng kiểu di truyền như cây lúa bố mẹ đầu tiên mà không tạo ra hạt theo sáng chế với số lần đủ để tạo ra cây có phần lớn kiểu di truyền của cây lúa bố mẹ đầu tiên nhưng tạo ra hạt theo sáng chế, và

iii) chọn cây con mà tạo ra hạt theo sáng chế.

Sáng chế còn đề xuất cây lúa và hạt lúa, và các sản phẩm của chúng, tạo ra được bằng cách áp dụng phương pháp sáng chế.

Sáng chế còn đề xuất việc sử dụng polynucleotit ngoại sinh theo sáng chế, hoặc cấu trúc axit nucleic và/hoặc vật truyền theo sáng chế, để tạo ra tế bào tái tổ hợp, cây lúa chuyển gen hoặc hạt chuyển gen.

Theo một phương án, việc sử dụng là để tạo ra hạt lúa theo sáng chế.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp xác định cây lúa mà tạo ra hạt theo sáng chế, phương pháp này bao gồm các bước

i) thu nhận mẫu axit nucleic từ cây lúa, và

ii) sàng lọc mẫu theo sự có mặt hoặc không có biến dị di truyền mà làm giảm hoạt tính của gen *ROS1a* ở thực vật khi so với cây lúa loại thường tương ứng.

Theo một phương án, biến dị di truyền là một hoặc cả hai trong số

a) cấu trúc axit nucleic biểu hiện polynucleotit, hoặc polynucleotit được ghi mã bởi nó, mà khi có mặt ở cây lúa thì làm giảm mức độ biểu hiện của gen *ROS1a*, và

b) gen, hoặc ARN thông tin được ghi mã bởi nó, mà biểu hiện polypeptit *ROS1a* đột biến có hoạt tính polypeptit *ROS1a* giảm.

Theo một phương án, sự có mặt của biến dị di truyền cho thấy rằng hạt của cây này có aloron dày so với cây tương ứng không có biến dị di truyền.

Theo khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất phương pháp xác định cây lúa mà tạo ra hạt theo sáng chế, phương pháp này bao gồm các bước

i) thu nhận hạt từ cây lúa, và

ii) sàng lọc hạt hoặc một phần của nó theo một hoặc nhiều tiêu chí

a) aloron dày,

b) lượng polypeptit *ROS1a* và/hoặc hoạt tính trong hạt, và

c) lượng ARN thông tin được ghi mã bởi gen *ROS1a* trong hạt.

Theo một phương án, phương pháp xác định cây lúa theo sáng chế.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra một phần của cây lúa, tốt hơn là hạt, phương pháp này bao gồm các bước,

a) trồng cây lúa theo sáng chế, hoặc ít nhất là 100 cây lúa như vậy trên cánh đồng, và

b) thu hoạch phần cây lúa từ cây lúa hoặc các cây lúa.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất bột gạo, cám, bột nguyên hạt, mạch nha, tinh bột hoặc dầu thu được từ hạt, phương pháp bao gồm các bước;

a) thu nhận hạt theo sáng chế, và

b) xử lý hạt này để tạo ra bột, cám, bột nguyên hạt, mạch nha, tinh bột hoặc dầu.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất sản phẩm tạo ra được từ hạt theo sáng chế, hoặc cây lúa theo sáng chế, hoặc từ một phần của hạt đó hoặc cây lúa đó.

Theo một phương án, sản phẩm chứa một hoặc nhiều hoặc toàn bộ gen *ROS1a*, biến dị di truyền (tốt hơn là biến dị di truyền được đưa vào), cấu trúc axit nucleic ngoại sinh và aloron dày.

Theo một phương án, phần đó là cám gạo.

Theo một phương án, sản phẩm là thành phần thực phẩm, thành phần đồ uống, thực phẩm hoặc sản phẩm đồ uống. Các ví dụ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở,

i) thành phần thực phẩm hoặc thành phần đồ uống được chọn từ nhóm bao gồm bột nguyên hạt, bột, cám, tinh bột, mạch nha và dầu,

ii) thực phẩm được chọn từ nhóm bao gồm: bánh mỳ lên men hoặc bánh mỳ không lên men, mỳ ống, mỳ, củ khô cho động vật, ngũ cốc để ăn sáng, đồ ăn qua loa, bánh ngọt, bánh nướng và thực phẩm chứa xốt làm từ bột, hoặc

iii) đồ uống là đồ uống đóng gói hoặc đồ uống chứa etanol.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp chế biến thực phẩm hoặc thành phần đồ uống theo sáng chế, phương pháp này bao gồm việc xử lý hạt theo sáng chế, hoặc cám, bột, bột nguyên hạt, mạch nha, tinh bột hoặc dầu từ hạt, để tạo ra thực phẩm hoặc thành phần đồ uống.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp chế biến thực phẩm hoặc sản phẩm đồ uống theo sáng chế, phương pháp này bao gồm việc trộn hạt theo sáng chế, hoặc cám, bột, bột nguyên hạt, mạch nha, tinh bột hoặc dầu từ hạt, với thành phần thực phẩm hoặc đồ uống khác. Tốt hơn, nếu trọng lượng của hạt, cám, bột, bột nguyên hạt, mạch nha, tinh bột hoặc dầu mà được dùng trong phương pháp là ít nhất là 10% trên trọng lượng của thực phẩm.

Sáng chế còn đề xuất việc sử dụng hạt theo sáng chế hoặc một phần của nó, hoặc cây lúa theo sáng chế hoặc một phần của nó, làm thức ăn chăn nuôi hoặc thực phẩm, hoặc để tạo ra thức ăn dùng cho động vật hoặc thực phẩm để dùng cho người.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất chế phẩm chứa một hoặc nhiều polypeptit theo sáng chế, polynucleotit theo sáng chế, cấu trúc axit nucleic và/hoặc vật truyền theo sáng chế, hoặc tế bào theo sáng chế, và một hoặc nhiều chất mang được dùng.

Phương án bất kỳ theo sáng chế sẽ được xem là áp dụng với những sửa đổi thích đáng về chi tiết đối với phương án bất kỳ khác trừ khi có quy định rõ ràng khác.

Sáng chế không chỉ giới hạn về phạm vi ở các phương án cụ thể được bộc lộ trong bản mô tả này, mà vốn chỉ được dự định nhằm mục đích minh họa. Các sản phẩm, các chế phẩm và các phương pháp tương đương về mặt chức năng rõ ràng nằm trong phạm vi của sáng chế, như được bộc lộ trong bản mô tả này.

Trong toàn bộ bản mô tả này, trừ khi có quy định cụ thể khác hoặc tình huống yêu cầu khác, việc đề cập đến một bước, chế phẩm, nhóm bao gồm các bước hoặc nhóm bao gồm các chế phẩm sẽ cần phải được hiểu là bao gồm một và nhiều (tức là một hoặc nhiều) các bước, các chế phẩm, các nhóm bao gồm các bước hoặc nhóm bao gồm các chế phẩm đó.

Sáng chế được mô tả dưới đây bằng các ví dụ dưới đây không giới hạn phạm vi của sáng chế và có dựa vào các hình vẽ kèm theo.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là biểu đồ tách dòng dựa trên bản đồ gen *ta2*. Các con số dưới mỗi dòng biểu thị số lượng thể tái tổ hợp trong quần thể lập bản đồ mà thể hiện sự tái tổ hợp giữa gen đánh dấu và gen *ta2*. Các cột đặc trên hàng thứ ba thể hiện phạm vi của các vùng mã hóa trên nhiễm sắc thể của lúa. Các cột đặc trên hàng thứ tư thể hiện các vùng mã hóa protein trên gen; các dòng xen vào giữa thể hiện các intron (intron 1 nằm ở 5'UTR và không được thể hiện ở đây). Dấu hoa thị thể hiện vị trí của đột biến *ta2* trên intron 14 tại vị trí Chr1: 6451738 có tham chiếu đến trình tự hệ gen của lúa.

Hình 2 là các trình tự nucleotit của ADN bổ trợ tương ứng với ARN thông tin thu được từ hạt đang phát triển thuộc kiểu di truyền thường (wild-type - WT) và kiểu di truyền *ta2*. Các nét ngang ở WT và hai trình tự *ta2* biểu thị sự vắng mặt của nucleotit. Hầu hết các ARN thông tin *ta2* có 21 nucleotit cài xen. Trình tự loại thường là SEQ ID NO: 10, trình tự đột biến là SEQ ID NO: 11.

Hình 3 là các trình tự axit amin từ ADN bổ trợ tương ứng với các ARN thông tin thu được từ hạt đang phát triển loại thường (trình tự axit amin trên, SEQ ID NO: 12) và *ta2* (trình tự dưới, SEQ ID NO: 13). Các nét gạch ngang ở trình tự WT biểu thị sự vắng mặt của các axit amin đối diện với bảy axit amin cài xen (CSNVMRQ; SEQ ID NO: 14) ở polypeptit *ta2*. Các hình ngôi sao dưới các trình tự biểu thị rằng các axit amin giống nhau có mặt ở cả polypeptit loại thường và polypeptit đột biến tại các vị trí đó.

Hình 4 là hình duỗi thẳng trình tự axit amin của các thể tương đồng DME của *Arabidopsis* (NM001085058.1), *ROS1a* của *Arabidopsis* (NM129207.4) và *ROS1a* của lúa. Các dấu hoa thị dưới trình tự duỗi thẳng biểu thị các vị trí axit amin mà được bảo toàn ở cả ba polypeptit. Dấu chấm phẩy biểu thị các thay đổi bảo toàn về axit amin, trong khi các dấu chấm lẻ thể hiện các thay đổi bảo toàn một phần về axit amin.

Hình 5 là trình tự axit amin đuôi thẳng của thể tương đồng *ROS1a* của *Arabidopsis* (NM129207.4) và thể tương đồng *ROS1a* của lúa. Các dấu hoa thị dưới các trình tự đuôi thẳng thể hiện các vị trí axit amin mà được bảo toàn ở cả ba polypeptit. Các dấu chấm phẩy biểu thị các thay đổi bảo toàn về axit amin, trong khi các dấu chấm lẻ biểu thị các thay đổi bảo toàn một phần về axit amin.

Hình 6 là các kết quả RT-PCR theo thời gian thực thể hiện mức độ biểu hiện tương đối của gen *TA2* của lúa ở nhiều loại mô.

Giải thích danh mục trình tự

SEQ ID NO: 1 – polypeptit đột biến *ROS1a* (Ta2) của lúa.

SEQ ID NO: 2 – Polypeptit *ROS1a* của lúa loại thường.

SEQ ID NO: 3 – Polypeptit *ROS1b* của lúa loại thường.

SEQ ID NO: 4 – Polypeptit *ROS1c* của lúa loại thường.

SEQ ID NO: 5 – Polypeptit *ROS1d* của lúa loại thường.

SEQ ID NO: 6 – Polypeptit *DEMETER* của *Arabidopsis*.

SEQ ID NO: 7 – ADN bổ trợ dài đầy đủ ghi mã polypeptit *ROS1a* của lúa đột biến (Ta2). Khung đọc mở trái từ nucleotit 341 đến 6220.

SEQ ID NO: 8 – ADN bổ trợ dài đầy đủ ghi mã polypeptit *ROS1a* của lúa. Khung đọc mở trái từ nucleotit 341 đến 6199.

SEQ ID NO: 9 – gen *ROS1a* của lúa. Gen khởi đầu và 5'UTR: các nucleotit 1 đến 4726, codon khởi đầu dịch mã ATG 4727 đến 4729; codon dừng dịch mã TAG 15867 đến 15869; 3'-UTR từ 15870 đến 16484, sau gen từ 16485 đến 16885. Các vị trí nucleotit của các intron là: intron 1, 7494 đến 7724; 2, 7816 đến 7909; 3, 9426 đến 9571; 4, 9652 đến 10452; 5, 10538 đến 10628; 6, 10721 đến 10795; 7, 10865 đến 10951; 8, 10989 đến 11069; 9, 11153 đến 11834; 10, 12282 đến 12385; 11, 12423 đến 12508; 12, 12567 đến 12650; 13, 12791 đến 13017; 14, 13084 đến 13201; 15, 13317 đến 14668; 16, 14708 đến 15732.-11006. Trình tự này bao gồm 401 nucleotit ở đầu tận cùng 3' mà không tạo thành một phần của gen.

SEQ ID NO: 10 – Trình tự ADN bổ trợ *ROS1a* của lúa loại thường một phần được thể hiện trên hình 2.

SEQ ID NO: 11 – Trình tự ADN bổ trợ *ROS1a* của lúa đột biến một phần (Ta2) được thể hiện trên hình 2.

SEQ ID NO: 12 – Trình tự protein *ROS1a* của lúa loại thường một phần được thể hiện trên hình 3.

SEQ ID NO: 13 – Trình tự protein ROS1a của lúa đột biến một phần (Ta2) được thể hiện trên hình 3.

SEQ ID NO: 14 – Các axit amin bổ sung ở polypeptit ROS1a đột biến (Ta2) khi so với loại thường (SEQ ID NO:2).

SEQ ID NO 15 đến 43 – Các đoạn mỗi oligonucleotit.

SEQ ID NO 44 đến 49 - Các motif axit amin bảo toàn ở mức độ cao trong miền glycosylaza của polypeptit ROS1a của lúa loại thường.

SEQ ID NO: 50 – Polypeptit ROS1a của *Arabidopsis*.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các kỹ thuật và định nghĩa

Trừ khi có quy định cụ thể khác, tất cả các thuật ngữ kỹ thuật và thuật ngữ khoa học được dùng trong bản mô tả này sẽ có cùng nghĩa như thường được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này (ví dụ, lĩnh vực nuôi cấy tế bào, di truyền phân tử, sinh học phân tử thực vật, hóa học protein, và sinh hóa).

Trừ khi có quy định cụ thể khác, các kỹ thuật protein tái tổ hợp, nuôi cấy tế bào, và miễn dịch học được áp dụng theo sáng chế là các quy trình chuẩn, đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các kỹ thuật này được bộc lộ và giải thích kỹ trong các tài liệu như J. Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning*, John Wiley and Sons (1984), J. Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989), T.A. Brown (editor), *Essential Molecular Biology: A Practical Approach*, tập 1 và tập 2, IRL Press (1991), D.M. Glover and B.D. Hames (editors), *DNA Cloning: A Practical Approach*, các tập 1 đến 4, IRL Press (1995 và 1996), và F.M. Ausubel *et al.* (editors), *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience (1988, bao gồm cả các phần cập nhật cho đến nay), Ed Harlow and David Lane (editors) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbour Laboratory, (1988), và J.E. Coligan *et al.* (editors) *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons (bao gồm cả các phần cập nhật cho đến nay).

Thuật ngữ “và/hoặc”, ví dụ, “X và/hoặc Y” cần phải được hiểu với nghĩa là “X và Y” hoặc “X hoặc Y” và cần phải được xem là cơ sở minh họa rõ ràng cho cả hai nghĩa này hoặc cho từng nghĩa trong hai nghĩa này.

Thuật ngữ “khoảng” được dùng trong bản mô tả này, trừ khi có quy định khác, để chỉ +/- 10%, tốt hơn nữa là +/- 5%, tốt hơn nữa là +/- 2,5%, còn tốt hơn nữa là +/- 1%, trị số đã được chỉ định. Thuật ngữ “khoảng” bao gồm cả trị số đã được chỉ định.

Các thuật ngữ "chứa", hoặc các biến thể như "gồm" hoặc "bao gồm" trong toàn bộ bản mô tả này sẽ được hiểu là ám chỉ sự bao trùm yếu tố, số nguyên hoặc bước, hoặc nhóm bao gồm các yếu tố, các số nguyên hoặc các bước đã nêu, nhưng không loại trừ yếu tố, số nguyên hoặc bước, hoặc nhóm bao gồm các yếu tố, các số nguyên hoặc các bước bất kỳ khác.

Định nghĩa được chọn

Các thuật ngữ “aloron” và “lớp aloron” được sử dụng thay thế nhau trong bản mô tả này. Lớp aloron là lớp ngoài cùng của nội nhũ của hạt lúa, khác biệt với nội nhũ tinh bột bên trong, và xung quanh nội nhũ tinh bột và phần của phôi. Do đó, các tế bào mà tạo nên lớp aloron là các tế bào nội nhũ ngoài cùng, thành phần tinh bột của hạt. Trong khi về mặt kỹ thuật nó là một phần của nội nhũ, đôi khi được gọi là nội nhũ ngoại biên, aloron được xem là một phần của cám từ góc độ thực tế vì nó được loại bỏ cùng với lớp vỏ và lớp vỏ ngoài hạt của cám. Không giống như các tế bào nội nhũ tinh bột, các tế bào aloron vẫn sống khi hạt thành thực. Lớp aloron là phần quan trọng có giá trị dinh dưỡng của hạt lúa chứa các chất khoáng, các vitamin như vitamin A và các vitamin nhóm B, các hóa chất thực vật, và chất xơ.

Các phương án theo sáng chế liên quan đến một khoảng số lượng “lớp tế bào”, ít nhất là một phần vì tại điểm mặt cắt ngang bất kỳ của hạt theo sáng chế, các lớp tế bào quan sát được tại mỗi điểm bất kỳ trong mặt cắt ngang, hoặc giữa các mặt cắt ngang, có thể thay đổi đến mức độ nhất định. Cụ thể hơn, aloron có, ví dụ, bảy lớp tế bào có thể không có bảy lớp xung quanh toàn bộ nội nhũ tinh bột bên trong nhưng có bảy lớp xung quanh ít nhất là một nửa nội nhũ tinh bột bên trong.

Thuật ngữ “dày” được dùng liên quan đến aloron của hạt theo sáng chế là một tính từ so sánh được sử dụng khi so sánh hạt theo sáng chế với hạt loại thường tương ứng. Aloron của hạt theo sáng chế có số lượng tế bào tăng và/hoặc số lớp tế bào tăng khi so với aloron của hạt loại thường tương ứng. Vì vậy, aloron có độ dày tăng như đo được theo μm . Theo một phương án, độ dày tăng ít nhất 50%, tốt hơn là ít nhất là 100%, và có thể tăng nhiều nhất là 500% hoặc 600%, mỗi tỷ lệ phần trăm là so với độ dày của aloron của hạt loại thường tương ứng, và hiểu mỗi tỷ lệ phần trăm là mức tăng trung bình so với mặt bụng của hạt và tốt hơn nếu trên toàn thể hạt. Theo một phương án, độ dày của lớp aloron được xác định ngang toàn bộ mặt cắt ngang của hạt. Theo một phương án, độ dày của aloron được xác định ít nhất theo phân tích trên mặt bụng của hạt. Theo một phương án khác, aloron dày của hạt theo sáng chế chứa các tế bào có kích thước thay đổi và định hướng bất quy tắc so với kích thước và định hướng đó của

hạt loại thường tương ứng khi aloron thường có các tế bào hình chữ nhật định hướng đều.

Polypeptit

Thuật ngữ “polypeptit ROS1” được dùng trong bản mô tả này để chỉ một thành viên của họ protein của các phân tử ADN glycosylaza có liên quan mà chúng liên quan về trình tự axit amin với SEQ ID NO: 1 đến 5 đến mức chúng là đồng nhất ít nhất là 95% với một hoặc nhiều trình tự axit amin trong số các SEQ ID NO: 1 đến 5. Các polypeptit ROS1 bao gồm các polypeptit ROS1a, ROS1b, ROS1c và ROS1d của lúa loại thường, kể cả các biến dị có trong tự nhiên và các dạng đột biến của chúng. Các polypeptit ROS1 bao gồm các polypeptit này tìm thấy ở các cây lúa loại thường cũng như các biến thể của chúng được tạo ra một cách nhân tạo hoặc được tìm thấy trong tự nhiên, như tìm thấy ở cây lúa Indica và cây lúa Japonica, và có hoặc không có hoạt tính ADN glycosylaza, kể cả các polypeptit ROS1 mà có một chút hoạt tính ADN glycosylaza nhưng ở mức độ thấp hơn so với polypeptit ROS1 tương ứng loại thường. Các ví dụ về polypeptit ROS1 của cây lúa loại thường bao gồm các loại mà có trình tự axit amin nêu ở một trong số các trình tự SEQ ID NO: 2 đến 5, cũng như polypeptit biến thể mà có trình tự axit amin mà là đồng nhất ít nhất là 95%, ít nhất là 97%, hoặc tốt hơn, nếu ít nhất là 99% với một hoặc nhiều trình tự axit amin trong số các SEQ ID NO: 2 đến 5 và được tìm thấy trong tự nhiên. Thuật ngữ polypeptit ROS1 được dùng trong bản mô tả này không bao gồm polypeptit Demeter (DME) mà là họ ADN glycosylaza liên quan mà là đồng nhất ít hơn 95% về trình tự axit amin với SEQ ID NO:1 đến 5.

Thuật ngữ “polypeptit ROS1a” được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là phân tử có liên quan ADN glycosylaza mà trình tự axit amin của nó đồng nhất ít nhất là 95% với trình tự SEQ ID NO: 2, tốt hơn là ít nhất 97% hoặc tốt hơn nữa nếu đồng nhất ít nhất là 99% với trình tự SEQ ID NO:2. Các polypeptit ROS1a bao gồm các polypeptit tìm thấy ở cây lúa loại thường cũng như các biến thể của chúng được tạo ra một cách nhân tạo hoặc tìm thấy trong tự nhiên, và có hoặc không có hoạt tính ADN glycosylaza, với điều kiện chúng có tính tương tự về trình tự axit amin ở mức độ nhất định so với SEQ ID NO:2. Ví dụ, polypeptit ROS1a mà có trình tự được thể hiện ở SEQ ID NO:1 được xem là không có hoạt tính ADN glycosylaza, nhưng nó vẫn là polypeptit ROS1a như được xác định trong bản mô tả này. Theo một phương án được ưu tiên, polypeptit ROS1a có một chút hoạt tính ADN glycosylaza nhưng ở mức độ thấp hơn so với polypeptit ROS1a loại thường mà trình tự axit amin của nó là SEQ ID NO:2. Ví dụ,

Bảng 3 liệt kê các polypeptit ROS1a đột biến mà được xem là có hoạt tính ADN glycosylaza giảm.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể dễ dàng áp dụng các kỹ thuật đã biết để phân biệt polypeptit ROS1a với các protein khác có liên quan về mặt cấu trúc như các polypeptit ROS1 khác, đặc biệt là với các polypeptit ROS1b, ROS1c và ROS1d, ví dụ, bằng cách áp dụng phân tích hệ phát sinh giống loài *in silico* hoặc duỗi thẳng protein. Do đó, polypeptit ROS1a có thể được xác định là polypeptit ROS1a chỉ riêng trên cơ sở dấu hiệu cấu trúc. Ví dụ, xem hình 4 và hình 5 trong bản mô tả này. Polypeptit ROS1a theo sáng chế có thể có hoặc có thể không có hoạt tính ADN glycosylaza, hoặc có thể có hoạt tính ADN glycosylaza giảm khi so với polypeptit ROS1a loại thường như loại có trình tự axit amin thể hiện ở SEQ ID NO: 2.

Thuật ngữ “mà trình tự là khác trình tự axit amin của polypeptit ROS1a loại thường tương ứng”, hoặc các thuật ngữ tương tự, được dùng trong bản mô tả này là các thuật ngữ so sánh, trong đó trình tự axit amin của polypeptit ROS1a theo sáng chế là khác trình tự axit amin của protein mà là gốc của nó và/hoặc liên quan gần nhất tồn tại trong tự nhiên. Theo một phương án, trình tự axit amin của polypeptit ROS1a có một hoặc nhiều cái xen, loại bỏ hoặc thay thế axit amin (hoặc tổ hợp của chúng) so với trình tự axit amin loại thường tương ứng. Polypeptit ROS1a có thể có 2, 3, 4, 5 hoặc 6 đến 10 thay thế axit amin so với polypeptit ROS1a loại thường tương ứng. Theo một phương án được ưu tiên, polypeptit ROS1a chỉ có một cái xen, một loại bỏ hoặc một thay thế axit amin so với polypeptit loại thường tương ứng. Trong bản mô tả này, các thuật ngữ “một cái xen” và “một loại bỏ” bao gồm cả trường hợp khi nhiều (ví dụ, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 hoặc nhiều), axit amin liên kế lần lượt được cái xen vào hoặc được loại bỏ, và “polypeptit loại thường tương ứng” có nghĩa là polypeptit loại thường mà từ đó thu được biến thể và/hoặc polypeptit tự nhiên mà biến thể có liên quan gần nhất với nó. Polypeptit ROS1a có thể là polypeptit ROS1a cắt mà có thể được ghi mã bởi, ví dụ, gen *ROS1a* mà chứa codon dừng dịch mã sớm trong khung đọc mở protein so với gen *ROS1a* loại thường mà nó có nguồn gốc từ đó, hoặc polypeptit ROS1a có thể là dài đầy đủ tức là có cùng số lượng gốc axit amin như polypeptit ROS1a loại thường tương ứng. Ví dụ về polypeptit ROS1a có trong tự nhiên (loại thường) là polypeptit mà trình tự axit amin của nó được thể hiện ở SEQ ID NO: 2, và các ví dụ về polypeptit biến thể ROS1a mà chỉ có một cái xen, loại bỏ hoặc thay thế axit amin được thể hiện ở SEQ ID NO:1 và Bảng 3.

Thuật ngữ “hoạt tính ADN glycosylaza” được dùng trong bản mô tả này để chỉ enzym tham gia vào việc sửa chữa cắt bazơ (được phân loại theo EC số EC 3.2.2). Enzym này thường còn có hoạt tính ADN lyaza, trong đó bazơ của ADN được cắt và

sợi ADN khung được tách ra. Theo một phương án, thuật ngữ “hoạt tính ADN glycosylaza” được dùng trong trường hợp theo sáng chế liên quan đến việc loại methyl tích cực, trong đó các gốc 5-methylxytosin bị cắt và thế bằng xytosin không được methyl hóa. Theo một phương án được ưu tiên, polypeptit ROS1a theo sáng chế với hoạt tính ADN glycosylaza có ít nhất năm motif có thể xác định được. Một là motif vòng xoắn-kẹp tóc-vòng xoắn (HhH) (ví dụ, các axit amin 1491 đến 1515 ở trình tự SEQ ID NO:2 hoặc trình tự axit amin tương đồng). Một motif khác là motif giàu glyxin/prolin tiếp theo là axit aspartic bảo toàn (GPD), và bốn gốc xystein bảo toàn (ở vùng có các axit amin 1582 đến 1598 của trình tự SEQ ID NO:2) để giữ cụm [4Fe-4S] đúng chỗ. Còn có vùng giàu lysin (ví dụ, các axit amin 87 đến 139 ở trình tự SEQ ID NO:2 hoặc trình tự axit amin tương đồng). Không giống như các thành viên khác của siêu họ HhH ADN glycosylaza, các thành viên của họ polypeptit ROS1a chứa hai miền bảo toàn bổ sung (miền A và miền B) nằm bên sườn của miền glycosylaza trung tâm. Ở polypeptit ROS1a của lúa (SEQ ID NO:2), miền A xuất hiện ở các axit amin 859 đến 965, miền glycosylaza xuất hiện ở các axit amin 1403 đến 1616, và miền B xuất hiện ở các axit amin 1659 đến 1933. Miền A chứa cụm sọc hỗn hợp lặp lại ở các axit amin 882 đến 892. Hoạt tính ADN glycosylaza có thể được đo bằng cách áp dụng các kỹ thuật chuẩn đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, như được mô tả trong Ví dụ 8.

Các motif axit amin bảo toàn ở mức độ cao trong miền glycosylaza của polypeptit ROS1a của lúa loại thường bao gồm DHGSIDLEWLR (SEQ ID NO: 44, các axit amin 1467 đến 1477 ở trình tự SEQ ID NO:2), GLGLKSVECVRLTLHH (SEQ ID NO: 45, các axit amin 1493 đến 1509 ở trình tự SEQ ID NO:2), AFPVDTNVGRI (SEQ ID NO: 46, các axit amin 1511 đến 1521 ở trình tự SEQ ID NO:2), VRLGWVPLQPLPESLQLHLLE (SEQ ID NO: 47, các axit amin 1523 đến 1543 ở trình tự SEQ ID NO:2), ELHYQMITFGKVFCTKSKPNCN (SEQ ID NO: 48, các axit amin 1569 đến 1590 ở trình tự SEQ ID NO:2) và HFASAFASARLALP (SEQ ID NO: 49, các axit amin 1600 đến 1613 ở trình tự SEQ ID NO:2). Một hoặc hai thay thế axit amin có thể xuất hiện ở các motif này, hoặc không. Các axit amin bảo toàn khác có thể được xác định một cách dễ dàng nhờ việc duỗi thẳng các trình tự axit amin đối với ROS1a của lúa loại thường (SEQ ID NO:2) bằng polypeptit DME của *Arabidopsis thaliana* (SEQ ID NO:6) và/hoặc polypeptit ROS1a của *A. thaliana* (xem hình 4 và hình 5). Hướng dẫn thêm về việc xác định các axit amin bảo toàn có thể được tìm thấy trong tài liệu: Kapazoglou *et al.* (2012).

Các thuật ngữ “mà làm giảm hoạt tính ADN glycosylaza so với polypeptit ROS1a loại thường tương ứng”, “mà làm giảm, tốt hơn là không, hoạt tính ADN glycosylaza khi so với polypeptit ROS1a loại thường tương ứng”, hoặc các thuật ngữ

tương tự, được dùng trong bản mô tả này là các thuật ngữ so sánh, trong đó hoạt tính ADN glycosylaza của polypeptit ROS1a biến dị/đột biến là thấp hơn protein mà nó có nguồn gốc từ đó và/hoặc liên quan nhất tồn tại trong tự nhiên. Ví dụ, như người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể hiểu được, đột biến *ta2* của lúa được bộc lộ trong bản mô tả này (SEQ ID NO:1) có hoạt tính ADN glycosylaza giảm khi được so sánh với polypeptit ROS1a của lúa loại thường tương ứng (SEQ ID NO:2). Các ví dụ khác về polypeptit ROS1a có hoạt tính ADN glycosylaza giảm bao gồm các đột biến/biến thể tương ứng với các axit amin đã được bộc lộ trong Bảng 3 mà có kiểu hình aloron dày như thay thế serin ở vị trí axit amin tương ứng với axit amin số 156 của trình tự SEQ ID NO:2 bằng axit amin khác như phenylalanin, thay thế serin ở vị trí axit amin tương ứng với axit amin số 214 của trình tự SEQ ID NO:2 bằng axit amin khác như phenylalanin, thay thế serin ở vị trí axit amin tương ứng với axit amin số 1413 của trình tự SEQ ID NO:2 bằng axit amin khác như asparagin, thay thế alanin ở vị trí axit amin tương ứng với axit amin số 441 của trình tự SEQ ID NO:2 bằng axit amin khác như valin, thay thế serin ở vị trí axit amin tương ứng với axit amin số 1357 của trình tự SEQ ID NO:2 bằng axit amin khác như phenylalanin, thay thế lysin ở vị trí axit amin tương ứng với axit amin số 501 của trình tự SEQ ID NO:2 bằng axit amin khác như serin, và thay thế arginin ở vị trí axit amin tương ứng với axit amin số 482 của trình tự SEQ ID NO:2 bằng axit amin khác như lysin. Theo phương án được đặc biệt ưu tiên, hạt có ít nhất là một chút hoạt tính ADN glycosylaza, tốt hơn là một chút hoạt tính ADN glycosylaza của ROS1a, vì bằng chứng cho thấy rằng hiện tượng không có hoạt tính ADN glycosylaza ở tế bào trứng và ở giai đoạn sớm trong quá trình phát triển của hạt giống có ý nghĩa chí tử đối với cây lúa. Theo một phương án, hạt có ít hơn khoảng 30% đến 98%, hoặc khoảng 40% đến 98%, hoặc khoảng 40% đến 90%, hoặc khoảng 40% đến 85%, hoặc khoảng 40% đến 80%, hoạt tính ADN glycosylaza khi so với hạt từ cây tương ứng cùng nguồn gốc không có biến dị di truyền (tốt hơn là biến dị di truyền được đưa vào) mà làm giảm hoạt tính ADN glycosylaza trong hạt.

Thuật ngữ "polypeptit hầu như tinh khiết" hoặc "polypeptit tinh khiết" được dùng trong bản mô tả này để chỉ polypeptit mà thường được tách ra khỏi lipid, axit nucleic, các peptit khác, và các phân tử tạp nhiễm khác mà kết hợp với nó ở trạng thái tự nhiên. Tốt hơn, nếu polypeptit hầu như tinh khiết ít nhất là 90% không chứa các thành phần khác mà thường kết hợp với nó ở trong tự nhiên. Theo một phương án, polypeptit theo sáng chế có trình tự axit amin mà là khác polypeptit ROS1a có trong tự nhiên tức là nó là biến thể của trình tự axit amin, như nêu trên.

Hạt, cây và tế bào chủ theo sáng chế có thể chứa polynucleotit ngoại sinh ghi mã polypeptit theo sáng chế. Trong các ví dụ này, hạt, cây và tế bào tạo ra polypeptit tái tổ

hợp. Thuật ngữ "tái tổ hợp" liên quan đến polypeptit được dùng để chỉ polypeptit được ghi mã bởi polynucleotit ngoại sinh khi được tạo ra bởi tế bào, mà polynucleotit được đưa vào tế bào hoặc tế bào tiền thân theo các kỹ thuật ADN hoặc ARN tái tổ hợp, ví dụ, biến nạp. Nói chung, tế bào chứa gen phi nội sinh khiến tạo ra lượng polypeptit thay đổi. Theo một phương án, "polypeptit tái tổ hợp" là polypeptit được tạo nên nhờ sự biểu hiện của polynucleotit ngoại sinh (tái tổ hợp) trong tế bào thực vật.

Các thuật ngữ "polypeptit" và "protein" thường được sử dụng thay thế nhau.

Mức độ đồng nhất tính theo % của polypeptit được xác định theo phân tích GAP (xem tài liệu của Needleman và Wunsch, 1970) (chương trình GCG) với điểm trừ tạo khoảng cách=5, và điểm trừ cho việc kéo dài khoảng cách=0,3. Trình tự chất vẫn có chiều dài ít nhất là 1.000 axit amin, và phân tích GAP duỗi thẳng so sánh hai trình tự trên vùng gồm ít nhất là 1.000 axit amin. Tốt hơn nữa, trình tự chất vẫn có chiều dài ít nhất là 1.250 axit amin và phân tích GAP duỗi thẳng so sánh hai trình tự trên vùng gồm ít nhất là 1.250 axit amin. Tốt hơn nữa, trình tự chất vẫn có chiều dài ít nhất là 1.500 axit amin và phân tích GAP duỗi thẳng so sánh hai trình tự trên vùng gồm ít nhất là 1.500 axit amin. Còn tốt hơn nữa, phân tích GAP duỗi thẳng so sánh hai trình tự trên toàn bộ chiều dài của chúng, mà đối với polypeptit ROS1a nằm trong khoảng từ 1.800 đến 2.100 gốc axit amin.

Liên quan đến một polypeptit nhất định, có thể thấy rằng các số liệu về mức độ đồng nhất tính theo % cao hơn các số liệu đã nêu sẽ bao gồm các phương án được ưu tiên. Do đó, nếu thích hợp, trên cơ sở các số liệu về mức độ đồng nhất tính theo % tối thiểu, tốt hơn là polypeptit có trình tự axit amin mà là đồng nhất ít nhất là 95%, tốt hơn nữa nếu ít nhất là 96%, tốt hơn nữa nếu ít nhất là 97%, tốt hơn nữa nếu ít nhất là 98%, tốt hơn nữa nếu ít nhất là 99%, tốt hơn nữa nếu ít nhất là 99,1%, tốt hơn nữa nếu ít nhất là 99,2%, tốt hơn nữa nếu ít nhất là 99,3%, tốt hơn nữa nếu ít nhất là 99,4%, tốt hơn nữa nếu ít nhất là 99,5%, tốt hơn nữa nếu ít nhất là 99,6%, tốt hơn nữa nếu ít nhất là 99,7%, tốt hơn nữa nếu ít nhất là 99,8%, và còn tốt hơn nữa nếu ít nhất là 99,9%, với trình tự có liên quan đã được chỉ định.

Thuật ngữ "tại vị trí tương ứng với axit amin số", hoặc các biến thể của nó, được dùng trong bản mô tả này để chỉ vị trí tương đối của axit amin so với các axit amin xung quanh. Liên quan đến vấn đề này, theo một số phương án polypeptit theo sáng chế có thể có đột biến loại bỏ hoặc đột biến thay thế mà làm thay đổi sự xác định vị trí tương đối của axit amin khi được duỗi thẳng so với, ví dụ, SEQ ID NO: 2. Việc xác định vị trí axit amin tương ứng giữa hai protein có liên quan gần là nằm trong hiểu biết của người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Đột biến về trình tự axit amin của polypeptit theo sáng chế có thể được tạo ra bằng cách đưa các thay đổi nucleotit thích hợp vào axit nucleic theo sáng chế, hoặc bằng cách tổng hợp polypeptit mong muốn *in vitro*. Các đột biến bao gồm, ví dụ, loại bỏ, cài xen hoặc thay thế các gốc trong trình tự axit amin. Việc kết hợp loại bỏ, cài xen và thay thế có thể được thực hiện để đạt được cấu trúc cuối cùng, với điều kiện sản phẩm peptit cuối cùng có các đặc tính mong muốn. Trình tự axit amin đột biến được ưu tiên chỉ có một, hai, ba, bốn hoặc ít hơn 10 thay đổi về axit amin so với polypeptit dạng thường tham chiếu. Các polypeptit đột biến theo sáng chế làm giảm “hoạt tính của polypeptit ROS1a” khi so với polypeptit ROS1a loại thường tương ứng có trong tự nhiên như polypeptit mà có trình tự axit amin thể hiện ở SEQ ID NO: 2.

Các polypeptit đột biến (đã biến đổi) có thể được tạo ra bằng cách áp dụng kỹ thuật bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, bằng cách áp dụng chiến lược tiến hóa có định hướng hoặc chiến lược thiết kế hợp lý (xem dưới đây). Các sản phẩm thu được từ ADN đột biến/đã thay đổi có thể dễ dàng được sàng lọc bằng cách áp dụng các kỹ thuật đã được bộc lộ trong bản mô tả này để xác định liệu chúng có hoạt tính polypeptit ROS1a giảm, như hoạt tính ADN glycosylaza giảm, hay không khi so với một hoặc nhiều hoặc tất cả các polypeptit ROS1a mà có trình tự axit amin đã được nêu ở SEQ ID NO: 2. Ví dụ, phương pháp có thể bao gồm việc tạo ra thực vật chuyển gen biểu hiện ADN đột biến/đã thay đổi và xác định i) tác động của ADN đột biến/đã thay đổi đến độ dày của aloron và ii) liệu gen *ROS1a* đã bị đột biến/thay đổi hay chưa.

Trong quá trình thiết kế trình tự axit amin đột biến, việc định vị vị trí đột biến và bản chất của đột biến sẽ phụ thuộc vào (các) đặc tính cần được cải biến. Các vị trí để đột biến có thể được cải biến riêng lẻ hoặc hàng loạt, ví dụ, bằng cách (1) thay thế bằng các lựa chọn axit amin không bảo toàn, (2) xóa bỏ gốc đích, hoặc (3) cài xen các gốc khác liền kề với vị trí đã định.

Việc loại bỏ trình tự axit amin thường nằm trong khoảng từ 1 đến 15 gốc, tốt hơn nữa khoảng từ 1 đến 10 gốc và thường khoảng từ 1 đến 5 gốc liền kề.

Đột biến thay thế có ít nhất là một gốc axit amin trong phân tử polypeptit được loại ra và một gốc khác được cài xen vào vị trí của nó. Nếu không mong muốn duy trì một hoạt tính nhất định, hoặc làm giảm một hoạt tính nhất định, thì ưu tiên tạo ra các thay thế không bảo toàn, đặc biệt là ở vị trí axit amin mà được bảo toàn ở mức độ cao trong họ protein liên quan. Các ví dụ về thay thế bảo toàn được thể hiện trong Bảng 1, và do đó các thay thế không bảo toàn sẽ là các thay thế không được thể hiện trong Bảng 1.

Theo một phương án, polypeptit đột biến/biến dị có một hoặc hai hoặc ba hoặc bốn thay đổi về axit amin khi so với polypeptit có trong tự nhiên. Theo một phương án

được ưu tiên, các thay đổi này là ở một hoặc nhiều motif mà được bảo toàn ở mức độ cao giữa các polypeptit ROS1a khác nhau theo sáng chế, đặc biệt là ở các miền cấu trúc bảo toàn đã biết. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này cần phải hiểu rằng hoàn toàn có thể dự đoán rằng các thay đổi này làm thay đổi hoạt tính của polypeptit khi được biểu hiện ở tế bào.

Trình tự axit amin bậc nhất của polypeptit theo sáng chế có thể được dùng để thiết kế các thể biến dị/các thể đột biến của nó trên cơ sở so sánh với enzym có liên quan gần, đặc biệt là các ADN glycosylaza. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này biết rằng các gốc được bảo toàn ở mức độ cao trong số các protein có liên quan gần dễ có khả năng được biến đổi, đặc biệt là bằng các thay thế không bảo toàn, và có hoạt tính giảm thấp hơn các gốc được bảo toàn ở mức độ thấp hơn (xem trên đây).

Bảng 1. Các thay thế bảo toàn.

Gốc ban đầu	Các thay thế bảo toàn
Ala (A)	val; leu; ile; gly
Arg (R)	lys
Asn (N)	gln; his
Asp (D)	glu
Cys (C)	ser
Gln (Q)	asn; his
Glu (E)	asp
Gly (G)	pro, ala
His (H)	asn; gln
Ile (I)	leu; val; ala
Leu (L)	ile; val; met; ala; phe
Lys (K)	arg
Met (M)	leu; phe
Phe (F)	leu; val; ala
Pro (P)	gly
Ser (S)	thr
Thr (T)	ser
Trp (W)	tyr
Tyr (Y)	trp; phe
Val (V)	ile; leu; met; phe, ala

Các polypeptit theo sáng chế mà là được cải biến khác nhau sau quy trình tổng hợp, ví dụ, bằng cách cải biến sau dịch mã trong tế bào, ví dụ, bằng cách phosphoryl hóa, mà có thể điều biến hoạt tính của nó, cũng nằm trong phạm vi của sáng chế.

Polynucleotit và gen

Sáng chế đề xuất các polynucleotit khác nhau. Các thuật ngữ "polynucleotit" hoặc "axit nucleic" hoặc "phân tử axit nucleic" được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là polyme gồm các nucleotit, mà có thể là ADN hoặc ARN, và bao gồm ADN hệ gen, ARN thông tin, ARN bổ sung, ARN sợi đôi, và ADN bổ trợ. Nó có thể là ADN hoặc ARN có nguồn gốc tế bào, hệ gen hoặc tổng hợp, ví dụ, được tạo ra trên thiết bị tổng hợp tự động, và có thể được kết hợp với hydrat cacbon, lipid, protein hoặc nguyên liệu khác, được đánh dấu bằng nhóm huỳnh quang hoặc nhóm khác, hoặc được gắn vào nền rắn để thực hiện một hoạt tính cụ thể bộc lộ trong bản mô tả này, hoặc bao gồm một hoặc nhiều nucleotit đã được cải biến mà không tìm thấy trong tự nhiên, đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Polyme có thể là sợi đơn, cơ bản là sợi đôi hoặc một phần là sợi đôi. Thuật ngữ ghép cặp bazơ được dùng trong bản mô tả này để chỉ sự ghép cặp bazơ chuẩn giữa các nucleotit, kể cả các cặp bazơ G:U. "Bổ trợ" có nghĩa là hai polynucleotit có khả năng ghép cặp bazơ (lai) dọc theo một phần chiều dài của chúng, hoặc dọc theo toàn bộ chiều dài của một hoặc cả hai. Một "polynucleotit lai" có nghĩa là polynucleotit thực ra được ghép cặp bazơ với trình tự bổ trợ của nó. Thuật ngữ "polynucleotit" được trong bản mô tả này sử dụng thay thế lẫn nhau với thuật ngữ "axit nucleic". Các polynucleotit được ưu tiên theo sáng chế ghi mã polypeptit theo sáng chế.

Thuật ngữ "polynucleotit phân lập" được dùng trong bản mô tả này để chỉ polynucleotit mà thường được tách ra khỏi các trình tự polynucleotit mà nó kết hợp với hoặc liên kết ở trạng thái tự nhiên, nếu polynucleotit đó được tìm thấy trong tự nhiên. Tốt hơn, nếu polynucleotit phân lập ít nhất là 90% không chứa các thành phần khác mà thường kết hợp với nó ở trong tự nhiên, nếu nó được tìm thấy trong tự nhiên. Tốt hơn, nếu polynucleotit không có trong tự nhiên, ví dụ, bằng cách liên kết cộng hóa trị hai trình tự polynucleotit ngắn hơn theo cách không được tìm thấy trong tự nhiên (polynucleotit khảm).

Sáng chế bao gồm việc làm giảm hoạt tính của gen và việc xây dựng và việc sử dụng gen khảm. Thuật ngữ "gen" được dùng trong bản mô tả này để chỉ trình tự deoxyribonucleotit bất kỳ mà bao gồm vùng mã hóa protein hoặc được phiên mã trong tế bào nhưng không được dịch mã, cũng như các vùng điều biến và không mã hóa liên

quan. Các vùng liên quan thường nằm liền kề vùng mã hóa hoặc vùng được phiên mã ở cả đầu tận cùng 5' và đầu tận cùng 3' với khoảng cách khoảng 2kb về mỗi bên. Liên quan đến vấn đề này, gen có thể bao gồm các tín hiệu kiểm soát như các gen khởi đầu, các gen tăng cường, tín hiệu kết thúc và/hoặc tín hiệu polyadenyl hóa mà có liên quan trong tự nhiên với gen nhất định, hoặc các tín hiệu kiểm soát khác loại trong trường hợp đó gen được gọi là "gen khảm". Các trình tự mà nằm ở vị trí 5' của vùng mã hóa và có mặt trong ARN thông tin được gọi là trình tự không được dịch mã ở đầu tận cùng 5'. Các trình tự mà nằm ở vị trí 3' hoặc sau vùng mã hóa và có mặt trong ARN thông tin được gọi là trình tự không được dịch mã ở đầu tận cùng 3'. Thuật ngữ "gen" bao hàm cả ADN bổ trợ và dạng hệ gen của gen.

Thuật ngữ "alen" được dùng để chỉ một dạng đặc biệt của trình tự vật chất di truyền (như gen) trong một tế bào, một cây hoặc trong một quần thể, dạng đặc biệt này khác biệt với các dạng khác của cùng gen về trình tự của ít nhất là một, và thường là nhiều hơn một, vị trí biến dị trong trình tự gen. Các trình tự ở các vị trí biến dị này mà khác biệt giữa các alen khác nhau được gọi là "các phương sai", hoặc "các dạng đa hình". Thuật ngữ "dạng đa hình" được dùng trong bản mô tả này biểu thị biến dị trong trình tự nucleotit giữa các alen tại locus di truyền theo sáng chế, của các loài, các cây trồng, các chủng hoặc các cá thể thực vật khác nhau. Một "vị trí đa hình" là vị trí nucleotit đã được chọn trước trong trình tự của gen mà khác biệt về trình tự xảy ra tại đó. Trong một số trường hợp, hiện tượng đa hình di truyền gây ra biến dị về trình tự axit amin trong polypeptit được ghi mã bởi gen, và do đó vị trí đa hình có thể trở thành nơi xảy ra hiện tượng đa hình về trình tự axit amin tại vị trí đã định trước trong trình tự polypeptit. Theo các ví dụ khác, vùng đa hình có thể nằm ở vùng không ghi mã polypeptit của gen, ví dụ, trong vùng gen khởi đầu và do đó có thể ảnh hưởng đến mức độ biểu hiện của gen. Các dạng đa hình điển hình là loại bỏ, cài xen hoặc thay thế. Các dạng này có thể bao gồm một nucleotit (hiện tượng đa hình đơn nucleotit hay SNP) hoặc hai hoặc nhiều nucleotit.

Thuật ngữ "đột biến" được dùng trong bản mô tả này là hiện tượng đa hình mà tạo ra thay đổi về kiểu hình ở cây hoặc một phần của nó. Như đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, một số dạng đa hình là câm, ví dụ, thay đổi một nucleotit ở vùng mã hóa protein mà không thay đổi trình tự axit amin của polypeptit được mã hóa do thừa mã di truyền. Cây lưỡng bội thường sẽ có một hoặc hai alen khác nhau của một gen, nhưng chỉ một nếu cả hai bản sao của gen là giống hệt nhau, tức là cây này là đồng hợp tử đối với alen đó. Các cây đa bội thường có nhiều hơn một thể tương đồng của gen cụ thể bất kỳ. Ví dụ, lúa mỳ lục bội có ba hệ gen phụ (thường được gọi là "hệ gen") được đặt tên

là các hệ gen A, B và D, và do đó có ba thể tương đồng của hầu hết các gen của nó, một thể tương đồng ở mỗi hệ gen A, B và D.

Thuật ngữ “gen *ROS1a* ghi mã polypeptit ROS1a” hoặc “gen *ROS1a*” được dùng trong bản mô tả này để chỉ trình tự nucleotit mà ghi mã polypeptit ROS1a như được xác định trong bản mô tả này. gen *ROS1a* có thể là gen nội sinh có trong tự nhiên, hoặc mang biến dị di truyền (tốt hơn là biến dị di truyền được đưa vào) như được xác định trong bản mô tả này. gen *ROS1a* ghi mã polypeptit ROS1a ở hạt theo sáng chế có thể có hoặc có thể không có intron. Theo một ví dụ, hạt theo sáng chế là từ lúa và ít nhất là một alen của gen *ROS1a* ghi mã polypeptit ROS1a với hoạt tính ADN glycosylaza giảm khi được so với polypeptit ROS1a từ cây lúa loại thường tương ứng (như mà chứa trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO: 2). Ví dụ về polypeptit ROS1a với hoạt tính ADN glycosylaza giảm này là đột biến Ta2 của lúa (SEQ ID NO:1).

Thuật ngữ “hoặc làm bất hoạt gen *ROS1a*” hoặc “giảm mức độ biểu hiện của gen *ROS1a*” hoặc các biến thể của chúng được dùng trong bản mô tả này để chỉ biến dị di truyền bất kỳ mà làm giảm (một phần), hoặc ngăn ngừa hoàn toàn, sự biểu hiện của gen ghi mã polypeptit ROS1a chức năng. Các biến dị di truyền bao gồm các đột biến ở vùng gen khởi đầu của gen mà làm giảm mức độ phiên mã của gen được phiên mã, ví dụ, bằng cách áp dụng kỹ thuật biên tập gen để loại bỏ hoặc thế các nucleotit từ gen khởi đầu của gen *ROS1a*, hoặc các đột biến ghép nối intron mà làm thay đổi lượng hoặc vị trí ghép nối để tạo ra ARN thông tin.

Dạng hệ gen hoặc dòng gen chứa vùng được phiên mã có thể bị phá vỡ bằng các trình tự không mã hóa được gọi là “các intron” hoặc “các vùng can thiệp” hoặc “các trình tự can thiệp”, mà có thể là tương đồng hoặc khác loại liên quan đến “các exon” của gen. Thuật ngữ “intron” được dùng trong bản mô tả này là một đoạn của gen mà được phiên mã làm một phần của bản sao bậc nhất của ARN nhưng không có mặt trong phân tử ARN thông tin thành thực. Các intron được loại ra hoặc “bị cắt bỏ” khỏi nhân hoặc bản sao sơ cấp; do đó các intron vắng mặt ở ARN thông tin (mRNA). Thuật ngữ “exon” được dùng trong bản mô tả này để chỉ các vùng ADN tương ứng với các trình tự ARN có mặt ở ARN thông tin thành thực hoặc phân tử ARN thành thực trong các trường hợp mà ở đó phân tử ARN không được dịch mã. ARN thông tin hoạt động trong quá trình dịch mã để cụ thể hóa trình tự hoặc thứ tự của các axit amin ở polypeptit mới có. Thuật ngữ “gen” bao gồm phân tử tổng hợp hoặc phân tử dung hợp ghi mã toàn bộ hoặc một phần của các protein theo sáng chế được bộc lộ trong bản mô tả này và trình tự nucleotit hỗ trợ cho trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trên. Gen có thể được

đưa vào vật truyền thích hợp để duy trì ngoài nhiễm sắc thể trong tế bào hoặc, tốt hơn là, nhằm hợp nhất vào hệ gen của vật chủ.

Thuật ngữ "gen khảm" được dùng trong bản mô tả này để chỉ gen bất kỳ mà chứa các trình tự liên kết cộng hóa trị mà không được thấy liên kết trong tự nhiên. Nói chung, gen khảm chứa trình tự điều hòa và được phiên mã hoặc trình tự protein ghi mã mà không được thấy cùng nhau trong tự nhiên. Do đó, gen khảm có thể bao gồm các trình tự điều hòa và các trình tự ghi mã mà thu được từ các nguồn khác nhau, hoặc các trình tự điều hòa và các trình tự ghi mã thu được từ cùng nguồn, nhưng được bố trí theo cách khác cách tìm thấy trong tự nhiên. Theo một phương án, vùng ghi mã protein của gen *ROS1a* được liên kết khi hoạt động với gen khởi đầu hoặc vùng polyadenyl hóa/vùng kết thúc mà là khác loại đối với gen *ROS1a*, nhờ đó tạo ra gen khảm. Theo một phương án khác, gen ghi mã polynucleotit mà, khi có mặt trong hạt lúa, điều tiết giảm sản lượng và/hoặc hoạt tính của polypeptit ROS1a trong hạt được liên kết khi hoạt động với gen khởi đầu hoặc vùng polyadenyl hóa/vùng kết thúc mà là khác loại đối với polynucleotit, nhờ đó tạo ra gen khảm.

Thuật ngữ "nội sinh" được dùng trong bản mô tả này để chỉ chất mà thường có mặt hoặc được tạo ra ở cây chưa được cải biến ở cùng giai đoạn phát triển như cây đang được khảo sát. Thuật ngữ "gen nội sinh" được dùng để chỉ gen tự nhiên ở vị trí tự nhiên của nó trong hệ gen của một sinh vật. Các thuật ngữ "phân tử axit nucleic tái tổ hợp", "polynucleotit tái tổ hợp" hoặc các biến thể của chúng được dùng trong bản mô tả này để chỉ phân tử axit nucleic mà được cấu trúc hoặc được cải biến theo kỹ thuật ADN tái tổ hợp. Các thuật ngữ "polynucleotit lạ" hoặc "polynucleotit ngoại sinh" hoặc "polynucleotit khác loài" và các thuật ngữ tương tự được dùng để chỉ axit nucleic bất kỳ mà được đưa vào hệ gen của tế bào nhờ các thao tác thí nghiệm.

Gen lạ hoặc gen ngoại sinh có thể là gen mà được cài xen vào a sinh vật không tự nhiên, gen tự nhiên được đưa vào vị trí mới trong vật chủ tự nhiên, hoặc gen khảm. Thuật ngữ "gen chuyển" có nghĩa là gen mà được đưa vào hệ gen theo quy trình biến nạp. Thuật ngữ "được cải biến về mặt di truyền" bao gồm việc đưa gen vào các tế bào bằng cách biến nạp hoặc tải nạp, gây đột biến ở các tế bào và làm thay đổi hoặc điều biến quá trình điều chỉnh gen ở tế bào hoặc sinh vật mà các bước này đã được thực hiện hoặc thể hệ con của chúng.

Ngoài ra, thuật ngữ "ngoại sinh" liên quan đến polynucleotit (axit nucleic) được dùng để chỉ polynucleotit khi có trong tế bào mà trong tự nhiên không bao gồm polynucleotit này. Tế bào này có thể là tế bào mà chứa polynucleotit phi nội sinh tạo ra sản lượng thay đổi của polypeptit được mã hóa, ví dụ, polynucleotit ngoại sinh mà làm tăng mức độ biểu hiện của polypeptit nội sinh, hoặc tế bào mà trong trạng thái tự nhiên

của nó không sản sinh polypeptit này. Sản lượng tăng của polypeptit theo sáng chế còn được gọi là “sự biểu hiện quá mức” trong bản mô tả này. Polynucleotit ngoại sinh theo sáng chế bao gồm các polynucleotit mà không được tách ra khỏi các thành phần khác của tế bào chuyển gen (tái tổ hợp), hoặc hệ biểu hiện không bao gồm tế bào, nơi nó có mặt, và các polynucleotit sản sinh ra trong các tế bào này hoặc hệ không tế bào mà sau đó được tinh chế ra khỏi ít nhất một số thành phần khác. Polynucleotit ngoại sinh (axit nucleic) có thể là sợi kéo dài nucleotit liên tiếp có trong tự nhiên, hoặc bao gồm hai hoặc nhiều sợi kéo dài nucleotit liên tiếp từ các nguồn khác nhau (xảy ra trong tự nhiên và/hoặc tổng hợp) kết hợp để tạo ra một polynucleotit. Thông thường, các polynucleotit khảm này bao gồm ít nhất khung đọc mở ghi mã polypeptit theo sáng chế được liên kết khi hoạt động với gen khởi đầu thích hợp cho việc dẫn quá trình phiên mã khung đọc mở trong tế bào đáng quan tâm.

Mức độ đồng nhất tính theo % của polynucleotit được xác định theo phân tích GAP (xem tài liệu của Needleman và Wunsch, 1970) (chương trình GCG) với điểm trừ cho việc tạo khoảng cách=5, và điểm trừ cho việc kéo dài khoảng cách=0,3. Trình tự chất vẫn có chiều dài ít nhất là 3.000 nucleotit, và phân tích GAP đuôi thẳng so sánh hai trình tự trên vùng gồm ít nhất là 3.000 nucleotit. Còn tốt hơn nữa, trình tự chất vẫn có chiều dài ít nhất là 3.750 nucleotit và phân tích GAP đuôi thẳng so sánh hai trình tự trên vùng gồm ít nhất là 3.750 nucleotit. Còn tốt hơn nữa, trình tự chất vẫn có chiều dài ít nhất là 4.500 nucleotit và phân tích GAP đuôi thẳng so sánh hai trình tự trên vùng gồm ít nhất 4.500 nucleotit. Còn tốt hơn nữa, phân tích GAP đuôi thẳng so sánh hai trình tự trên toàn bộ chiều dài của chúng.

Liên quan đến các polynucleotit đã định, có thể thấy rằng các số liệu mức độ đồng nhất tính theo % cao hơn các số liệu đã nêu sẽ bao gồm các phương án được ưu tiên. Do đó, nếu thích hợp, trên cơ sở các số liệu tối thiểu về mức độ đồng nhất tính theo %, tốt hơn là polynucleotit có trình tự polynucleotit mà là đồng nhất ít nhất là 95%, tốt hơn nữa nếu ít nhất là 96%, tốt hơn nữa nếu ít nhất là 97%, tốt hơn nữa nếu ít nhất là 98%, tốt hơn nữa nếu ít nhất là 99%, tốt hơn nữa nếu ít nhất là 99,1%, tốt hơn nữa nếu ít nhất là 99,2%, tốt hơn nữa nếu ít nhất là 99,3%, tốt hơn nữa nếu ít nhất là 99,4%, tốt hơn nữa nếu ít nhất là 99,5%, tốt hơn nữa nếu ít nhất là 99,6%, tốt hơn nữa nếu ít nhất là 99,7%, tốt hơn nữa nếu ít nhất là 99,8%, và còn tốt hơn nữa nếu ít nhất là 99,9% với trình tự liên quan đã định.

Sáng chế còn đề xuất việc sử dụng các oligonucleotit, ví dụ trong các phương pháp sàng lọc polynucleotit theo sáng chế, hoặc ghi mã polypeptit theo sáng chế. Thuật ngữ "oligonucleotit" được dùng trong bản mô tả này là các polynucleotit có chiều dài đến 50 nucleotit. Kích thước tối thiểu của các oligonucleotit này là kích thước cần thiết

để tạo ra thể lai ổn định giữa oligonucleotit và trình tự bổ trợ trên phân tử axit nucleic theo sáng chế. Chúng có thể là ARN, ADN, hoặc kết hợp hoặc các chất dẫn xuất của chúng. Các oligonucleotit thường là các phân tử sợi đơn tương đối ngắn có chiều dài gồm 10 đến 30 nucleotit, thường là 15 đến 25 nucleotit. Khi được dùng làm mẫu hoặc làm đoạn môi trong phản ứng khuếch đại, kích thước tối thiểu của oligonucleotit này là kích thước cần thiết để tạo ra thể lai ổn định giữa oligonucleotit và trình tự bổ trợ trên phân tử axit nucleic đích. Tốt hơn, nếu các oligonucleotit này có chiều dài ít nhất là 15 nucleotit, tốt hơn nữa nếu ít nhất là 18 nucleotit, tốt hơn nữa nếu ít nhất là 19 nucleotit, tốt hơn nữa nếu ít nhất là 20 nucleotit, còn tốt hơn nữa nếu ít nhất là 25 nucleotit. Các oligonucleotit theo sáng chế được dùng làm mẫu thường được tiếp hợp với nhãn như đồng vị phóng xạ, enzym, biotin, phân tử có huỳnh quang hoặc phân tử phát quang hóa học.

Sáng chế bao gồm các oligonucleotit mà có thể được sử dụng, ví dụ, làm mẫu dò để xác định các phân tử axit nucleic, hoặc làm các đoạn môi để tạo ra các phân tử axit nucleic. Các mẫu dò và/hoặc các đoạn môi có thể được sử dụng để tách dòng các thể tương đồng của các polynucleotit theo sáng chế từ các loài khác. Hơn thế nữa, các kỹ thuật lai đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này cũng có thể được áp dụng để sàng lọc thư viện hệ gen hoặc thư viện ADN bổ trợ đối với các thể tương đồng này.

Các polynucleotit và các oligonucleotit theo sáng chế bao gồm các phân tử mà lai trong các điều kiện nghiêm ngặt với một hoặc nhiều trình tự đã được nêu ở SEQ ID NO: 1 hoặc 2. Thuật ngữ các điều kiện nghiêm ngặt được dùng trong bản mô tả này để chỉ các điều kiện mà (1) sử dụng cường độ ion thấp và nhiệt độ cao để rửa, ví dụ, 0,015M NaCl/0,0015M natri xitrat/0,1% NaDodSO₄ ở 50°C; (2) sử dụng trong quá trình lai tác nhân làm biến tính như formamit, ví dụ, 50% (thể tích) formamit với 0,1% albumin huyết thanh bò, 0,1% Ficoll, 0,1% polyvinylpyrrolidon, 50mM dung dịch đệm natri phosphat ở độ pH=6,5 với 750mM NaCl, 75mM natri xitrat ở 42°C; hoặc (3) sử dụng 50% formamit, 5 x SSC (0,75M NaCl, 0,075M natri xitrat), 50mM natri phosphat (độ pH=6,8), 0,1% natri pyrophosphat, 5 x dung dịch Denhardt, ADN tinh dịch cá hồi đã được nghiền bằng sóng âm (50g/ml), 0,1% SDS và 10% dextran sulfat ở 42°C trong 0,2 x SSC và 0,1% SDS.

Các polynucleotit theo sáng chế có thể chứa, khi so với các phân tử có trong tự nhiên, một hoặc nhiều đột biến mà là loại bỏ, cài xen, hoặc thay thế các gốc nucleotit. Đột biến có thể có trong tự nhiên (tức là, phân lập được từ nguồn tự nhiên) hoặc tổng hợp (ví dụ, bằng cách thực hiện gây đột biến định hướng điểm trên axit nucleic). Biến thể của polynucleotit hoặc oligonucleotit theo sáng chế bao gồm các phân tử có kích thước thay đổi, và/hoặc có khả năng lai với, hệ gen của lúa gặt gần với kích thước của các

phân tử polynucleotit hoặc oligonucleotit tham chiếu đã được bộc lộ trong bản mô tả này, tốt hơn là gen *ROS1a* nội sinh. Ví dụ, các biến thể có thể bao gồm các nucleotit bổ sung (như 1, 2, 3, 4, hoặc nhiều), hoặc ít nucleotit hơn chừng nào chúng vẫn lai với vùng đích. Hơn thế nữa, một vài nucleotit có thể được thể mà không ảnh hưởng đến khả năng của oligonucleotit lai với vùng đích. Ngoài ra, các biến thể có thể dễ dàng được thiết kế mà lai gần với, ví dụ, trong khoảng 50 nucleotit, vùng của hệ gen của thực vật đó khi oligonucleotit cụ thể như được xác định trong bản mô tả này lai. Cụ thể, nó bao gồm các polynucleotit mà ghi mã cùng một trình tự polypeptit hoặc cùng một trình tự axit amin nhưng thay đổi về trình tự nucleotit do thừa mã di truyền. Các thuật ngữ "biến thể polynucleotit" và "biến thể" còn bao gồm các biến thể alen có trong tự nhiên.

Các biến dị di truyền

Thuật ngữ “biến dị di truyền” được dùng trong bản mô tả này để chỉ một hoặc nhiều tế bào của hạt, tốt hơn là các tế bào ở ít nhất là một hoặc nhiều hoặc tất cả aloron, vỏ quả, phần lõi ra ở nhân, bầu nhụy, vỏ ngoài của hạt và nội nhũ tinh bột của hạt đang phát triển, hoặc của cây hoặc một phần của nó theo sáng chế mà có cải biến di truyền mà có thể được đưa vào bởi con người, hoặc có thể xuất hiện ở cây lúa trong tự nhiên (ví dụ, được lai chéo để tạo ra cây theo sáng chế).

Thuật ngữ “một hoặc nhiều biến dị di truyền được đưa vào” được dùng trong bản mô tả này để chỉ một hoặc nhiều tế bào của hạt, tốt hơn là các tế bào ở ít nhất là một hoặc nhiều hoặc tất cả aloron, vỏ quả, phần lõi ra ở nhân, bầu nhụy, vỏ ngoài của hạt và nội nhũ tinh bột của hạt đang phát triển, hoặc của cây hoặc một phần của nó theo sáng chế mà có cải biến di truyền được đưa vào bởi con người. Theo một phương án được ưu tiên, từng tế bào trong hạt hoặc cây hoặc phần của nó chứa biến dị di truyền được đưa vào. Như người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này hiểu được, có nhiều loại cải biến di truyền khác nhau mà có thể được tạo ra như, nhưng không chỉ giới hạn ở, cấu trúc nucleic ghi mã polynucleotit ngoại sinh mà làm giảm mức độ biểu hiện của gen *ROS1a* (như phân tử ARN sợi đôi hoặc ARN cỡ micro), cấu trúc nucleic ghi mã polynucleotit ngoại sinh mà ghi mã polypeptit *ROS1a* mà trình tự axit amin của nó là khác trình tự axit amin của polypeptit *ROS1a* loại thường tương ứng và có hoạt tính ADN glycosylaza giảm (tốt hơn là một chút nhưng có thể là không) khi so với polypeptit *ROS1a* loại thường tương ứng, hện gen được xử lý bằng cách biên tập gen để làm giảm hoạt tính của gen *ROS1a* nội sinh, và bằng cách sử dụng TILLING để đưa các đột biến vào và chọn các cây tạo ra hạt có hoạt tính ADN glycolyaza giảm ở polypeptit *ROS1a*.

Thuật ngữ “làm giảm hoạt tính của ít nhất là một gen *ROS1a*”, khi đề cập đến “một hoặc nhiều biến dị di truyền” hoặc “một hoặc nhiều biến dị di truyền được đưa vào”, được dùng trong bản mô tả này để chỉ biến dị di truyền tạo ra giảm lượng hoặc hoạt tính của polypeptit *ROS1a* được biểu hiện bằng gen khi so với cây lúa loại thường tương ứng. Theo một phương án, hạt này chứa polypeptit *ROS1a* có ít nhất là một chút hoạt tính ADN glycolyaza.

Theo một phương án, biến dị di truyền không điều tiết giảm hoạt tính ADN glycolyaza của polypeptit không là *ROS1a*. Ví dụ, biến dị di truyền không làm giảm hoạt tính ADN glycosylaza của từng polypeptit trong số các polypeptit *ROS1b*, *ROS1c* và *ROS1d* nhiều hơn 10% hoặc 30% ở cây lúa theo sáng chế. Theo cách khác, biến dị di truyền làm giảm hoạt tính ADN glycosylaza của ít nhất là một trong số các polypeptit *ROS1b*, *ROS1c* và *ROS1d* ít nhất là 30%.

ARN can thiệp

ARN can thiệp (RNAi) là đặc biệt hữu ích để làm giảm một cách rõ rệt mức độ biểu hiện của gen, mà dẫn đến giảm sản lượng của một protein cụ thể nếu gen này mã hóa một protein. Mặc dù không muốn bị ràng buộc bởi lý thuyết, Waterhouse và các đồng tác giả (1998) đã đề xuất mô hình về cơ chế mà theo đó ARN sợi đôi (ARN kép) có thể được dùng để làm giảm sản lượng protein. Công nghệ này dựa vào sự có mặt của các phân tử ARN sợi đôi mà chứa trình tự mà hầu như đồng nhất với ARN thông tin của gen đáng quan tâm hoặc phần của chúng. Một cách thuận tiện, ARN sợi đôi có thể được tạo ra từ một gen khởi đầu trong vật truyền tái tổ hợp hoặc tế bào chủ, khi trình tự có nghĩa và trình tự đối nghĩa được bọc sườn bằng một trình tự không liên quan mà cho phép trình tự có nghĩa và trình tự đối nghĩa lai để tạo ra phân tử ARN sợi đôi với trình tự không liên quan tạo ra cấu trúc quai. Thiết kế và quá trình tạo ra các phân tử ARN sợi đôi thích hợp nằm trong phạm vi của người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, đặc biệt xem các tài liệu: Waterhouse *et al.* (1998), Smith *et al.* (2000), WO 99/32619, WO 99/53050, WO 99/49029 và WO 01/34815.

Theo một ví dụ, ADN được đưa vào mà điều khiển quy trình tổng hợp (các) sản phẩm ARN sợi đôi ít nhất là một phần tương đồng với gen *ROS1a*. Do đó, ADN này chứa cả trình tự có nghĩa và trình tự đối nghĩa mà, khi được phiên mã vào ARN, có thể lai để tạo ra vùng ARN sợi đôi. Theo một phương án của sáng chế, trình tự có nghĩa và trình tự đối nghĩa được tách bởi vùng đệm mà chứa intron mà, khi được phiên mã vào ARN, thì bị cắt bỏ. Đã thấy rằng cách bố trí này tạo ra hiệu quả làm câm gen cao hơn (Smith *et al.*, 2000). Vùng sợi đôi có thể bao gồm một hoặc hai phân tử ARN, đã được phiên mã từ một vùng ADN hoặc hai. Sự có mặt của phân tử sợi đôi được xem là khơi

mào đáp ứng từ hệ nội sinh mà phá hủy cả ARN sợi đôi và cả bản sao ARN tương đồng từ gen đích, làm giảm hiệu quả hoặc loại bỏ hoạt tính của gen đích.

Chiều dài của trình tự có nghĩa và trình tự đối nghĩa mà lai cần ít nhất là 19 nucleotit liền kề, tốt hơn nếu ít nhất là 30 hoặc ít nhất 50 nucleotit liền kề, tốt hơn nữa nếu ít nhất là 100 hoặc ít nhất 200 nucleotit liền kề. Nói chung, trình tự gồm 100 đến 1000 nucleotit tương ứng với vùng của ARN thông tin của gen đích được sử dụng. Trình tự dài đầy đủ tương ứng với bản sao của toàn bộ gen có thể được sử dụng. Mức độ đồng nhất của trình tự có nghĩa với bản sao đích (và do đó cả mức độ đồng nhất của gen đối nghĩa trình tự so với sự bổ trợ của bản sao đích) cần ít nhất là 85%, ít nhất là 90%, hoặc nằm trong khoảng từ 95% đến 100%, tốt hơn là đồng nhất với trình tự đích. Tất nhiên, phân tử ARN có thể bao gồm các trình tự không liên quan mà có thể hoạt động để làm ổn định phân tử. Phân tử ARN này có thể được biểu hiện dưới sự kiểm soát của các gen khởi đầu polymeraza ARN II hoặc polymeraza ARN III. Các ví dụ về thành phần sau bao gồm các gen khởi đầu tRNA hoặc snRN.

Các phân tử ARN can thiệp ngắn ("siRNA") được ưu tiên bao gồm trình tự nucleotit mà là đồng nhất đến 19 đến 25 nucleotit liên tục với ARN thông tin đích. Tốt hơn, nếu trình tự ARN can thiệp ngắn bắt đầu với dinucleotit AA, có hàm lượng GC nằm trong khoảng 30% đến 70% (tốt hơn là 30% đến 60%, tốt hơn nữa là 40% đến 60% và tốt hơn nữa nằm trong khoảng 45% đến 55%), và không có mức độ đồng nhất cao tính theo tỷ lệ phần trăm với trình tự nucleotit nào khác đích trong hệ gen của sinh vật nơi mà nó sẽ được đưa vào, ví dụ, như xác định được theo tra cứu BLAST chuẩn.

ARNA kép hữu ích theo sáng chế có thể dễ dàng được tạo ra bằng cách áp dụng các quy trình thông thường.

ARN cỡ micro

Các ARN cỡ micro (được viết tắt là miRNA) là các phân tử ARN không mã hóa thường có chiều dài nằm trong khoảng từ 19 đến 25 nucleotit (thường nằm trong khoảng từ 20 đến 24 nucleotit ở thực vật) mà thu được từ các tiền chất lớn hơn tạo nên cấu trúc vòng thân quai không hoàn chỉnh. ARN cỡ micro thường bổ trợ hoàn toàn cho một vùng của ARN thông tin đích mà mức độ biểu hiện của nó cần được giảm, nhưng không cần bổ trợ hoàn toàn.

Các ARN micro liên kết với các trình tự bổ trợ trên bản sao của ARN thông tin (mRNA) đích, thường dẫn đến sự kìm hãm dịch mã hoặc làm thoái biến đích và làm câm gen. Các ARN cỡ micro nhân tạo (amiRNA) có thể được thiết kế trên cơ sở các ARN cỡ micro tự nhiên để làm giảm mức độ biểu hiện của gen bất kỳ đang được quan tâm, như đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Ở các tế bào thực vật, tin rằng các phân tử ARN cỡ micro tiền thân được xử lý đáng kể ở nhân. ARN micro tiền thân (chứa một hoặc nhiều vùng sợi đôi tại chỗ hoặc "kẹp tóc" cũng như "chụp" 5' thông thường và đuôi đã được polyadenyl hóa của ARN thông tin) được xử lý thành phân tử ARN cỡ micro tiền thân ngắn hơn mà còn bao gồm vòng quai thân hoặc cấu trúc gấp ngược và được gọi là "tiền ARN micro". Ở thực vật, các tiền ARN micro được phân cắt bởi các enzym kiểu DICER (DCL) khác biệt, tạo ra cặp đôi ARN cỡ micro:ARN micro*. Trước khi vận chuyển ra khỏi nhân, các cặp đôi này được metyl hóa.

Trong tế bào chất, ARN cỡ micro đứng riêng khỏi cặp đôi ARN cỡ micro:ARN micro được kết hợp một cách chọn lọc vào phức làm câm do ARN gây ra (RNA-induced silencing complex - RISC) hiệu nghiệm để nhận diện đích. Các phức RISC chứa tiểu tập hợp cụ thể gồm các protein Argonaute mà gây ra sự kìm hãm gen đặc biệt theo trình tự (ví dụ, xem các tài liệu: Millar and Waterhouse, 2005; Pasquinelli *et al.*, 2005; Almeida và Allshire, 2005).

ARN cỡ micro hữu ích theo sáng chế có thể được tạo ra một cách dễ dàng bằng cách áp dụng các quy trình thông thường. Ví dụ, thiết kế của cấu trúc ARN micro nhân tạo ROS1a (amiRNA - artificial microRNA) có thể dựa trên phương pháp chung được mô tả bởi Fahim và các đồng tác giả (2012). Phần mềm WMD3 (www.wmd3.weigelworld.org/) có thể được dùng để xác định các đích ARN micro nhân tạo thích hợp ở gen *ROS1a*. Các đích ARN micro nhân tạo được chọn theo bốn tiêu chí: 1) tính không ổn định tương đối ở đầu tận cùng 5' bằng cách sử dụng các trình tự mà là giàu AT ở đầu tận cùng 5' và giàu GC ở đầu tận cùng 3'; 2) U ở vị trí 1 và A ở vị trí phân cắt (giữa vị trí 10 và vị trí 11); 3) tối đa 1 và 4 lỗi ghép đôi lần lượt ở các vị trí 1 đến 9, và 13 đến 21; và 4) có năng lượng tự do đã dự đoán (ΔG) thấp hơn -30kcal mol⁻¹ khi ARN micro nhân tạo lai với ARN đích (xem tài liệu: Ossowski *et al.*, 2008). Để làm giảm mức độ biểu hiện đặc thù theo gen, trình tự ARN micro nhân tạo ứng viên được chọn trong vùng mà thể hiện mức độ tương đồng thấp nhất khi duỗi thẳng tất cả các thể tương đồng của *OsROS1a*, nhờ đó làm giảm tiềm năng làm giảm mức độ biểu hiện theo đích lạ của các thể tương đồng *ROS1* và các cặp gen. Tiền chất của miR395 của lúa (xem các tài liệu: Guddeti *et al.*, 2005; Jones-Rhoades and Bartel, 2004; Kawashima *et al.*, 2009) có thể được chọn làm khung ARN micro nhân tạo để cài xen các trình tự ARN micro nhân tạo. Để thiết kế và tạo ra cấu trúc này, năm đích ARN cỡ micro nội sinh ở miR395 được thể bằng năm đích ARN micro nhân tạo để hạ TA2.

Ước chế đồng thời

Các gen có thể ức chế sự biểu hiện của gen nội sinh có liên quan và/hoặc gen chuyển đã có mặt trong hệ gen, hiện tượng này được gọi là việc làm câm gen phụ thuộc vào sự tương đồng. Hầu hết các trường hợp làm câm gen phụ thuộc vào sự tương đồng chia thành hai nhóm - các trường hợp xảy ra ở mức độ phiên mã gen chuyển, và các trường hợp vận hành sau phiên mã.

Việc làm câm gen phụ thuộc vào mức độ tương đồng sau khi phiên mã (tức là ức chế đồng thời) bộc lộ hiện tượng mất biểu hiện của gen chuyển và gen nội sinh có liên quan hoặc gen của virus ở các thực vật chuyển gen. Thông thường, nhưng không thường xuyên, sự ức chế đồng thời xảy ra khi các bản sao của gen chuyển thừa quá nhiều, và thường được xem là được khơi mào ở mức độ xử lý, định vị, và/hoặc làm thoái biến ARN thông tin. Một số mô hình tồn tại để giải thích hoạt động của sự ức chế đồng thời (xem tài liệu: Taylor, 1997).

Việc ức chế đồng thời bao gồm việc đưa thêm bản sao của gen hoặc đoạn của nó vào cây theo định hướng có nghĩa liên quan đến gen khởi đầu cho sự biểu hiện của nó. Kích thước của đoạn có nghĩa, sự tương ứng của nó với các vùng gen đích, và mức độ đồng nhất về trình tự của nó với gen đích có thể được xác định bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Trong một số trường hợp, bản sao bổ sung của trình tự gen cản trở sự biểu hiện của gen đích của cây. Tham chiếu WO 97/20936 và EP 0465572 về các phương pháp thực hiện các cách thức ức chế đồng thời.

Các polynucleotit đối nghĩa

Thuật ngữ "polynucleotit đối nghĩa" được dùng để chỉ phân tử ADN hoặc phân tử ARN mà bổ trợ cho ít nhất là một phần của phân tử ARN thông tin cụ thể ghi mã polypeptit nội sinh và có khả năng can thiệp vào hiện tượng sau phiên mã như dịch mã của ARN thông tin. Việc áp dụng các phương pháp gen đối nghĩa là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này (ví dụ, xem tài liệu: G. Hartmann and S. Endres, *Manual of Antisense Methodology*, Kluwer (1999)). Việc áp dụng các kỹ thuật gen đối nghĩa ở thực vật đã được xem xét bởi Bourque (1995) và Senior (1998). Bourque (1995) liệt kê rất nhiều ví dụ về cách các trình tự gen đối nghĩa được dùng ở hệ thực vật làm phương pháp làm bất hoạt gen. Bourque còn nêu rằng có thể là không cần thiết đạt hiệu quả 100% ức chế hoạt tính của enzym bất kỳ vì ức chế một phần có khả năng cao hơn gây ra thay đổi đo được ở hệ thống này. Senior (1998) nêu rằng các phương pháp gen đối nghĩa hiện là kỹ thuật chính thức để xử lý quá trình biểu hiện gen.

Theo một phương án, polynucleotit đối nghĩa lai trong các điều kiện sinh lý, tức là polynucleotit đối nghĩa (mà là sợi đơn hoàn toàn hoặc một phần) ít nhất có khả năng

tạo ra sợi đôi polynucleotit với ARN thông tin ghi mã polypeptit nội sinh ROS1a trong các điều kiện bình thường trong tế bào.

Các phân tử đối nghĩa có thể bao gồm các trình tự mà tương ứng với gen cấu trúc hoặc đối với các trình tự mà thực hiện việc kiểm soát mức độ biểu hiện gen hoặc hiện tượng ghép nối. Ví dụ, trình tự gen đối nghĩa có thể tương ứng với vùng ghi mã được hướng đích đến của gen nội sinh, hoặc vùng không dịch mã ở đầu tận cùng 5' (UTR) hoặc 3'-UTR hoặc tổ hợp của chúng. Nó có thể là hỗ trợ một phần cho trình tự intron, mà có thể bị cắt bỏ trong khi hoặc sau khi phiên mã, tốt hơn là chỉ đối với các trình tự exon của gen đích đó. Vì mức độ khác nhau nói chung cao hơn của các UTR, các vùng hướng đích này đem lại tính đặc hiệu cao hơn ở việc ức chế gen.

Chiều dài của trình tự gen đối nghĩa cần ít nhất là 19 nucleotit liên kề, tốt hơn nếu ít nhất là 30 hoặc ít nhất 50 nucleotit, và tốt hơn nữa nếu ít nhất là 100, 200, 500 hoặc 1000 nucleotit. Trình tự dài đầy đủ hỗ trợ cho bản sao của toàn bộ gen có thể được sử dụng. Tốt nhất, chiều dài là 100 đến 2000 nucleotit. Mức độ đồng nhất của trình tự gen đối nghĩa với bản sao đích cần ít nhất là 90% và tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 95% đến 100%, thường là đồng nhất 100%. Tất nhiên, phân tử ARN của gen đối nghĩa có thể bao gồm các trình tự không liên quan mà có thể thực hiện chức năng làm ổn định phân tử.

Biên tập hệ gen bằng cách sử dụng các nucleaza đặc hiệu vị trí

Việc biên tập hệ gen sử dụng các nucleaza đã được xử lý cấu thành bởi các miền liên kết ADN đặc hiệu theo trình tự ngưng tụ với môđun phân cắt ADN không đặc hiệu. Các nucleaza khảm này cho phép các cải biến di truyền chính xác và hiệu quả bằng cách cảm ứng các đoạn gãy sợi đôi của ADN được hướng đích đến mà kích thích các cơ chế sửa chữa ADN tế bào nội sinh của tế bào để sửa chữa đoạn gãy được cảm ứng. Các cơ chế này bao gồm, ví dụ, kết hợp đầu cuối không đồng nhất (non-homologous end joining - NHEJ) dễ lỗi và sửa chữa theo định hướng đồng nhất (homology directed repair - HDR).

Với sự có mặt của plasmit cho với các nhánh đồng nhất kéo dài, HDR có thể dẫn tới việc đưa vào một hoặc nhiều gen chuyển để sửa cho đúng hoặc thay thế gen đang tồn tại. Khi không có plasmit cho, việc sửa chữa nhờ NHEJ tạo ra các đột biến nhỏ cài xen hoặc loại bỏ ở đích mà gây ra sự phá vỡ gen.

Các nucleaza đã được xử lý hữu dụng trong các phương pháp theo sáng chế bao gồm các nucleaza kẽm ngón tay (ZFN), các nucleaza tác động kiểu hoạt hóa (TALEN) phiên mã (TALEN) và các nucleaza đặc hiệu vị trí loại CRISPR-Cas9.

Thông thường, các gen được mã hóa bởi nucleaza gen được phân phối vào tế bào nhờ ADN plasmit, vật truyền virus hoặc ARN thông tin phiên mã *in vitro*. Việc sử dụng các vật truyền thông báo thay thế huỳnh quang còn cho phép làm giàu ZFN-, TALEN- hoặc Các tế bào đã được cải biến bằng CRISPR.

Các hệ gen phức tạp thường chứa nhiều bản sao của các trình tự mà là giống hệt nhau hoặc tương đồng ở mức độ cao với đích ADN dự kiến, có tiềm năng dẫn đến hoạt tính của đích lạ và độc tính của tế bào. Để đáp ứng mục đích này, phương thức cấu trúc (xem các tài liệu: Miller *et al.*, 2007; Szczepek *et al.*, 2007) và phương thức dựa trên lựa chọn (Doyon *et al.*, 2011; Guo *et al.*, 2010) có thể được áp dụng để tạo ra các heterodime ZFN và TALEN tốt hơn với tính đặc hiệu phân cắt đã được tối ưu hóa và độc tính giảm.

Nhằm để hướng đích đến việc tái tổ hợp di truyền hoặc đột biến nhờ ZFN theo phương án được ưu tiên của sáng chế, hai trình tự nhận biết ADN ngón tay kềm gồm 9 cặp bazơ phải được xác định ở ADN của vật chủ. Các vị trí nhận biết này sẽ theo hướng nghịch chuyển so với nhau và cách nhau khoảng 6 cặp bazơ của ADN. Tiếp đó, các ZFN được tạo ra bằng cách thiết kế và tạo ra các tổ hợp ngón tay kềm mà liên kết đặc hiệu với ADN tại locus đích, và sau đó liên kết các ngón tay kềm với miền phân cắt ADN.

Nucleaza tác động kiểu hoạt hóa (TAL) phiên mã (TALEN) chứa miền liên kết ADN tác động TAL và miền endonucleaza.

Các chất tác động TAL là các protein của vi khuẩn gây bệnh thực vật mà được truyền bởi sinh vật gây bệnh vào tế bào thực vật, khi chúng di chuyển đến nhân và thực hiện chức năng của các yếu tố phiên mã để bật các gen đặc hiệu của thực vật. Trình tự axit amin bậc nhất của chất tác động TAL quy định trình tự nucleotit mà nó liên kết. Do đó, các vị trí đích có thể được dự đoán cho các chất tác động TAL, và các chất tác động TAL có thể được xử lý và tạo ra nhằm mục đích liên kết với các trình tự nucleotit cụ thể.

Được dung hợp với các trình tự axit nucleic ghi mã yếu tố tác động TAL là các trình tự ghi mã nucleaza hoặc một phần của nucleaza, thường là a miền phân cắt không đặc hiệu từ endonucleaza cắt giới hạn typ 2 như FokI (Kim *et al.*, 1996). Các endonucleaza hữu dụng khác có thể bao gồm, ví dụ, *HhaI*, *HindIII*, *Nod*, *BbvCI*, *EcoRI*, *BglII*, và *AlwI*. Thực tế là một vài endonucleaza (ví dụ, *FokI*) chỉ thực hiện chức năng của các dimer có thể được sử dụng để nâng cao mức độ đặc hiệu đối với đích của yếu tố tác động TAL. Ví dụ, trong một số trường hợp, mỗi monome *FokI* có thể được dung hợp với trình tự của chất tác động TAL mà nhận biết trình tự đích của ADN khác nhau, và chỉ khi hai vị trí nhận biết là gần nhau thì các monome không có hoạt tính mới kết

hợp lại để tạo ra enzym chức năng. Do yêu cầu liên kết ADN để hoạt hóa nucleaza, a enzym cắt giới hạn đặc hiệu vị trí cao có thể được tạo ra.

TALEN đặc hiệu trình tự có thể nhận biết trình tự cụ thể trong trình tự nucleotit đích đã được chọn trước có trong tế bào. Do đó, theo một số phương án, trình tự nucleotit đích có thể được quét tìm các vị trí nhận biết nucleaza, và nucleaza cụ thể có thể được chọn lọc trên cơ sở trình tự đích. Trong các trường hợp khác, TALEN có thể được xử lý để hướng đích đến trình tự cụ thể của tế bào.

Cấu trúc axit nucleic

Sáng chế đề xuất các cấu trúc axit nucleic chứa các polynucleotit theo sáng chế hoặc hữu dụng đối với sáng chế, và các vật truyền và các tế bào chủ chứa chúng, các phương pháp tạo ra và sử dụng chúng, và các ứng dụng của chúng.

Sáng chế đề xuất các yếu tố mà nối hoặc liên kết khi hoạt động. Các thuật ngữ "nối khi hoạt động" hoặc "liên kết theo chức năng" và thuật ngữ tương tự được dùng để chỉ liên kết của các yếu tố polynucleotit trong mỗi quan hệ chức năng. Nói chung, các trình tự axit nucleic nối khi hoạt động được liên kết liền kề và, khi cần thiết kết hợp hai vùng mã hóa protein, là liền kề và trong khung đọc. Trình tự ghi mã "được nối khi hoạt động với" một trình tự ghi mã khác khi polymeraza ARN sẽ phiên mã hai trình tự ghi mã thành một ARN, mà nếu được dịch mã thì sau đó được dịch mã thành một polypeptit có các axit amin thu được từ cả hai trình tự ghi mã. Các trình tự ghi mã không nhất thiết là liền kề với nhau chừng nào các trình tự được biểu hiện cuối cùng được xử lý để tạo ra protein mong muốn.

Thuật ngữ "trình tự hoạt động cis", "yếu tố hoạt động cis" hoặc "vùng điều hòa cis" hoặc "vùng điều hòa" hoặc thuật ngữ tương tự được dùng trong bản mô tả này để chỉ trình tự nucleotit bất kỳ, mà khi được định vị thích hợp và nối với an trình tự di truyền có thể biểu hiện được, có khả năng điều hòa, ít nhất là một phần, sự biểu hiện của trình tự di truyền. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này biết rằng vùng điều hòa cis có thể có khả năng hoạt hóa, làm câm, nâng cao, kìm hãm hoặc làm thay đổi theo cách khác mức độ biểu hiện và/hoặc tính đặc hiệu theo loại tế bào và/hoặc tính đặc hiệu phát triển của gen trình tự ở mức độ phiên mã hoặc mức độ sau phiên mã. Theo các phương án được ưu tiên của sáng chế, trình tự hoạt động cis là trình tự hoạt hóa mà làm gia tăng hoặc mức biểu hiện của trình tự di truyền có thể biểu hiện được.

Yếu tố gen khởi đầu hoặc gen tăng cường "nối khi hoạt động" với polynucleotit có thể phiên mã được có nghĩa là đặt polynucleotit có thể phiên mã được (ví dụ, polynucleotit ghi mã protein hoặc bản sao khác) dưới sự kiểm soát điều hòa của gen

khởi đầu, mà khi đó kiểm soát mức độ phiên mã của polynucleotit đó. Trong quá trình dựng các tổ hợp gen khởi đầu khác loại/gen cấu trúc, thường ưu tiên đặt gen khởi đầu hoặc biến thể của chúng ở vị trí cách xa vị trí khởi đầu phiên mã của polynucleotit có thể phiên mã được mà khoảng bằng đúng khoảng cách giữa gen khởi đầu đó và vùng mã hóa protein mà nó kiểm soát trong các thiết lập tự nhiên; tức là gen mà từ đó thu được gen khởi đầu này. Như đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, một số dao động về khoảng cách này có thể được xem xét mà không mất chức năng. Tương tự, việc đặt vị trí được ưu tiên của yếu tố trình tự điều hòa (ví dụ, gen chỉ huy, gen tăng cường v.v.) liên quan đến polynucleotit có thể phiên mã được cần được đặt dưới sự kiểm soát của nó được xác định bởi việc đặt vị trí của yếu tố này trong các thiết lập tự nhiên; tức là gen mà nó có nguồn gốc từ đó.

"Gen khởi đầu" hoặc "trình tự gen khởi đầu" được dùng trong bản mô tả này để chỉ vùng của gen, thường nằm trước (đầu tận cùng 5') của vùng ghi mã ARN, mà kiểm soát sự khởi đầu và mức độ phiên mã ở tế bào đang được quan tâm. "Gen khởi đầu" bao gồm các trình tự điều hòa phiên mã của gen thuộc hệ gen kinh điển, như trình tự hộp TATA và trình tự hộp CCAAT, cũng như các yếu tố điều hòa bổ sung (tức là trình tự hoạt hóa phía trước, gen tăng cường và gen làm câm) mà làm thay đổi mức độ biểu hiện gen đáp lại kích thích của quá trình phát triển và/hoặc kích thích của môi trường, hoặc theo cách đặc hiệu mô hoặc đặc hiệu loại tế bào. Nói chung, nhưng không nhất thiết (ví dụ, đối với các gen khởi đầu *Po/III*), gen khởi đầu nằm trước gen cấu trúc mà nó điều hòa biểu hiện. Hơn thế nữa, các yếu tố điều hòa chứa gen khởi đầu thường nằm trong khoảng cách 2kb từ vị trí khởi đầu của gen phiên mã. Các gen khởi đầu có thể chứa các yếu tố điều hòa đặc hiệu bổ sung, nằm xa vị trí khởi đầu hơn nữa để nâng cao hơn nữa mức độ biểu hiện ở tế bào, và/hoặc để làm thay đổi về mặt thời gian hoặc khả năng cảm ứng sự biểu hiện của gen cấu trúc mà nó nối khi hoạt động.

Thuật ngữ "gen khởi đầu cơ định" được dùng để chỉ gen khởi đầu mà chỉ huy sự biểu hiện của trình tự đã được phiên mã liên kết khi hoạt động ở nhiều hoặc tất cả các mô của một sinh vật như một cây. Thuật ngữ cơ định được dùng trong bản mô tả này không nhất thiết thể hiện rằng gen được biểu hiện ở cùng một mức độ ở tất cả các loại tế bào, mà rằng gen được biểu hiện ở nhiều loại tế bào, mặc dù dao động một chút ở mức độ thường là dự đoán được. Thuật ngữ "biểu hiện chọn lọc" được dùng trong bản mô tả này để chỉ sự biểu hiện hầu như chỉ riêng ở các bộ phận cụ thể, ví dụ, của cây, ví dụ, nội nhũ, phôi, lá, quả, thân củ hoặc rễ. Theo một phương án được ưu tiên, gen khởi đầu được biểu hiện một cách chọn lọc hoặc một cách ưu tiên ở hạt của cây, tốt hơn là cây lúa. Do đó, sự biểu hiện chọn lọc có thể được so sánh tương phản với sự biểu hiện

cơ định, mà thuật ngữ này được dùng để chỉ sự biểu hiện ở nhiều hoặc tất cả các mô của cây trong hầu hết hoặc toàn bộ các điều kiện mà cây này trải qua.

Sự biểu hiện chọn lọc còn có thể khiến ngăn riêng các sản phẩm của sự biểu hiện của gen ở mô, bộ phận, hoặc giai đoạn phát triển cụ thể của cây. Sự ngăn riêng ở các vị trí cụ thể dưới mức tế bào như thể hạt, dung dịch bào tương, không bào, hoặc không gian của hạt không màu có thể đạt được bằng cách đưa vào cấu trúc của sản phẩm gen các tín hiệu thích hợp, tức là tín hiệu peptit, để vận chuyển đến khoang tế bào quy định, hoặc trong trường hợp của các hạt cơ quan bán tự trị (thể hạt và ty thể) bằng cách gắn gen chuyển với các trình tự điều hòa thích hợp trực tiếp vào hệ gen của hạt cơ quan này.

"Gen khởi đầu đặc hiệu với mô" hoặc "gen khởi đầu đặc hiệu với cơ quan" là gen khởi đầu mà được ưu tiên biểu hiện ở một mô hoặc cơ quan so với nhiều mô hoặc cơ quan khác, tốt hơn là hầu hết nếu không phải tất cả các mô khác hoặc các cơ quan ở cây chẳng hạn. Nói chung, gen khởi đầu này được biểu hiện ở mức độ cao hơn 10 lần ở mô hoặc cơ quan cụ thể so với các mô hoặc các cơ quan khác.

Các gen khởi đầu đặc hiệu với hạt giống theo sáng chế mà là thích hợp là gen khởi đầu của gen napin của cây hạt cải dầu (US 5,608,152), gen khởi đầu USP của *Vicia faba* (xem tài liệu: Baumlein *et al.*, 1991), gen khởi đầu oleosin của *Arabidopsis* (xem công bố đơn quốc tế số WO 98/45461), gen khởi đầu phaseolin của *Phaseolus vulgaris* (xem patent Mỹ số US 5,504,200), gen khởi đầu Bce4 của cải bẹ xanh (WO 91/13980) hoặc gen khởi đầu legumin B4 (xem tài liệu: Baumlein *et al.*, 1992), và các gen khởi đầu mà dẫn đến sự biểu hiện đặc hiệu theo hạt giống ở lúa và các gen khởi đầu tương tự. Các gen khởi đầu đáng chú ý mà là thích hợp là gen khởi đầu của các gen LPT2 hoặc LPT1 của lúa mạch (xem các công bố đơn quốc tế số WO 95/15389 và WO 95/23230) hoặc các gen khởi đầu đã được bộc lộ trong công bố đơn quốc tế số WO 99/16890 (các gen khởi đầu từ gen hordein của lúa mạch). Các gen khởi đầu khác bao gồm các gen khởi đầu đã được mô tả bởi Broun và các đồng tác giả (1998), Potenza và các đồng tác giả (2004), các công bố đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền sáng chế Mỹ số US 20070192902 và US 20030159173. Theo một phương án, gen khởi đầu đặc hiệu hạt giống được ưu tiên biểu hiện ở phần đã định của hạt giống như nội nhũ, tốt hơn là aloron đang phát triển. Theo một phương án khác nữa, gen khởi đầu đặc hiệu hạt giống không được biểu hiện, hoặc chỉ được biểu hiện ở mức độ thấp, sau khi hạt giống nảy mầm.

Theo một phương án, gen khởi đầu này ít nhất là có hoạt tính tại thời điểm giữa thời điểm nở hoa và 7 ngày sau khi nở hoa, hoặc có hoạt tính trong toàn bộ giai đoạn này. Ví dụ về gen khởi đầu đó là gen khởi đầu của gen *ROS1a*.

Theo một phương án, gen khởi đầu này được liên kết khi hoạt động với polynucleotit ngoại sinh mà làm giảm mức độ biểu hiện của gen *ROSLa* không là gen khởi đầu có glutenin phân tử lượng cao.

Các gen khởi đầu được dự tính theo sáng chế có thể là tự nhiên đối với cây chủ cần được biến nạp hoặc có thể thu được từ nguồn khác, khi vùng này có tính chức năng ở cây chủ. Các nguồn khác bao gồm gen T-ADN của *Agrobacterium*, như các gen khởi đầu của gen để sinh tổng hợp nopaline, octapine, mannopine, hoặc các gen khởi đầu opine khác, các gen khởi đầu đặc hiệu mô (ví dụ, xem patent Mỹ số US 5,459,252 và công bố đơn quốc tế số WO 91/13992); các gen khởi đầu từ virus (kể cả virus đặc hiệu với vật chủ), hoặc các gen khởi đầu tổng hợp một phần hoặc hoàn toàn. Nhiều gen khởi đầu mà có chức năng ở cây một lá mầm và cây hai lá mầm là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này (ví dụ, xem tài liệu: Greve, 1983; Salomon *et al.*, 1984; Garfinkel *et al.*, 1983; Barker *et al.*, 1983); kể cả các chất khác nhau khởi đầu phân lập được từ cây và virus như gen khởi đầu của virus khảm ở súp lơ (CaMV 35S, 19S). Các phương pháp không nhằm giới hạn phạm vi của sáng chế để đánh giá hoạt tính của gen khởi đầu được bộc lộ bởi Medberry và các đồng tác giả (1992 và 1993), Sambrook và các đồng tác giả (1989, nêu trên) và patent Mỹ số US 5,164,316.

Theo cách khác hoặc ngoài ra, gen khởi đầu này có thể là gen khởi đầu có thể cảm ứng được hoặc gen khởi đầu có thể điều hòa về sự phát triển mà có khả năng chi phối sự biểu hiện của polynucleotit đã được đưa vào ở giai đoạn phát triển thích hợp của cây chẳng hạn. Các trình tự hoạt động *cis* khác mà có thể được sử dụng bao gồm gen tăng cường phiên mã và/hoặc gen tăng cường dịch mã. Các vùng của gen tăng cường là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, và có thể bao gồm codon khởi đầu dịch mã ATG và các trình tự liên kề. Khi được bao gồm, codon khởi đầu cần ở cùng pha với khung đọc của trình tự ghi mã liên quan đến polynucleotit lạ hoặc polynucleotit ngoại sinh để đảm bảo dịch mã toàn bộ trình tự nếu nó cần được dịch mã. Các vùng khởi đầu dịch mã có thể được tạo ra từ nguồn của vùng khởi đầu phiên mã, hoặc từ polynucleotit lạ hoặc polynucleotit ngoại sinh. Trình tự cũng có thể thu được từ nguồn của gen khởi đầu này được chọn để dẫn quá trình phiên mã, và có thể được cải biến một cách đặc hiệu nhằm để tăng mức độ dịch mã ARN thông tin.

Cấu trúc axit nucleic theo sáng chế có thể bao gồm trình tự không được dịch mã 3' gồm khoảng từ 50 đến 1.000 cặp nucleotit bazơ mà có thể bao gồm cả trình tự kết thúc phiên mã. Trình tự không được dịch mã 3' có thể chứa tín hiệu kết thúc phiên mã mà có thể hoặc có thể không bao gồm tín hiệu polyadenyl hóa và tín hiệu điều hòa bất kỳ khác có khả năng thực hiện việc xử lý ARN thông tin. Tín hiệu polyadenyl hóa thực

hiện chức năng bổ sung các dải axit polyadenylic vào đầu tận cùng 3' của tiền ARN thông tin. Các tín hiệu polyadenyl hóa thường được nhận biết bởi sự có mặt của tính tương đồng với dạng chuẩn tắc 5' AATAAA-3' mặc dù các biến đổi là không hiếm. Các trình tự kết thúc sự phiên mã mà không bao gồm tín hiệu polyadenyl hóa bao gồm các gen kết thúc cho ARN polymeraza *PoII* hoặc *PoIII* mà bao gồm loạt bốn hoặc nhiều thymidin. Các ví dụ về các trình tự không được dịch mã 3' thích hợp là các vùng không được dịch mã đã được phiên mã 3' chứa tín hiệu polyadenyl hóa từ gen octopin synthaza (*ocs*) hoặc gen nopalin synthaza (*nos*) của *Agrobacterium tumefaciens* (xem tài liệu: Bevan *et al.*, 1983). Các trình tự không được dịch mã 3' thích hợp còn có thể thu được từ gen thực vật như gen ribuloza-1,5-bisphosphat carboxylaza (*ssRUBISCO*), mặc dù các yếu tố 3' khác mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết cũng có thể được sử dụng.

Vì ADN trình tự được cài xen vào giữa vị trí khởi đầu phiên mã và khởi đầu của trình tự ghi mã, tức là trình tự dẫn 5' không được dịch mã (5'UTR), có thể ảnh hưởng đến mức độ biểu hiện gen nếu nó được dịch mã cũng như được phiên mã, nên cũng có thể sử dụng trình tự dẫn đầu cụ thể. Các trình tự dẫn đầu thích hợp là các trình tự mà bao gồm các trình tự được chọn để điều khiển quá trình biểu hiện tối ưu của trình tự ADN lạ hoặc trình tự ADN nội sinh. Ví dụ, các trình tự dẫn đầu này bao gồm trình tự liên ứng được ưu tiên mà có thể làm tăng hoặc duy trì tính ổn định của ARN thông tin và ngăn ngừa sự khởi đầu không thích hợp của quá trình dịch mã như đã được mô tả bởi Joshi (1987).

Vật truyền

Sáng chế bao gồm việc sử dụng các vật truyền để xử lý hoặc chuyển các cấu trúc di truyền. Thuật ngữ "vật truyền khảm" có nghĩa là phân tử axit nucleic, tốt hơn là phân tử ADN có nguồn gốc, ví dụ, từ plasmit, thể thực khuẩn, hoặc virus thực vật, mà trình tự axit nucleic có thể được cài xen hoặc được tách dòng vào đó. Tốt hơn, nếu vật truyền là ADN sợi đôi và chứa một hoặc nhiều vị trí cắt giới hạn đặc biệt và có thể có khả năng sao chép tự động ở tế bào chủ đã định bao gồm tế bào đích hoặc mô hoặc tế bào tiền thân hoặc mô của chúng, hoặc có khả năng tích hợp vào hệ gen của vật chủ đã định sao cho trình tự đã được tách dòng có thể tái sinh. Do đó, vật truyền này có thể là vật truyền tự sao chép, tức là vật truyền tồn tại ở dạng thực thể ngoài nhiễm sắc thể, sự sao chép của nó là độc lập với sự sao chép của nhiễm sắc thể, ví dụ, plasmit thẳng hoặc plasmit vòng kín, yếu tố ngoài nhiễm sắc thể, nhiễm sắc thể loại thu nhỏ, hoặc nhiễm sắc thể nhân tạo. vật truyền này có thể chứa phương tiện bất kỳ để đảm bảo việc tự sao chép. Theo cách khác, vật truyền này có thể là một vật truyền mà khi được đưa vào tế

bào thì được tích hợp vào hệ gen của tế bào nhận và được sao chép cùng với (các) nhiễm sắc thể mà nó được tích hợp vào. Hệ vật truyền có thể bao gồm một vật truyền hoặc plasmid, hai hoặc nhiều vật truyền hoặc plasmid, mà cùng nhau chứa tổng ADN cần được đưa vào hệ gen của tế bào chủ, hoặc gen nhảy. Việc lựa chọn vật truyền này sẽ thường phụ thuộc vào tính tương thích của vật truyền này với tế bào mà vật truyền này được đưa vào. Vật truyền này có thể còn bao gồm gen đánh dấu chọn lọc như gen kháng kháng sinh, gen kháng thuốc diệt cỏ hoặc gen khác mà có thể được sử dụng để chọn lọc các thể biến nạp thích hợp. Các ví dụ về gen này là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Cấu trúc axit nucleic theo sáng chế có thể được đưa vào vật truyền, như plasmid. Các vật truyền plasmid thường bao gồm các trình tự axit nucleic bổ sung mà làm dễ chọn lọc, khuếch đại, và biến nạp catxet biểu hiện ở tế bào không nhân và tế bào nhân chuẩn, ví dụ, vật truyền có nguồn gốc từ pUC, vật truyền có nguồn gốc từ pSK, vật truyền có nguồn gốc từ pGEM, vật truyền có nguồn gốc từ pSP, vật truyền có nguồn gốc từ pBS, hoặc các vật truyền đôi chứa một hoặc nhiều vùng T-ADN. Các trình tự axit nucleic bổ sung bao gồm nguồn gốc sao chép để gây ra sự sao chép tự động của vật truyền, gen đánh dấu chọn lọc được, tốt hơn là ghi mã tính kháng kháng sinh hoặc tính kháng thuốc diệt cỏ, nhiều vị trí tách dòng đặc biệt tạo ra nhiều vị trí để cài xen các trình tự axit nucleic hoặc gen được ghi mã ở cấu trúc axit nucleic, và các trình tự mà làm gia tăng mức độ biến nạp của tế bào không nhân và tế bào có nhân chuẩn (đặc biệt là tế bào thực vật).

Thuật ngữ "gen đánh dấu" có nghĩa là gen đem lại kiểu hình khác biệt cho các tế bào biểu hiện gen đánh dấu và do đó khiến các tế bào đã biến nạp này trở nên khác biệt với các tế bào mà không có gen đánh dấu. Gen đánh dấu chọn lọc được truyền tính trạng mà có thể "chọn lọc" trên cơ sở mức kháng tác nhân chọn lọc (ví dụ, thuốc diệt cỏ, kháng sinh, bức xạ, nhiệt, hoặc xử lý khác có tính phá hủy đối với tế bào chưa được biến nạp). Gen đánh dấu sàng lọc được (hay gen thông báo) truyền tính trạng mà có thể xác định thông qua quan sát hoặc thử nghiệm, tức là bằng cách "sàng lọc" (ví dụ, β -glucuronidaza, luxiferaza, GFP hoặc hoạt tính enzym khác không có ở tế bào chưa được biến nạp). Gen đánh dấu và trình tự nucleotit quan tâm không cần được liên kết.

Để tạo điều kiện thuận lợi cho việc xác định các thể biến nạp, mong muốn rằng cấu trúc axit nucleic chứa gen đánh dấu chọn lọc được hoặc sàng lọc được như, hoặc ngoài ra, polynucleotit lạ hoặc polynucleotit ngoại sinh. Việc lựa chọn thực tế một gen đánh dấu là không quan trọng chừng nào nó còn có tính chức năng (tức là chọn lọc) kết hợp với các tế bào thực vật được chọn. Gen đánh dấu và polynucleotit lạ hoặc polynucleotit ngoại sinh quan tâm không cần được liên kết, vì sự biến nạp đồng thời

của các gen không liên kết như đã được bộc lộ trong patent Mỹ số US 4,399,216 chẳng hạn cũng là một quy trình hiệu quả trong quá trình biến nạp ở thực vật.

Các ví dụ về các gen đánh dấu có thể chọn lọc được ở vi khuẩn là các gen đánh dấu mà truyền tính kháng kháng sinh như kháng ampicilin, erythromyxin, cloramphenicol hoặc tetracyclin, tốt hơn là kháng kanamycin. Các gen đánh dấu có thể chọn lọc được làm ví dụ để chọn lọc các thể biến nạp thực vật bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, gen *hyg* mà ghi mã tính kháng hygromycin B; gen neomycin phosphotransferaza (*nptII*) truyền tính kháng kanamycin, paromomycin, G418; gen glutathion-S-transferaza từ gan chuột truyền tính kháng các thuốc diệt cỏ có nguồn gốc từ glutathion như đã được bộc lộ trong patent châu Âu số EP 256223 chẳng hạn; gen glutamin synthetaza mà khi được biểu hiện quá mức truyền tính kháng các chất ức chế glutamin synthetaza như phosphinothrixin như đã được bộc lộ trong công bố đơn quốc tế số WO 87/05327 chẳng hạn, gen axetyltransferaza từ *Streptomyces viridochromogenes* truyền tính kháng tác nhân chọn lọc phosphinothrixin như đã được bộc lộ trong patent châu Âu số EP 275957, gen ghi mã 5-enolpyruvylshikimat-3-phosphat synthaza (EPSPS) truyền khả năng dung nạp đối với N-phosphonometyl-glyxin như đã được bộc lộ trong tài liệu Hinchey *et al.* (1988) chẳng hạn, gen *bar* truyền tính kháng bialaphos như đã được bộc lộ trong công bố đơn quốc tế số WO91/02071 chẳng hạn; gen nitrilaza như *bxn* từ *Klebsiella ozaenae* mà truyền tính kháng bromoxynil (Stalker *et al.*, 1988); gen dihydrofolat reductaza (DHFR) truyền tính kháng metotrexat (Thillet *et al.*, 1988); gen axetolactat synthaza đột biến (ALS), mà truyền tính kháng imidazolinon, sulfonilure hoặc các hóa chất ức chế ALS khác (xem patent châu Âu số EP 154,204); gen anthranilat synthaza đột biến mà truyền tính kháng 5-metyl tryptophan; hoặc gen dalapon dehalogenaza mà truyền tính kháng thuốc diệt cỏ.

Các gen đánh dấu sàng lọc được được ưu tiên bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, gen *uidA* ghi mã enzym β -glucuronidaza (GUS) mà đã biết nhiều cơ chất sinh màu khác nhau của nó, gen β -galactosidaza ghi mã enzym mà đã biết các cơ chất sinh màu của nó, gen aequorin (xem tài liệu: Prasher *et al.*, 1985), mà có thể được sử dụng trong việc dò phát quang sinh học nhạy với canxi; gen protein huỳnh quang xanh (xem tài liệu: Niedz *et al.*, 1995) hoặc các chất dẫn xuất của nó; gen luxiferaza (*luc*) (xem tài liệu: Ow *et al.*, 1986), mà cho phép dò phát quang sinh học, và các gen khác đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Thuật ngữ "phân tử thông báo" được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là phân tử mà, theo tên hóa học của nó, liên quan đến tín hiệu xác định được nhờ phân tích mà tạo điều kiện thuận lợi cho việc xác định hoạt tính của gen khởi đầu bằng cách tham chiếu với sản phẩm protein.

Tốt hơn, nếu cấu trúc axit nucleic được kết hợp một cách ổn định vào hệ gen của cây hoặc tế bào theo sáng chế chẳng hạn. Do đó, axit nucleic chứa các yếu tố thích hợp mà cho phép phân tử được kết hợp vào hệ gen, hoặc cấu trúc được đặt vào vật truyền thích hợp mà có thể được kết hợp vào nhiễm sắc thể của tế bào thực vật.

Một phương án theo sáng chế bao gồm vật truyền tái tổ hợp, mà bao gồm ít nhất là một phân tử polynucleotit theo sáng chế, cài xen vào vật truyền bất kỳ có khả năng phân phối phân tử axit nucleic vào tế bào chủ. Vật truyền này chứa trình tự axit nucleic khác nguồn gốc, mà là trình tự axit nucleic mà trong tự nhiên không được tìm thấy liên kết các phân tử axit nucleic theo sáng chế và tốt hơn là thu được từ loài khác loài mà từ đó thu được (các) phân tử axit nucleic này. Vật truyền này có thể là ARN hoặc ADN, không nhân hoặc có nhân chuẩn, và thường là virus hoặc plasmid.

Số lượng vật truyền thích hợp để chuyển nhiễm ổn định các tế bào thực vật hoặc để thiết lập các thực vật chuyển gen đã được bộc lộ, ví dụ, trong tài liệu: Pouwels *et al.*, *Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, 1985, supp. 1987; Weissbach and Weissbach, *Methods for Plant Molecular Biology*, Academic Press, 1989; và Gelvin *et al.*, *Plant Molecular Biology Manual*, Kluwer Academic Publishers, 1990. Nói chung, các vật truyền biểu hiện thực vật bao gồm, ví dụ, một hoặc nhiều gen thực vật đã được tách dòng dưới sự kiểm soát phiên mã của các trình tự điều hòa 5' và 3' và gen đánh dấu trội chọn lọc được. Các vật truyền biểu hiện thực vật này còn có thể chứa vùng điều hòa của gen khởi đầu (ví dụ, vùng điều hòa kiểm soát sự biểu hiện cảm ứng được hoặc cơ định, được điều hòa trong môi trường hoặc trong quá trình phát triển, hoặc đặc hiệu đối với tế bào hoặc mô), vị trí bắt đầu khởi đầu phiên mã, vị trí liên kết ribosom, tín hiệu xử lý ARN, vị trí kết thúc phiên mã, và/hoặc tín hiệu polyadenyl hóa.

Lượng polypeptit ROS1s có thể là điều biến bằng cách làm giảm mức độ biểu hiện của gen ghi mã protein ở cây lúa, dẫn đến tăng độ dày của aloron. Mức độ biểu hiện của gen có thể được điều biến bằng cách làm thay đổi số lượng bản sao trong mỗi tế bào, ví dụ, bằng cách đưa cấu trúc di truyền tổng hợp chứa trình tự ghi mã và yếu tố kiểm soát phiên mã mà được nối khi hoạt động vào đó và có tính chức năng trong tế bào vào. Nhiều thể biến nạp có thể được chọn và được sàng lọc cho những thể có mức độ và/hoặc tính đặc hiệu biểu hiện gen chuyển thuận lợi nảy sinh từ tác động của các trình tự nội sinh ở lân cận vị trí tích hợp gen chuyển. Mức độ và kiểu biểu hiện gen chuyển thuận lợi là yếu tố khiến tăng độ dày của aloron. Theo cách khác, quần thể hạt giống đã được gây đột biến hoặc quần thể thực vật từ chương trình nhân giống có thể được sàng lọc đối với các dòng cá thể có độ dày của aloron tăng.

Tế bào tái tổ hợp

Phương án khác theo sáng chế bao gồm tế bào tái tổ hợp chứa tế bào chủ đã được biến nạp với một hoặc nhiều phân tử tái tổ hợp theo sáng chế, hoặc các tế bào con của chúng. Việc biến nạp phân tử axit nucleic vào tế bào có thể được thực hiện theo phương pháp bất kỳ mà theo đó phân tử axit nucleic có thể được cài xen vào tế bào. Các kỹ thuật biến nạp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, chuyển nhiễm, xung điện, nạp vi lượng, chuyển nhiễm liposom, hấp phụ, và dung hợp thể nguyên sinh. Tế bào tái tổ hợp có thể vẫn là đơn bào hoặc có thể sinh trưởng thành mô, cơ quan hoặc sinh vật đa bào. Các phân tử axit nucleic đã được biến nạp theo sáng chế có thể vẫn nằm ngoài nhiễm sắc thể hoặc có thể tích hợp vào một hoặc nhiều vị trí trong nhiễm sắc thể của tế bào đã được biến nạp (tức là tái tổ hợp) theo cách sao cho duy trì khả năng được biểu hiện của chúng. Các tế bào chủ được ưu tiên là các tế bào thực vật, tốt hơn nữa tế bào lúa.

Thực vật có biến dị di truyền

Thuật ngữ "thực vật" được dùng trong bản mô tả này là danh từ để chỉ nguyên cây và để chỉ phần bất kỳ của thế giới thực vật, nhưng còn được dùng làm tính từ để chỉ vật chất bất kỳ mà có mặt ở, thu được từ, có nguồn gốc từ, hoặc liên quan đến cây, ví dụ như các bộ phận của cây (ví dụ, lá, thân, rễ, hoa), các tế bào đơn (ví dụ, phấn hoa), hạt, các tế bào thực vật và các loại tương tự. Cây non và hạt đã nảy mầm mà rễ và chồi có thể nảy ra từ đó cũng được bao hàm trong nghĩa của "cây". Thuật ngữ "phần của cây" được dùng trong bản mô tả này để chỉ một hoặc nhiều mô hoặc phần của cây mà thu được từ cây và mà chứa ADN hệ gen của cây. Phần của cây bao gồm các cấu trúc sinh dưỡng (ví dụ, lá, thân cây), rễ, các cơ quan/cấu trúc hoa, hạt giống (kể cả phôi, lá mầm, và vỏ hạt giống), mô thực vật (ví dụ, mô mạch, mô cơ bản, và mô tương tự), các tế bào và thế hệ con của chúng. Thuật ngữ "tế bào thực vật" được dùng trong bản mô tả này để chỉ tế bào thu được từ cây hoặc trong cây và bao gồm thể nguyên sinh hoặc các tế bào khác thu được từ cây, tế bào tạo ra giao tử, và các tế bào mà tái sinh thành nguyên cây. Các tế bào thực vật có thể là các tế bào trong môi trường nuôi cấy. Thuật ngữ "mô thực vật" có nghĩa là mô đã được biệt hóa ở thực vật hoặc thu được từ thực vật ("mô cây") hoặc mô không được biệt hóa thu được từ phôi thành thực hoặc không thành thực, hạt, rễ, chồi, quả, thân củ, phấn hoa, mô của khối u, như nốt sần ở cây, và nhiều dạng tập hợp khác nhau của các tế bào thực vật trong môi trường nuôi cấy, như nốt sần. Mô thực vật làm ví dụ trong hoặc từ hạt là lá mầm, phôi và trục phôi. Do đó, sáng chế bao gồm cây và các phần của cây và các sản phẩm chứa chúng.

Các thuật ngữ "hạt" và "hạt giống" được sử dụng thay thế nhau trong bản mô tả này. "Hạt" có thể chỉ hạt thành thực ở thực vật, hạt đang phát triển ở thực vật, hạt thu

gom được hoặc hạt sau khi xử lý, ví dụ, nghiền hoặc đánh bóng, trong đó hầu hết hạt còn nguyên vẹn, hoặc sau khi hút ẩm hoặc nảy mầm, tùy theo từng trường hợp. Hạt thành thực thường có hàm lượng ẩm thấp hơn 18% đến 20%. Theo một phương án, hạt đang phát triển theo sáng chế ít nhất là khoảng 10 ngày sau khi thụ phấn (days after pollination - DAP). Theo một phương án, hạt đang phát triển theo sáng chế ít nhất là bao gồm hạt trong thời kỳ giữa thời điểm nở hoa và 7 ngày sau khi nở hoa.

Thuật ngữ "thực vật chuyển gen" được dùng trong bản mô tả này để chỉ thực vật với một hoặc nhiều biến dị di truyền như được xác định trong bản mô tả này như thực vật chứa cấu trúc axit nucleic không tìm thấy ở cây loại thường thuộc cùng một loài, giống hoặc cây trồng. Tức là các thực vật chuyển gen (các thực vật đã được biến nạp) chứa nguyên liệu di truyền (gen chuyển) mà chúng không chứa trước khi biến nạp. Gen chuyển có thể bao gồm các trình tự di truyền thu được từ hoặc có nguồn gốc từ tế bào thực vật, hoặc tế bào thực vật khác, hoặc nguồn phi thực vật, hoặc trình tự tổng hợp. Nói chung, gen chuyển được đưa vào cây nhờ xử lý của con người, ví dụ, bằng cách biến nạp nhưng phương pháp bất kỳ theo nhận biết của người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể được áp dụng. Tốt hơn, nếu nguyên liệu di truyền được tích hợp một cách ổn định vào hệ gen của cây. Nguyên liệu di truyền được đưa vào có thể bao gồm các trình tự mà xuất hiện trong cùng một loài trong tự nhiên nhưng theo thứ tự đã được bố trí lại hoặc theo cách khác để sắp xếp các yếu tố, ví dụ, trình tự gen đối nghĩa. Các cây chứa các trình tự này được bao gồm trong thuật ngữ "thực vật chuyển gen".

"Thực vật không chuyển gen" là thực vật mà không được cải biến về mặt di truyền bằng cách đưa nguyên liệu di truyền vào theo các kỹ thuật ADN tái tổ hợp.

Thuật ngữ "loại thường" được dùng trong bản mô tả này để chỉ tế bào, mô, hạt hoặc cây mà không được cải biến theo sáng chế. Tế bào, mô hoặc cây loại thường có thể được dùng làm đối chứng để so sánh mức độ biểu hiện của axit nucleic ngoại sinh hoặc mức độ và bản chất của cải biến tính trạng với tế bào, mô, hạt hoặc cây đã được cải biến như được bộc lộ trong bản mô tả này.

Thuật ngữ cây lúa hoặc hạt lúa "loại thường tương ứng", hoặc các thuật ngữ tương tự, được dùng trong bản mô tả này để chỉ cây lúa hoặc hạt lúa, trong đó chứa ít nhất 50%, tốt hơn nữa nếu ít nhất 75%, tốt hơn nữa nếu ít nhất là 95%, tốt hơn nữa nếu ít nhất là 97%, tốt hơn nữa nếu ít nhất là 99%, và còn tốt hơn nữa 99,5% kiểu di truyền của cây lúa hoặc hạt theo sáng chế, nhưng không bao gồm một hoặc nhiều biến dị di truyền (như biến dị di truyền được đưa vào) mà mỗi biến dị làm giảm hoạt tính của gen *ROS1a* ở cây hoặc hạt, và/hoặc aloron dày. Theo một phương án, hạt lúa hoặc cây lúa theo sáng chế có cùng nguồn gốc với hạt lúa hoặc cây lúa loại thường ngoại trừ một

hoặc nhiều biến dị di truyền (như biến dị di truyền được đưa vào). Tốt hơn, nếu cây hoặc hạt loại thường tương ứng là từ cùng một cây trồng hoặc giống như tổ tiên của cây/hạt theo sáng chế, hoặc dòng cây anh chị em mà thiếu một hoặc nhiều cải biến di truyền và/hoặc không có aloron dày, thường được gọi là "thể phân cách". Theo một phương án, cây lúa hoặc hạt lúa theo sáng chế có kiểu di truyền mà là đồng nhất ở mức độ thấp hơn 50% với kiểu di truyền của giống lúa Zhonghua 11 (ZH11). ZH11 được bán trên thị trường từ năm 1986.

Thực vật chuyển gen, như được xác định trong phạm vi của sáng chế, bao gồm cả cây lúa con mà đã được cải biến về mặt di truyền bằng cách áp dụng các kỹ thuật tái tổ hợp, trong đó các cây con chứa gen chuyên quan tâm. Các cây con này có thể thu được bằng cách tự thụ phấn thực vật chuyển gen chính hoặc bằng cách lai chéo các cây này với cây lúa khác. Nó thường được điều chỉnh sản lượng của ít nhất là một protein như được xác định trong bản mô tả này ở cây hoặc bộ phận của cây mong muốn. Các phần của cây chuyển gen bao gồm tất cả các phần và các tế bào của cây đó chứa gen chuyên, ví dụ, mô, thể sần và thể nguyên sinh được nuôi trồng.

Thuật ngữ "lúa" được dùng trong bản mô tả này để chỉ loài bất kỳ thuộc giống *Oryza*, kể cả thể hệ con của nó, cũng như thể hệ con của nó được tạo ra bởi việc lai chéo với các loài khác. Tốt hơn, nếu cây này là thuộc loài *Oryza* mà được bán trên thị trường, ví dụ, chủng hoặc cây trồng hoặc giống *Oryza sativa* hoặc thích hợp để sản xuất hạt cho mục đích thương mại.

Thuật ngữ "gạo nâu" được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là nguyên hạt gạo kể cả lớp cám và phôi (mầm) nhưng không phải là phần vỏ được loại bỏ, thường là trong quá trình thu hoạch. Tức là gạo nâu chưa được đánh bóng để loại bỏ aloron và phôi. Từ "nâu" được dùng để chỉ sự có mặt của các chất tạo màu nâu hoặc vàng-nâu ở lớp cám. Gạo nâu được xem là nguyên hạt. Thuật ngữ "gạo trắng" (gạo đã được sát) như được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là hạt lúa mà cám và mầm được loại ra từ đó, tức là chủ yếu là nội nhũ tinh bột của cả hạt lúa. Cả hai nhóm hạt lúa này có thể có dạng hạt ngắn, trung bình hoặc dài. Được so sánh với gạo trắng, gạo nâu có hàm lượng protein, các chất khoáng và các vitamin cao hơn và hàm lượng lysin cao hơn trong lượng protein của nó.

Thuật ngữ "gạo màu" được dùng trong bản mô tả này bao gồm gạo màu đen và gạo màu đỏ, mỗi loại chứa các chất tạo màu ở lớp aloron, như proanthoxyanidin (tannin). Gạo màu có hàm lượng riboflavin cao hơn so với gạo không có màu, nhưng hàm lượng thimin tương tự. "Gạo màu đen" có lớp cám màu đen hoặc hầu như là màu đen do các antoxyanin, và có thể chuyển thành màu tím đậm sau khi nấu. "Gạo tím" (còn được gọi là "gạo bị cấm") là biến thể hạt ngắn của gạo màu đen và được đưa vào

gạo màu đen theo sáng chế. Về màu, nó là màu tím ở trạng thái chưa nấu và tím đậm sau khi nấu. “Gạo đỏ” chứa nhiều loại antoxyan khiến cho cám trở thành màu đỏ/nâu sẫm, bao gồm xyanidin-3-glucosit (chrysanthemin) và peonidin-3-glucosit (oxycoccizy-anin).

Mỗi loại trong số các loại hạt lúa này có thể được xử lý để tránh nảy mầm, ví dụ, bằng cách nấu (luộc) hoặc bằng cách làm nóng khô. Gạo nâu và gạo có màu thường được nấu trong khoảng thời gian từ 20 phút đến 40 phút, tùy theo kết cấu mong muốn, trong khi gạo trắng thường được nấu trong thời gian từ 12 phút đến 18 phút. Việc nấu hoặc làm nóng làm giảm lượng của các yếu tố chống dinh dưỡng ở hạt lúa như chất ức chế trypsin, oryzacystatin và haemagglutinin (lectin) bằng cách làm biến tính các protein này, nhưng không giảm hàm lượng phytat. Hạt lúa còn có thể được ngâm ngập trong nước khi nấu, hoặc được nấu chậm trong khoảng thời gian dài hơn, như đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Hạt lúa còn có thể được làm vỡ, được luộc sơ, hoặc được làm ổn định bằng nhiệt. Cám gạo có thể được xử lý bằng hơi để làm ổn định nó, ví dụ, trong khoảng thời gian 6 phút ở nhiệt độ 100°C.

Theo một phương án, hạt theo sáng chế có quá trình thành thực của hạt bị trì hoãn khi so với hạt loại thường tương ứng. Quá trình thành thực bị trì hoãn có thể được xác định bằng cách sử dụng tỷ lệ ra quả ở hạt giống (%) mà cần phải tính tỷ lệ phần trăm của hoa con ở cây mà có hạt giống cho đến giai đoạn hạt thành thực.

Theo một phương án, hạt theo sáng chế có khả năng nảy mầm giảm khi so sánh hạt loại thường tương ứng. Ví dụ, hạt có khoảng 70% đến 80%, hoặc khoảng 75%, tốt hơn là 70% đến 100%, khả năng nảy mầm của hạt loại thường tương ứng khi được nuôi cấy ở nhiệt độ 28°C trong các chu kỳ 12 giờ chiếu sáng/12 giờ bóng tối không kiểm soát độ ẩm trong buồng sinh trưởng. Thuật ngữ “nảy mầm” dùng trong bản mô tả này được xác định là khi nhìn thấy rễ con nảy ra khỏi vỏ hạt giống.

Theo một phương án, cây theo sáng chế có một hoặc nhiều hoặc tất cả trong số chiều cao của cây, khả năng sinh sản (đực và cái), cỡ hạt và trọng lượng của 1000 hạt là bình thường so với giống bố mẹ loại thường (như cây đẳng gen chứa polypeptit ROS1a với trình tự axit amin thể hiện ở SEQ ID NO: 2). Theo một phương án, hạt theo sáng chế có khả năng tạo ra cây lúa mà có một hoặc nhiều hoặc tất cả: chiều cao của cây, khả năng sinh sản (đực và cái), cỡ hạt và trọng lượng của 1000 hạt bình thường so với giống bố mẹ loại thường. Thuật ngữ “bình thường” được dùng trong bản mô tả này có thể được xác định bằng cách đo cùng một tính trạng ở giống bố mẹ loại thường sinh trưởng trong cùng các điều kiện như cây theo sáng chế. Theo một phương án, để là bình thường thì cây theo sáng chế có dấu hiệu xác định ở mức độ/với số lượng v.v. +/-

10%, tốt hơn nữa $\pm 5\%$, tốt hơn nữa $\pm 2,5\%$, còn tốt hơn nữa $\pm 1\%$, khi so với giống bố mẹ loại thường.

Cây chuyển gen, như được xác định trong phạm vi của sáng chế, bao gồm các cây (cũng như các phần và các tế bào các cây này) và thế hệ con của chúng mà đã được cải biến về mặt di truyền bằng cách áp dụng các kỹ thuật tái tổ hợp để khiến tạo ra ít nhất là một polypeptit theo sáng chế ở cây hoặc bộ phận của cây mong muốn. Các cây chuyển gen có thể được tạo ra bằng cách áp dụng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, như các kỹ thuật đã được bộc lộ chung trong các tài liệu: A. Slater *et al.*, *Plant Biotechnology - The Genetic Manipulation of Plants*, Oxford University Press (2003), và P. Christou and H. Klee, *Handbook of Plant Biotechnology*, John Wiley and Sons (2004).

Theo phương án được ưu tiên, các cây chuyển gen là đồng hợp tử đối với từng gen hoặc cấu trúc axit nucleic mà được đưa vào (gen chuyển) sao cho thế hệ con của chúng không phân tách về kiểu hình mong muốn. Các thực vật chuyển gen còn có thể là dị hợp tử đối với (các) gen chuyển được đưa vào, ví dụ, ở thế hệ con F1 mà được sinh trưởng từ hạt giống lai. Các cây này có thể có các ưu điểm như sinh lực lai, đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Theo một phương án, phương pháp chọn lọc cây lúa theo sáng chế còn bao gồm việc phân tích mẫu ADN từ cây theo ít nhất là một "gen đánh dấu di truyền khác". Thuật ngữ "gen đánh dấu di truyền khác" được dùng trong bản mô tả này có thể là các phân tử bất kỳ mà liên kết với một tính trạng mong muốn của cây. Các gen đánh dấu này là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này và bao gồm các phân tử gen đánh dấu liên kết với gen xác định các tính trạng như kháng bệnh, sản lượng, hình thái học của cây, chất lượng hạt, các tính trạng ngủ, màu của hạt, hàm lượng của axit gibberelic trong hạt giống, chiều cao của cây, màu của bột và các tính trạng tương tự. Các ví dụ về các gen này là gen *Rht* mà xác định sự sinh trưởng bán lùn và do đó chống lại bị đè rạp.

Bốn phương pháp chung để chỉ huy sự phân phối gen vào các tế bào đã được bộc lộ: (1) các phương pháp hóa học (Graham *et al.*, 1973); (2) các phương pháp vật lý như nạp vi lượng (Capecchi, 1980); xung điện (ví dụ, xem tài liệu: WO 87/06614, US 5,472,869, 5,384,253, WO 92/09696 và WO 93/21335); và súng gen (ví dụ, xem tài liệu: US 4,945,050 và US 5,141,131); (3) các vật truyền virus (Clapp, 1993; Lu *et al.*, 1993; Eglitis *et al.*, 1988); và (4) các cơ chế gián tiếp qua thụ thể (Curiel *et al.*, 1992; Wagner *et al.*, 1992).

Các phương pháp thúc đẩy mà có thể được áp dụng bao gồm, ví dụ, bắn phá bằng hạt vi mô và các phương pháp tương tự. Một ví dụ về phương pháp phân phối các

phân tử axit nucleic biến nạp đến các tế bào thực vật là bắn phá bằng hạt vi mô. Phương pháp này đã được xem xét trong tài liệu: Yang *et al.*, Particle Bombardment Technology for Gene Transfer, Oxford Press, Oxford, England (1994). Các phân tử phi sinh học (đạn cỡ micro) mà có thể được phủ các axit nucleic và được phân phối vào các tế bào bằng lực đẩy. Các phân tử làm ví dụ là các phân tử bao gồm vonfram, vàng, platin, và các phân tử tương tự. Ưu điểm cụ thể của phương pháp bắn phá bằng hạt vi mô, ngoài việc là cách hiệu quả để biến nạp một cách sinh sản được các cây một lá mầm, là ở chỗ không cần cả việc phân lập thể nguyên sinh, lẫn nhiễm tính miễn cảm của *Agrobacterium*. Hệ phân phối phân tử thích hợp để sử dụng theo sáng chế là súng PDS-1000/He thúc đẩy bằng heli do Bio-Rad Laboratories cung cấp. Để bắn phá, các phôi chưa thành thực hoặc các tế bào đích thu được như mảnh mai hoặc nốt sần từ các phôi chưa thành thực có thể được bố trí trên môi trường nuôi cấy cứng.

Theo phương án thay thế khác, các thể hạt có thể được chuyển nhiễm một cách ổn định. Phương pháp đã bộc lộ để biến nạp thể hạt ở các cây bậc cao bao gồm phân phối ADN bằng súng bắn gen chứa gen đánh dấu chọn lọc được và hướng đích ADN đến hệ gen của thể hạt thông qua tái tổ hợp tương đồng (xem các patent Mỹ số US 5,451,513, US 5,545,818, US 5,877,402, US 5,932,479, và công bố quốc tế số WO 99/05265).

Việc chuyển qua *Agrobacterium* là hệ được áp dụng rộng rãi để đưa gen vào các tế bào thực vật vì ADN có thể được đưa vào mô thực vật nguyên vẹn, nhờ đó bỏ qua được nhu cầu phục hồi cây nguyên vẹn từ thể nguyên sinh. Việc sử dụng cây tích hợp vật truyền gián tiếp qua *Agrobacterium* để đưa ADN vào các tế bào thực vật là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này (ví dụ, xem các patent Mỹ số US 5,177,010, US 5,104,310, US 5,004,863, US 5,159,135). Ngoài ra, việc gắn T-ADN là quy trình tương đối chính xác tạo ra một vài cách sắp xếp lại. Vùng ADN cần được chuyển được xác định bởi các trình tự viền, và ADN cần thiết thường được cài xen vào hệ gen của cây đó.

Cây chuyển gen thu được bằng cách áp dụng các phương pháp biến nạp *Agrobacterium* thường chứa một locus di truyền trên một nhiễm sắc thể. Các cây chuyển gen này có thể được gọi là bán hợp tử đối với gen được bổ sung vào. Được ưu tiên hơn nữa là cây chuyển gen mà là đồng hợp tử đối với cấu trúc gen được bổ sung vào; tức là cây chuyển gen mà chứa hai gen được bổ sung vào, một gen ở cùng locus trên mỗi nhiễm sắc thể của cặp nhiễm sắc thể. Cây chuyển gen đồng hợp tử có thể thu được bằng cách giao phối theo giới tính (tự) cây chuyển gen tách độc lập mà chứa một gen được bổ sung vào, cho nảy mầm một vài trong số các hạt giống tạo ra và phân tích các cây thu được về gen quan tâm.

Các phương pháp biến nạp tế bào khác cũng có thể được áp dụng và bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, việc đưa ADN vào cây theo cách chuyển ADN trực tiếp vào phấn hoa, bằng cách nạp trực tiếp ADN vào cơ quan sinh sản của cây, hoặc bằng cách nạp trực tiếp ADN vào tế bào của phôi chưa thành thực tiếp theo là hydrat hóa lại các phôi đã được làm khô.

Việc phục hồi, phát triển, và trồng trọt cây từ các thể biến nạp nguyên sinh thực vật đơn hoặc từ một số mô cây đã được biến nạp là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này (xem tài liệu: Weissbach *et al.*, *Methods for Molecular Biology*, Academic Press, San Diego, (1988)). Quá trình phục hồi và sinh trưởng này thường bao gồm các bước chọn lọc tế bào đã được biến nạp, nuôi cấy các tế bào đã được cá biệt hóa thông qua các giai đoạn thông thường của quá trình phát triển phôi đến giai đoạn cây non đã bén rễ. Các phôi và hạt chuyển gen được tái tạo theo cách tương tự. Sau đó, chồi chuyển gen bén rễ thu được được trồng trong môi trường thích hợp để nuôi cấy cây như đất.

Sự phát triển hoặc phục hồi của các cây chứa gen lạ, ngoại sinh là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Tốt hơn, nếu cây đã được phục hồi được tự thụ phấn để tạo ra các cây chuyển gen đồng hợp tử. Theo cách khác, phấn hoa thu được từ cây đã được phục hồi được lai chéo với cây trồng bằng hạt giống của các dòng quan trọng về mặt nông nghiệp. Ngược lại, phấn hoa từ các cây trong số các dòng quan trọng này được sử dụng để thụ phấn cho các cây đã phục hồi. Cây chuyển gen theo sáng chế chứa axit nucleic ngoại sinh mong muốn được nuôi trồng bằng cách áp dụng các phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Để xác nhận sự có mặt của các gen chuyển trong các tế bào và các cây chuyển gen, việc khuếch đại bằng phản ứng chuỗi polymeraza (PCR) hoặc phân tích thâm Nam có thể được thực hiện bằng cách áp dụng các phương pháp mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết. Các sản phẩm biểu hiện của các gen chuyển có thể được dò theo cách bất kỳ, tùy theo bản chất của sản phẩm, và bao gồm thâm tây và thử nghiệm enzym. Một cách đặc biệt hữu ích để định lượng mức độ biểu hiện protein và để phát hiện sao chép ở các mô thực vật khác nhau là sử dụng gen thông báo, như GUS. Sau khi thu được các cây chuyển gen, chúng có thể được trồng để tạo ra mô thực vật hoặc các phần có kiểu hình mong muốn. Mô thực vật hoặc các phần của cây, có thể được thu hoạch, và/hoặc hạt giống được gom. Hạt giống có thể có tác dụng làm nguồn để trồng thêm các cây bổ sung có mô hoặc phần có các đặc tính mong muốn.

Chọn lọc với sự trợ giúp của gen đánh dấu

Chọn lọc với sự trợ giúp của gen đánh dấu là phương pháp được chấp nhận để chọn lọc các cây dị hợp tử cần thiết khi lai chéo với cha mẹ truy hồi theo chương trình

nhân giống kinh điển. Quần thể cây ở mỗi thế hệ lai chéo sẽ là dị hợp tử đối với gen quan tâm thường có mặt theo tỷ lệ 1:1 ở quần thể lai chéo, và phân tử gen đánh dấu có thể được sử dụng để phân biệt hai alen của gen này. Bằng cách chiết ADN, ví dụ, từ chồi non và thử nghiệm bằng một gen đánh dấu cụ thể về tính trạng mong muốn đã được đưa vào, việc chọn lọc sớm cây để lai chéo tiếp được thực hiện trong khi năng lượng và nguồn lực được tập trung trên một số ít cây. Để thúc đẩy hơn nữa chương trình lai chéo, phôi từ hạt chưa thành thực (25 ngày sau khi nở hoa) có thể được cắt và được cho sinh trưởng trên môi trường dinh dưỡng trong các điều kiện vô trùng, hơn là cho phép thành thực hạt giống đầy đủ. Quy trình này, được gọi là "giải thoát phôi", được áp dụng kết hợp với việc chiết ADN ở giai đoạn ba lá và phân tích ít nhất là một biến dị di truyền mà làm thay đổi hoạt tính *ROS1a* và truyền cho cây độ dày tăng của aloron, cho phép chọn lọc nhanh các cây mang tính trạng mong muốn, mà có thể được nuôi trồng đến thành thực trong nhà kính hoặc trên cánh đồng cho bước lai chéo tiếp theo với cha mẹ truy hồi.

Kỹ thuật sinh học phân tử bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể được áp dụng trong các phương pháp theo sáng chế. Các phương pháp này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, việc áp dụng khuếch đại axit nucleic, xác định trình tự axit nucleic, lai axit nucleic với mẫu đã được đánh dấu thích hợp, phân tích hình thể sợi đơn (single-strand conformational analysis - SSCA), điện di gel theo gradient làm biến tính (denaturing gradient gel electrophoresis - DGGE), phân tích chuỗi kép dị hợp (chuỗi kép dị hợp analysis - HET), phân tích phân cắt hóa học (chemical cleavage analysis - CCM), phân cắt axit nucleic có xúc tác hoặc kết hợp chúng (ví dụ, xem các tài liệu: Lemieux, 2000; Langridge *et al.*, 2001). Sáng chế còn bao gồm việc sử dụng các kỹ thuật phân tử gen đánh dấu để phát hiện dạng đa hình liên kết với alen (ví dụ) của gen *ROS1a* mà làm thay đổi hoạt tính *ROS1a* và mà truyền cho cây độ dày tăng của aloron. Các phương pháp này bao gồm việc dò hoặc phân tích dạng đa hình theo chiều dài phân đoạn cắt giới hạn (restriction fragment length polymorphism - RFLP), RAPD, dạng đa hình theo chiều dài phân đoạn đã được khuếch đại (amplified fragment length polymorphism - AFLP) và dạng đa hình vệt tinh nhỏ (lặp lại trình tự đơn giản, simple sequence repeat - SSR). Các gen đánh dấu liên kết gần có thể dễ dàng thu được theo các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, như phân tích thể phân ly gộp, như được xem xét trong tài liệu: Langridge *et al.* (2001).

Theo một phương án, các locus liên kết để chọn lọc với sự trợ giúp của gen đánh dấu trong khoảng cách ít nhất là 1cM, hoặc 0,5cM, hoặc 0,1cM, hoặc 0,01cM từ gen ghi mã polypeptit theo sáng chế.

"Phản ứng chuỗi polymeraza" (polymerase chain reaction - "PCR") là phản ứng, trong đó các bản sao sao chép được tạo ra từ polynucleotit đích bằng cách sử dụng "cặp đoạn môi" hoặc "bộ đoạn môi" bao gồm đoạn môi "trước" và đoạn môi "sau", và chất xúc tác polyme hóa, như ADN polymeraza, và thông thường cả enzym polymeraza bền nhiệt. Các phương pháp PCR là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, và được bộc lộ, ví dụ, trong tài liệu "PCR" (M.J. McPherson and S.G. Moller (editors), BIOS Scientific Publishers Ltd, Oxford, (2000)). PCR có thể được thực hiện trên ADN hỗ trợ thu được từ việc phiên mã ngược ARN thông tin phân lập được từ các tế bào thực vật biểu hiện gen *ROS1a* hoặc alen mà trên đó cây tăng độ dày của aloron. Tuy nhiên, việc thực hiện PCR trên ADN hệ gen phân lập được từ cây thường là dễ dàng hơn.

Đoạn môi là trình tự oligonucleotit mà có khả năng lai theo kiểu đặc hiệu trình tự với trình tự đích và được mở rộng trong quá trình PCR. Các đơn vị siêu sao chép hoặc các sản phẩm PCR hoặc các đoạn PCR hoặc các sản phẩm khuếch đại là các sản phẩm mở rộng mà bao gồm đoạn môi này và bản sao mới được tổng hợp của các trình tự đích. Hệ PCR đa thành phần bao gồm nhiều bộ đoạn môi mà khiến tạo ra đồng thời nhiều hơn một đơn vị siêu sao chép. Các đoạn môi có thể phù hợp một cách hoàn hảo với trình tự đích hoặc chúng có thể chứa các bazơ nội bộ không ghép đôi phù hợp mà có thể gây ra đưa vào enzym cắt giới hạn hoặc các vị trí nhận biết/phân cắt axit nucleic có xúc tác trong trình tự đích cụ thể. Các đoạn môi còn có thể chứa các trình tự bổ sung và/hoặc chứa các nucleotit đã được cải biến hoặc đánh dấu để tạo điều kiện thuận lợi cho việc giành được hoặc dò được các đơn vị siêu sao chép. Các chu kỳ làm biến tính ADN bằng nhiệt lặp lại, ghép đôi các đoạn môi với các trình tự bổ trợ của chúng và mở rộng các đoạn môi đã được ghép đôi với polymeraza gây ra việc khuếch đại theo số mũ trình tự đích. Các thuật ngữ đích hoặc trình tự đích hoặc khuôn là các trình tự axit nucleic mà được khuếch đại.

Các phương pháp trực tiếp xác định trình tự của các trình tự nucleotit là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này và có thể được tìm thấy theo trong các tài liệu: Ausubel *et al.*, (nêu trên) và Sambrook *et al.*, (nêu trên) chẳng hạn. Việc xác định trình tự có thể được thực hiện theo phương pháp thích hợp bất kỳ, ví dụ, xác định trình tự đideoxy, xác định trình tự hóa học hoặc các biến thể của chúng. Việc xác định trình tự trực tiếp có ưu điểm xác định biến đổi ở cặp bazơ bất kỳ của trình tự cụ thể.

TILLING

Cây theo sáng chế có thể được tạo ra bằng cách áp dụng quy trình đã được biết là TILLING (Targeting Induced Local Lesions IN Genomes). Ở bước thứ nhất, các đột

biến được đưa vào như các thay đổi mới ở một cặp bazơ được cảm ứng ở quần thể thực vật bằng cách xử lý hạt giống (hoặc phấn hoa) bằng tác nhân gây đột biến hóa học, và sau đó đưa các cây đến thế hệ mà các đột biến được thừa hưởng một cách ổn định. ADN được chiết, và hạt được bảo quản từ tất cả các thành viên của quần thể để tạo ra nguồn mà có thể được tiếp cận một cách lặp lại sau một khoảng thời gian.

Đối với thử nghiệm TILLING, các đoạn mồi PCR được thiết kế để khuếch đại một cách đặc hiệu một gen đích quan tâm. Tính đặc hiệu là vô cùng quan trọng nếu đích là một thành viên của nhóm gen hoặc một phần của hệ gen đa bội. Tiếp theo, các đoạn mồi đã được đánh dấu bằng màu có thể được dùng để khuếch đại các sản phẩm PCR từ ADN gom được từ nhiều cá thể. Các sản phẩm PCR này bị biến tính và được ghép đôi lại để cho phép tạo ra các cặp bazơ ghép đôi không phù hợp. Lỗi ghép đôi, hoặc các chuỗi kép dị hợp, cả hai đều là dạng đa hình nucleotit đơn có trong tự nhiên (SNP) (tức là vài cây trong quần thể có thể mang cùng dạng đa hình) và SNP được cảm ứng (tức là chỉ các cây hiếm riêng lẻ có thể biểu hiện đột biến này). Sau khi hình thành chuỗi kép dị hợp, việc sử dụng endonucleaza, như Cel I, mà nhận biết và phân cắt ADN ghép đôi không phù hợp là chìa khóa để phát hiện các SNP mới trong quần thể TILLING.

Bằng cách áp dụng cách thức này, hàng nghìn cây có thể được sàng lọc để xác định cá thể bất kỳ có một thay đổi về bazơ cũng như các cài xen hoặc loại bỏ nhỏ (1 đến 30 cặp bazơ) ở gen bất kỳ hoặc vùng cụ thể của hệ gen. Các đoạn hệ gen được thử nghiệm có thể có kích thước nằm trong khoảng từ 0,3kb đến 1,6kb. Sau 8 lần gom, các đoạn 1,4kb (bớt đi các đầu tận cùng của các đoạn nơi việc dò SNP có vấn đề do nhiễu) và 96 lần mỗi thử nghiệm, tổ hợp này cho phép đến hàng triệu cặp bazơ của ADN hệ gen được sàng lọc ở mỗi thử nghiệm, khiến cho TILLING là kỹ thuật hiệu suất cao.

TILLING còn được bộc lộ trong các tài liệu của Slade và Knauf (2005), và Henikoff và các đồng tác giả (2004).

Ngoài việc cho phép dò các đột biến một cách hiệu quả, công nghệ TILLING hiệu suất cao là lý tưởng để dò dạng đa hình tự nhiên. Do đó, việc truy vấn một ADN tương đồng không biết bằng cách tạo chuỗi kép dị hợp với trình tự đã biết cho biết số lượng và vị trí của các vị trí đa hình. Cả các thay đổi nucleotit và các cài xen và loại bỏ nhỏ được xác định, bao gồm ít nhất một số dạng đa hình lặp lại. Hiện tượng này được gọi là Ecotilling (xem tài liệu: Comai *et al.*, 2004).

Mỗi SNP được ghi nhận theo vị trí gần đúng của nó trong vòng vài nucleotit. Do đó, mỗi kiểu đơn có thể được lưu trữ trên cơ sở tính dễ thay đổi của nó. Dữ liệu về trình tự có thể thu được với cố gắng gia tăng tương đối ít bằng cách sử dụng các phân phân ước của cùng một ADN đã được khuếch đại mà được sử dụng cho thử nghiệm phân cắt

ghép đôi không phù hợp. Đoạn mỗi xác định trình tự trái hoặc phải cho một phản ứng được chọn theo mức độ gần đa hình của nó. Phần mềm xác định trình tự thực hiện nhiều bước đuổi thẳng và phát hiện thay đổi về bazơ, mà trong mỗi trường hợp xác nhận dải gel.

Ecotilling có thể được thực hiện một cách đỡ tốn kém hơn việc xác định trình tự đầy đủ, phương pháp này hiện được sử dụng cho hầu hết phát hiện SNP. Các đĩa chứa ADN sinh thái tĩa có thể được sàng lọc hơn là các vốn ADN từ các cây đã được gây đột biến. Vì dò được thực hiện trên gel với việc phân giải cặp bazơ gần và các mẫu hình nền là thống nhất ở các làn, các dải mà có kích thước đồng nhất có thể được ghép đôi phù hợp, nhờ đó phát hiện và xác định kiểu di truyền của các SNP trong một bước. Theo cách này, việc xác định trình tự cơ bản của SNP là đơn giản và hiệu quả, hơn thế nữa được thực hiện vì các phản phân ước của cùng các sản phẩm PCR được sử dụng để sàng lọc có thể được đưa đến bước xác định trình tự ADN.

Xử lý hạt

Do aloron dày, hạt lúa theo sáng chế, và bột và cám của nó, có hàm lượng dinh dưỡng tốt hơn. Mô aloron phân lập cần chứa lượng tinh bột và vỏ thấp, và là a phần chính của các chất có lợi về mặt sinh lý ở hạt cho nhu cầu dinh dưỡng ở người. Ví dụ, hạt theo sáng chế và/hoặc bột tạo ra được từ đó chứa, so với hạt loại thường tương ứng và/hoặc bột tạo ra được từ đó, một hoặc nhiều hoặc toàn bộ các thành phần dưới đây, mọi thành phần đều được tính theo trọng lượng,

i) hàm lượng khoáng cao hơn như cao hơn ít nhất là khoảng 20% hoặc ít nhất là khoảng 25%, tốt hơn là hàm lượng khoáng là hàm lượng của một hoặc nhiều hoặc tất cả bao gồm kẽm (như cao hơn ít nhất là khoảng 10% hoặc ít nhất là khoảng 15%), sắt (như cao hơn ít nhất là khoảng 10% hoặc ít nhất là khoảng 15%), kali (như cao hơn ít nhất là khoảng 20% hoặc ít nhất là khoảng 25%), magie (như cao hơn ít nhất là khoảng 18% hoặc ít nhất là khoảng 22%), phospho (như cao hơn ít nhất là khoảng 17% hoặc ít nhất là khoảng 21%) và lưu huỳnh (như cao hơn ít nhất là khoảng 5% hoặc ít nhất là khoảng 8%),

ii) hàm lượng chất chống oxy hóa cao hơn như ít nhất là khoảng 25%, hoặc ít nhất là khoảng 35%, nhiều hơn tổng các hợp chất phenol, và/hoặc ít nhất là khoảng 60%, hoặc ít nhất là khoảng 70%, nhiều các chất chống oxy hóa ưa nước hơn,

iii) hàm lượng phytat cao hơn như cao hơn ít nhất là khoảng 10% hoặc ít nhất là khoảng 15%,

iv) hàm lượng cao hơn của một hoặc nhiều hoặc tất cả các vitamin B3, B6 và B9,

v) hàm lượng cao hơn của chất xơ trong chế độ dinh dưỡng và/hoặc hàm lượng chất xơ không hòa tan (như tổng hàm lượng chất xơ cao hơn ít nhất là khoảng 150%, hoặc ít nhất là khoảng 180%),

vi) hàm lượng tinh bột nằm trong khoảng từ 90% đến 100% trọng lượng so với hàm lượng tinh bột của hạt loại thường tương ứng,

vii) hàm lượng sucroza cao hơn,

viii) hàm lượng monosacarit cao hơn (ví dụ hàm lượng arabinoza, xyloza, galactoza, glucoza) như cao hơn ít nhất là khoảng 1,5 lần hoặc ít nhất là khoảng 2 lần,

ix) hàm lượng chất béo cao hơn như cao hơn ít nhất là khoảng 20%, ít nhất là khoảng 30% hoặc ít nhất là khoảng 50%, hoặc khoảng 50%, và

x) các mức nồng độ nitơ tương tự.

Mỗi thành phần trong các thành phần dinh dưỡng này của hạt có thể được xác định bằng cách áp dụng các kỹ thuật thông thường như nêu trong các Ví dụ 1 và 5.

Theo một phương án, hạt lúa theo sáng chế và/hoặc bột tạo ra được từ đó, chứa một hoặc nhiều hoặc toàn bộ dưới đây, mọi thành phần đều được tính theo trọng lượng,

i) nhiều chất béo hơn ít nhất là khoảng 20%, ít nhất là khoảng 30% hoặc ít nhất là khoảng 50%, hoặc khoảng 50% so với hạt/bột loại thường tương ứng,

ii) tổng phytat ít nhất là khoảng 11mg/g hoặc ít nhất là khoảng 12mg/g,

iii) hàm lượng khoáng trong bột thu được từ hạt nhiều hơn ít nhất là khoảng 20% hoặc ít nhất là khoảng 25% so với bột từ hạt loại thường tương ứng,

iv) tổng kẽm ít nhất là khoảng 14mg/kg hoặc ít nhất là khoảng 15mg/kg,

v) tổng sắt ít nhất là khoảng 13 mg/kg hoặc ít nhất là khoảng 13,5mg/kg,

vi) tổng chất xơ nhiều hơn ít nhất là khoảng 150%, hoặc ít nhất là khoảng 180% so với hạt/bột loại thường tương ứng,

vii) hàm lượng tinh bột mà nằm trong khoảng từ 90% đến 100% trọng lượng so với hàm lượng tinh bột của hạt/bột loại thường tương ứng,

viii) hàm lượng monosacarit (ví dụ hàm lượng arabinoza, xyloza, galactoza, glucoza) cao hơn ít nhất là khoảng 1,5 lần hoặc ít nhất là khoảng 2 lần so với hạt/bột loại thường tương ứng, và

ix) tổng các hợp chất phenol nhiều hơn ít nhất là khoảng 25%, hoặc ít nhất là khoảng 35%, và/hoặc các chất chống oxy hóa ưa nước nhiều hơn ít nhất là khoảng 60%, hoặc ít nhất là khoảng 70%, so với hạt/bột loại thường tương ứng.

Theo một phương án, hạt này chứa tỷ phần amyloza cao hơn trong tổng hàm lượng tinh bột của nó so với hạt loại thường tương ứng. Các phương pháp tạo ra hạt này đã được bộc lộ, ví dụ, trong các công bố đơn quốc tế số WO 2002/037955, WO

2003/094600, WO 2005/040381, WO 2005/001098, WO 2011/011833 và WO 2012/103594.

Theo một phương án, hạt theo sáng chế chứa tỷ phần axit oleic cao hơn và/hoặc tỷ phần axit palmitic thấp hơn trong tổng hàm lượng axit béo của nó so với hạt loại thường tương ứng. Các phương pháp tạo ra hạt này đã được bộc lộ, ví dụ, trong các công bố đơn quốc tế số WO 2008/006171 và WO 2013/159149.

Hạt/hạt giống theo sáng chế, hoặc phần khác của cây theo sáng chế, có thể được xử lý để tạo ra thành phần thực phẩm, thực phẩm hoặc sản phẩm phi thực phẩm bằng cách áp dụng kỹ thuật bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Thuật ngữ "thành phần thực phẩm hoặc đồ uống khác" được dùng trong bản mô tả này để chỉ chất liệu bất kỳ thích hợp để tiêu thụ bởi động vật, tốt hơn là chất bất kỳ thích hợp để dùng cho người, khi được cung cấp làm một phần của thực phẩm hoặc đồ uống. Các ví dụ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, hạt từ các giống cây khác, đường, v.v., nhưng không kể nước.

Theo một phương án, sản phẩm là bột của hạt nguyên vẹn, ví dụ, bột nghiền siêu mịn của hạt nguyên vẹn, hoặc bột được tạo ra từ 100% hạt. Bột của hạt nguyên vẹn bao gồm thành phần bột tinh chế (bột tinh chế hoặc bột tinh luyện) và phân đoạn thô (phân đoạn thô đã được nghiền siêu mịn).

Bột tinh chế có thể là bột mà được chế biến, ví dụ, bằng cách nghiền và sàng hạt đã được làm sạch. Cỡ hạt bột tinh chế được mô tả ở dạng bột, trong đó không ít hơn 98% đi qua vải có lỗ không to hơn lỗ của vải lưới dệt gọi là "212 micromet (U.S. Wire 70)". Phân đoạn thô bao gồm ít nhất là một trong số: cám và mầm. Ví dụ, mầm là phôi thực vật nằm trong nhân của hạt. Mầm chứa lipid, chất xơ, các vitamin, protein, các chất khoáng và các chất dinh dưỡng thực vật, như các flavonoid. Cám bao gồm vài lớp tế bào và chứa lượng đáng kể lipid, chất xơ, các vitamin, protein, các chất khoáng và các chất dinh dưỡng thực vật, như các flavonoid. Ngoài ra, phân đoạn thô có thể bao gồm lớp aluron mà còn bao gồm lipid, chất xơ, các vitamin, protein, các chất khoáng và các chất dinh dưỡng thực vật, như các flavonoid. Lớp aluron, dù về mặt kỹ thuật được xem là một phần của nội nhũ, thể hiện nhiều tính chất giống như cám và do đó thường được loại ra cùng với cám và mầm trong quá trình nghiền. Lớp aluron chứa các protein, các vitamin và các chất dinh dưỡng thực vật, như axit ferulic.

Hơn thế nữa, phân đoạn thô có thể được trộn với thành phần bột tinh chế. Phân đoạn thô có thể được trộn với thành phần bột tinh chế để tạo thành bột của hạt nguyên vẹn, nhờ đó cung cấp bột của hạt nguyên vẹn với giá trị dinh dưỡng, hàm lượng chất xơ, và khả năng của chất chống oxy hóa cao hơn so với bột tinh chế. Ví dụ, phân đoạn thô hoặc bột của hạt nguyên vẹn có thể được dùng với các lượng khác nhau để thay thế

bột tinh chế hoặc bột của hạt nguyên vẹn trong các món nướng, các sản phẩm ăn qua loa, và thực phẩm. Bột của hạt nguyên vẹn theo sáng chế (tức là - bột nghiền siêu mịn của hạt nguyên vẹn) còn có thể đưa trực tiếp ra thị trường đến người tiêu dùng để dùng trong các sản phẩm nướng tại nhà của họ. Theo một phương án làm ví dụ, a biên dạng nghiền hạt của bột của hạt nguyên vẹn là sao cho 98% phần tử tính theo trọng lượng của bột của hạt nguyên vẹn là bé hơn 212 micromet.

Theo phương án khác nữa, các enzym tìm thấy trong cám và mầm của bột của hạt nguyên vẹn và/hoặc phân đoạn thô được làm bất hoạt để làm ổn định bột của hạt nguyên vẹn và/hoặc phân đoạn thô. Làm ổn định là quy trình sử dụng hơi, nhiệt, bức xạ, hoặc xử lý khác để làm bất hoạt các enzym tìm thấy ở lớp cám và mầm. Bột mà đã được làm ổn định duy trì các tính chất của nó trong nấu nướng và có thời hạn sử dụng dài hơn.

Theo các phương án bổ sung, bột của hạt nguyên vẹn, phân đoạn thô, hoặc bột tinh chế có thể là thành phần (cấu thành) của thực phẩm và có thể được sử dụng để tạo ra thực phẩm. Ví dụ, thực phẩm có thể là bánh vòng, bánh quy, bánh mì, bánh bao nhân nho, bánh sừng bò, bánh bao, bánh nướng xốp kiểu Anh, bánh nướng xốp, bánh mì ổ dẹt, bánh làm nhanh không ủ lên men, sản phẩm bột nhào để tủ lạnh/đông lạnh, bột nhào, đậu nướng, burrito, ớt, bánh taco, tamale, bánh bắp, bánh pot pie, ngũ cốc ăn liền, bữa ăn sẵn sàng, hỗn hợp nhồi, thức ăn chế biến bằng vi sóng, bánh socola hạnh nhân, bánh ngọt, bánh ngọt phomai, bánh ngọt cà phê, bánh dẹt nhỏ, đồ ăn tráng miệng, bột nhồi, bánh cuộn ngọt, thanh kẹo, vỏ bánh, nhân bánh, thực phẩm dùng cho trẻ em, hỗn hợp nướng, bột nhào, bánh mì, hỗn hợp nước xốt, phụ gia thịt, thành phần thay thế thịt, hỗn hợp gia vị, hỗn hợp súp, nước xốt, nước cốt cho nước xốt, gia vị trộn salad, súp, kem chua, mì, mì ống, mì ramen, mì xào, mì xào lo mein, kem xúc, kem que, kem ốc quế, kem kẹp, bánh quy giòn, bánh mì nướng, bánh rán, trứng cuộn, đồ ăn nhẹ ở dạng ép đùn, thanh quả và hạt, thực phẩm ăn qua loa chế biến bằng vi sóng, thanh dinh dưỡng, bánh kẹp, sản phẩm bánh kiểu nướng, bánh quy cây, bánh pudding, thực phẩm trên cơ sở món ăn sáng granola, khoai tây lát rán để ăn vặt, thực phẩm ăn vặt, hỗn hợp ăn vặt, bánh xốp, vỏ bánh pizza, thức ăn cho động vật hoặc thực phẩm cho thú cưng.

Theo các phương án thay thế, bột của hạt nguyên vẹn, bột tinh chế, hoặc phân đoạn thô có thể là thành phần bổ sung dinh dưỡng. Ví dụ, thành phần bổ sung dinh dưỡng có thể là sản phẩm mà được bổ sung vào chế độ ăn chứa một hoặc nhiều thành phần bổ sung, thường bao gồm: các vitamin, các chất khoáng, các thảo mộc, các axit amin, các enzym, các chất chống oxy hóa, các thảo mộc, các loại gia vị, các vi khuẩn có lợi, các chiết xuất, chất tiền trợ sinh và chất xơ. Bột của hạt nguyên vẹn, bột tinh chế

hoặc phân đoạn thô theo sáng chế bao gồm các vitamin, các chất khoáng, các axit amin, các enzym, và chất xơ. Ví dụ, phân đoạn thô chứa lượng cô đặc các chất xơ để ăn cũng như các chất dinh dưỡng thiết yếu khác, như các vitamin nhóm B, selen, crom, mangan, magie, và các chất chống oxy hóa, mà là thiết yếu đối với chế độ dinh dưỡng có lợi cho sức khỏe. Ví dụ, 22 gam phân đoạn thô theo sáng chế cung cấp 33% lượng chất xơ khuyến cáo tiêu thụ hàng ngày cho mỗi cá thể. Thành phần bổ sung dinh dưỡng có thể bao gồm các thành phần dinh dưỡng bất kỳ đã biết mà sẽ hỗ trợ sức khỏe nói chung của cá thể, các ví dụ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các vitamin, các chất khoáng, các thành phần xơ khác, các axit béo, các chất chống oxy hóa, axit amin, các peptit, các protein, lutein, riboza, các axit béo omega-3, và/hoặc các thành phần dinh dưỡng khác. Thành phần bổ sung có thể được phân phối ở dạng, nhưng không chỉ giới hạn ở, hỗn hợp đồ uống dùng liền, đồ uống dùng được ngay, thanh dinh dưỡng, bánh xốp, bánh quy, bánh quy giòn, các viên gel, các viên nang, các kẹo nhai, các viên nén nhai được, và các viên tròn. Một phương án phân phối thành phần bổ sung xơ ở dạng đồ lắc có vị hoặc đồ uống kiểu mạch nha, phương án này có thể là đặc biệt hấp dẫn đối với thành phần bổ sung chất xơ cho trẻ em.

Theo phương án khác, quy trình nghiền có thể được áp dụng để tạo ra bột đa hạt hoặc phân đoạn thô đa hạt. Ví dụ, cám và mầm từ một loại hạt có thể được nghiền và được trộn với nội nhũ đã được nghiền hoặc bột ngũ cốc nguyên hạt của loại ngũ cốc khác. Theo cách khác, cám và mầm của cùng một loại hạt có thể được nghiền và được trộn với nội nhũ đã được nghiền hoặc bột của hạt nguyên vẹn của loại hạt khác. Dự định rằng sáng chế bao gồm việc trộn tổ hợp bất kỳ gồm một hoặc nhiều cám, mầm, nội nhũ, và bột của hạt nguyên vẹn của một hoặc nhiều hạt. Cách thức đa hạt này có thể được áp dụng để tạo ra bột tùy biến và sử dụng chất lượng và hàm lượng dinh dưỡng của nhiều loại hạt ngũ cốc để tạo ra một loại bột.

Dự tính rằng bột của hạt nguyên vẹn, phân đoạn thô và/hoặc các sản phẩm hạt theo sáng chế có thể được tạo ra theo quy trình nghiền bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Phương án làm ví dụ bao gồm nghiền hạt trong một dòng không tách nội nhũ, cám, và mầm của hạt thành các dòng riêng. Hạt sạch và đã được xử lý được vận chuyển đến thiết bị nghiền giai đoạn thứ nhất, như máy nghiền búa, máy nghiền lăn, máy nghiền trục, máy nghiền ép, máy nghiền đĩa, nghiền xát bằng không khí, nghiền cán rên, hoặc thiết bị tương tự. Sau khi nghiền, hạt được dỡ xuống và vận chuyển đến sàng rây. Ngoài ra, dự định rằng bột của hạt nguyên vẹn, phân đoạn thô và/hoặc các sản phẩm hạt theo sáng chế có thể được điều chỉnh hoặc nâng cao theo nhiều quy trình khác như: lên men, xử lý để dùng liền, ép đùn, bao viên nang, nướng, quay, hoặc xử lý tương tự.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1. Các nguyên liệu và các phương pháp chung

Quan sát aloron bằng cách nhuộm bằng dung dịch màu đỏ Sudan

Dung dịch nhuộm được điều chế bằng cách bổ sung 1g thuốc đỏ Sudan IV vào 50ml dung dịch polyetylen glycol (phân tử lượng trung bình 400, do Sigma cung cấp, sản phẩm theo danh mục số 202398), ủ ở nhiệt độ 90°C trong thời gian một giờ, và được trộn với thể tích ngang bằng 90% glyxerol. Sau khi loại bỏ vỏ quả (trấu trên và trấu dưới) của từng hạt, hạt gạo thành thực được ủ trong nước cất trong thời gian năm giờ và sau đó được cắt theo chiều ngang hoặc theo chiều dọc bằng cách sử dụng lưỡi dao bào. Các phần được nhuộm trong dung dịch màu đỏ Sudan ở nhiệt độ trong phòng trong khoảng thời gian từ 24 giờ đến 72 giờ. Sau đó, các đoạn này được nhuộm ngược bằng dung dịch nhuộm Lugol ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 20 phút (do Sigma cung cấp, 32922) và được quan sát dưới kính hiển vi phân tích (do Sreenivasulu cung cấp, 2010).

Nhuộm aloron bằng xanh Evans

Dung dịch nhuộm xanh Evans được điều chế bằng cách hòa tan 0,1g xanh Evans (do Sigma cung cấp, E2129) trong 100ml nước cất. Sau khi loại bỏ vỏ quả (mày và màng) của từng hạt, hạt gạo thành thực được cắt thành lát theo chiều ngang bằng cách sử dụng lưỡi dao bào. Các lát được ủ trong nước cất ở nhiệt độ trong phòng trong khoảng thời gian 30 phút, màu nhuộm được bổ sung vào và được để ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 2 phút. Sau đó, dung dịch màu nhuộm được gạn, các lát này được rửa hai lần bằng nước cất và được quan sát trên kính hiển vi phân tích.

Quan sát nội nhũ gạo trên kính hiển vi ánh sáng

Hạt gạo được cố định trong dung dịch formalin-axit axetic-rượu (FAA) (60% etanol, 5% axit axetic băng và 2% formaldehyt), được khử khí trong thời gian một giờ, đã được loại nước trong một loạt dung dịch rượu chứa 70%, 80%, 95% và tiếp đó 100% etanol, được thâm nhiễm bằng nhựa trắng LR (Electron Microscopy Sciences, 14380) và polyme hóa trong khoảng thời gian 24 giờ ở nhiệt độ 60°C. Việc cắt lát bằng thiết bị vi phẫu được thực hiện bằng cách sử dụng thiết bị vi phẫu Leica UC7. Các lát được nhuộm trong dung dịch xanh toluidin 0,1% (do Sigma cung cấp, T3260) ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 2 phút, sau đó được rửa hai lần bằng nước cất và được kiểm tra bằng kính hiển vi quang học. Theo cách khác, các lát được nhuộm trong dung

dịch trắng Calcofluor 0,01% (do Sigma cung cấp, 18909) ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 2 phút và được kiểm tra bằng kính hiển vi quang học.

Nhuộm PAS và xanh Commassie

Các lát đã được cố định trên bản kính được ủ trong axit periodic 0,4% (do Sigma cung cấp, 375810) đã được làm nóng trước ở 57°C trong khoảng thời gian 30 phút, sau đó được rửa ba lần trong nước cất. Chất phản ứng Schiff (do Sigma cung cấp, 3952016) được dùng và các bản kính này được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 15 phút, sau đó được rửa ba lần trong nước cất. Tiếp đó, các lát này được ủ trong xanh Coomassie 1% (R-250), do ThermoScientific cung cấp, 20278) ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 2 phút, và được rửa ba lần trong nước cất. Bước loại nước các lát này được thực hiện bằng cách sử dụng một loạt dung dịch rượu chứa 30%, 50%, 60%, 75%, 85%, 95% đến 100% etanol, mỗi dung dịch trong thời gian 2 phút, tiếp theo làm sạch từng bản kính trong dung dịch 50% xylen và 100% xylen (do Sigma cung cấp, 534056) mỗi bản kính trong thời gian 2 phút. Tiếp đó, các miếng che được gắn bằng Eukitt® môi trường gắn cứng nhanh (do Fluka cung cấp, 03989) và các lát này được quan sát dưới kính hiển vi ánh sáng.

Chiết ADN và các điều kiện PCR

Hai phương pháp được áp dụng để chiết ADN từ các mẫu lá cây – phương pháp chiết nhanh ADN tạo ra các mẫu ADN kém tinh khiết hơn và phương pháp chiết ADN rộng hơn cho ADN tinh khiết hơn, được cải biến từ tài liệu của Huang (2009). Theo phương pháp thứ nhất, bốn hạt thủy tinh có đường kính 2mm (do Sigma cung cấp, 273627), 1mg đến 2mg mô lá lúa và 150µl dung dịch đệm chiết (10mM Tris, độ pH=9,5, 0,5mM EDTA, 100mM KCl) được bổ sung vào từng lỗ của đĩa PCR loại 96 lỗ. Đĩa này được bịt kín và hỗn hợp được đồng nhất hóa bằng cách sử dụng máy trộn Mini-Beadbeater-96 (do GlenMills cung cấp, 1001) trong thời gian 1 phút. Sau khi ly tâm với tốc độ 3000 vòng/phút trong khoảng thời gian 5 phút, dịch nổi chiết được chứa ADN được dùng trong các phản ứng PCR.

Theo phương pháp thứ hai, hai hạt thủy tinh có đường kính 2mm và 0,2g lá ở trong các ống nghiệm Eppendorf loại dung tích 1,5ml được làm nguội trong nitơ lỏng trong thời gian 10 phút. Tiếp đó, các mẫu được đồng nhất hóa trong Mini-Beadbeater-96 trong thời gian 1 phút, sau đó 600µl dung dịch đệm chiết ADN (2% SDS, 0,4M NaCl, 2mM EDTA, 10mM Tris-HCl, độ pH=8,0) được bổ sung vào từng ống nghiệm và các hỗn hợp này được ủ ở nhiệt độ 65°C trong thời gian một giờ. Sau khi làm nguội các hỗn hợp này, 450µl dung dịch NaCl 6M được bổ sung vào, được trộn và được ly

tâm với tốc độ 12000 vòng/phút trong thời gian 20 phút. Từng dịch nổi được chuyển sang ống nghiệm mới và ADN kết tủa bằng cách sử dụng thể tích ngang bằng 2-propanol ở nhiệt độ -20°C trong thời gian một giờ. ADN được thu hồi bằng cách ly tâm với tốc độ 2400vòng/phút ở nhiệt độ 4°C trong thời gian 20 phút và các viên được rửa hai lần bằng 75% etanol. Các viên này được làm khô trong không khí ở nhiệt độ trong phòng và từng viên được tạo huyền phù lại trong 600 μl nước cất chứa 10ng/ μl ARNza (do ThermoScientific cung cấp, EN0201)) và sử dụng trong các phản ứng PCR.

Các phản ứng PCR sử dụng 5 μl dung dịch đệm 2xPCR chứa Taq Polymeraza (do ThermoScientific cung cấp, K0171), các đoạn mồi oligonucleotit 5' và 3' và 1 μl mẫu ADN trong tổng thể tích 10 μl . Việc khuếch đại được thực hiện bằng cách sử dụng 35 chu kỳ 94°C trong thời gian 30 giây, 55°C trong thời gian 30 giây và 72°C trong thời gian 30 giây. Các sản phẩm khuếch đại được phân tích nhờ điện di gel bằng cách sử dụng gel agarosa 3%. Các phản ứng PCR đối chứng sử dụng các chế phẩm ADN từ Zhonghua11 đồng hợp tử (ZH11) (gạo Nhật loại thường), NJ6 đồng hợp tử (gạo Ấn độ loại thường), và hỗn hợp gồm ZH11 và NJ6.

Để lập bản đồ di truyền alen *ta2*, các bước khuếch đại PCR đối với các gen đánh dấu di truyền sử dụng các cặp đoạn mồi dưới đây (các trình tự 5' đến 3'): INDEL 127 (vị trí 6.343.260 trên nhiễm sắc thể 1), đoạn mồi xuôi TGAGTAGTTGCGTTGTTCT (SEQ ID NO: 15), đoạn mồi ngược TCTTAGTGAGCCGTTTCT (SEQ ID NO: 16); INDEL 129 (vị trí 6.560.681 trên nhiễm sắc thể 1), đoạn mồi xuôi CCTTCTGTGCTATGGGTT (SEQ ID NO: 17), đoạn mồi ngược CATGCCAAGACACCACTT (SEQ ID NO: 18); INDEL 128 (vị trí 6.470.027 trên nhiễm sắc thể 1), đoạn mồi xuôi TGGCTTTGGAAACGGTAG (SEQ ID NO: 19), đoạn mồi ngược TTAGAGGGATGTGCGTCA (SEQ ID NO: 20); INDEL 149 (vị trí 6.427.144 trên nhiễm sắc thể 1), đoạn mồi xuôi AAACAACGATCCAGCAAA (SEQ ID NO: 21), đoạn mồi ngược TTGGCACCGTATTACTTTC (SEQ ID NO: 22).

Thử nghiệm TILLING

Các đoạn mồi mà được dùng trong các thử nghiệm TILLING có trình tự nucleotit:

TA2-1F: ACGCATTCTTCATTGACTGTATGT (SEQ ID NO: 23)

TA2-1R: GCCCTTTCAATACAATGACTAGGT (SEQ ID NO: 24)

TA2-2F: GAACATTTGAATCATGTTCCCTCAC (SEQ ID NO: 25)

TA2-2R: ACTATCCTTTGATGCAAGTTCTCC (SEQ ID NO: 26)

TA2-3F: GTTGGAAGAGCAGTTAAAGCAAAT (SEQ ID NO: 27)

TA2-3R: CTTGCGCAGTGAAATTTAGTAACA (SEQ ID NO: 28)

TA2-4F: TACAGAACTTCTACGAATGCAGGA (SEQ ID NO: 29)

TA2-4R: GCAACATGAATTGCTAAAGATGAG (SEQ ID NO: 30).

Các bước khuếch đại PCR với ExTaq được thực hiện với các điều kiện phản ứng dưới đây: 95°C trong thời gian 2 phút; 8 chu kỳ 94°C trong thời gian 20 giây, 68°C trong thời gian 30 giây (làm giảm 1°C mỗi chu kỳ), và 72°C trong thời gian 60 giây cho mỗi đoạn dài 1kb của đơn vị siêu sao chép, tiếp theo 35 chu kỳ 94°C trong thời gian 20 giây, 60°C trong thời gian 30 giây, và 72°C trong thời gian 60 giây đối với mỗi đoạn dài 1kb của đơn vị siêu sao chép, và bước mở rộng cuối cùng ở nhiệt độ 72°C trong thời gian 5 phút. Các sản phẩm PCR từ mẫu loại thường và mẫu thử nghiệm được trộn và được đưa đến chương trình ghép đôi biến tính chậm hoàn toàn để tạo ra các chuỗi kép dị hợp trong các điều kiện sau: 99°C trong thời gian 10 phút để làm biến tính, tiếp theo 70 chu kỳ giảm, bắt đầu ở nhiệt độ 70°C, mỗi chu kỳ 20 giây, với mức làm giảm 0,3°C mỗi chu kỳ, và sau đó giữ ở nhiệt độ 15°C để ghép đôi lại các sản phẩm PCR đã bị biến tính để tạo ra các chuỗi kép dị hợp. Các bước tiêu hóa bởi Cell của các sản phẩm PCR đã được ghép đôi được thực hiện trong 15µl hỗn hợp phản ứng bao gồm dung dịch đệm Cell (10mM HEPES, độ pH=7,5, 10mM KCl, 10mM MgSO₄, 0,002% Triton X-100, và 0,2µg/ml albumin huyết thanh bò (BSA), 4µl sản phẩm PCR, và 1 đơn vị Cell (10 đơn vị/µl) nếu các sản phẩm PCR được polyme hóa bởi Ex Taq, hoặc 20 đơn vị Cell nếu các sản phẩm PCR được polyme hóa bởi KOD), ở nhiệt độ 45°C trong thời gian 15 phút, tiếp theo bổ sung 3µl 0,5M EDTA (độ pH =8,0) vào để dừng phản ứng. Theo cách khác, các bước tiêu hóa được thực hiện trong 15µl hỗn hợp phản ứng chứa 4µl các sản phẩm PCR và 2 đơn vị nucleaza giá đỡ (MBN, 10 đơn vị/µl, sản phẩm theo danh mục số M0250S; do New England Biolabs, Mỹ cung cấp) trong dung dịch đệm MBN (20mM Bis-Tris, độ pH=6,5, 10mM MgSO₄, 0,2mM ZnSO₄, 0,002% Triton X-100, và 0,2µg/ml BSA) ở nhiệt độ 60°C trong thời gian 30 phút, tiếp theo bổ sung 2µl 0,2 % SDS vào để dừng phản ứng.

Các sản phẩm PCR mà được tiêu hóa bởi Cell trong các đĩa PCR loại 96 lỗ được pha loãng đến 100µl bằng nước đã được loại ion, và việc điện di mao quản được thực hiện ở hiệu điện thế 9kV, trong thời gian 30 giây đối với bước sơ bộ, 15 giây để nạp 1ng/µl phân tử lượng gen đánh dấu 75 và 15kb hoặc 50 và 3kb ADN sợi kép (do Fermentas, Canada cung cấp), 45 giây để nạp mẫu, và 40 phút để tách mẫu trong thiết bị AdvanCE™ FS96 (do Advanced Analytical Technologies, Mỹ cung cấp). Ảnh gel được chụp và được phân tích bằng cách sử dụng phần mềm PROSize (do Advanced Analytical Technologies, Mỹ cung cấp) để điện di mao quản.

Thử nghiệm với enzym ADN glycosylaza (DME)

Demeter (DME) là ADN glycosylaza/lyaza lưỡng chức có hoạt tính đối với các cơ chất 5-metylxytosin. Các cây có 5-metylxytosin trong ba tình huống trình tự: CpG, CpNpG, và CpNpN và DME có hoạt tính đối với 5-metylxytosin trong mỗi tình huống trong số các tình huống trình tự này. Theo thử nghiệm enzym mà được thực hiện *in vitro*, mức độ phân cắt liên kết phosphodiester ở phía 5' của xytosin đã được methyl hóa được phát hiện, tạo ra các sản phẩm loại bỏ δ. Việc xử lý các sản phẩm của phản ứng ADN với bazơ mạnh (NaOH) trước khi điện di gel xác nhận quy trình loại bỏ δ tại vị trí đã dự báo trước.

Các oligonucleotit tổng hợp mà sẽ được dùng làm các cơ chất trong các thử nghiệm enzym được tổng hợp như sau với các cải biến nucleotit được biểu thị trong ngoặc đơn như được thể hiện dưới đây:

MEA-1.6F, 5'-CTATACCTCCTCAACTCCGGTCACCGTCTCCGGCG (SEQ ID NO: 31)

MEA-1.6F18meC, 5'-CTATACCTCCTCAACTC(5-meC)GGTCACCGTCTCCGGCG (SEQ ID NO: 32)

MEA-1.6F17meC, 5'-CTATACCTCCTCAACT(5-meC)CGGTCACCGTCTCCGGCG (SEQ ID NO: 33)

MEA-1.6F22meC, 5'-CTATACCTCCTCAACTCCGGT(5-meC)ACCGTCTCCGGCG (SEQ ID NO: 34)

MEA-1.6F18AP, 5'-CTATACCTCCTCAACTC(abasic)GGTCACCGTCTCCGGCG (SEQ ID NO: 35)

MEA-1.6F17AP, 5'-CTATACCTCCTCAACT(abasic)CGGTCACCGTCTCCGGCG (SEQ ID NO: 36)

MEA-1.6F15AP, 5'-CTATACCTCCTCAA(abasic)TCCGGTCACCGTCTCCGGCG (SEQ ID NO: 37)

MEA-1.6F12AP, 5'-CTATACCTCCT(abasic)AACTCCGGTCACCGTCTCCGGCG (SEQ ID NO: 38)

MEA-1.6F18T, 5'-CTATACCTCCTCAACTCTGGTCACCGTCTCCGGCG (SEQ ID NO: 39)

MEA-1.6R, 5'-CGCCGGAGACGGTGACCGGAGTTGAGGAGGTATAG (SEQ ID NO: 40)

MEA-1.6R17meC, 5'-CGCCGGAGACGGTGAC(5-meC)GGAGTTGAGGAGGTATAG (SEQ ID NO: 41).

Hai mươi pmol của từng oligonucleotit được đánh dấu ở đầu tận cùng trong 50μl phản ứng bằng cách sử dụng 20 đơn vị T4 polynucleotit kinaza với sự có mặt của

30 μ Ci (γ -32P)-ATP (6000 Ci/mmol, do Perkin Elmer Life Sciences cung cấp) ở nhiệt độ 37°C trong khoảng thời gian 1 giờ. Mỗi oligonucleotit đã đánh dấu được tinh chế bằng cách sử dụng kit loại bỏ nucleotit Qiaquick (do Qiagen cung cấp) như được hướng dẫn bởi nhà sản xuất. Các oligonucleotit đã đánh dấu được ghép đôi với các oligonucleotit bổ trợ thích hợp trong 10mM Tris-HCl (độ pH =8,0), 1mM EDTA và 0,1M NaCl. Mỗi hỗn hợp được nâng nhiệt độ lên đến 100°C trong thời gian 10 phút và sau đó được làm nguội từ từ đến nhiệt độ trong phòng qua đêm. Bước tiêu hóa bằng endonucleaza cắt giới hạn *MspI* hoặc *HpaII*, tiếp theo là điện di gel, được áp dụng để xác định hiệu quả ghép đôi. Chỉ các cơ chất mà hơn 90% là sợi đôi được dùng trong thử nghiệm về hoạt tính glycosylaza.

Các cơ chất oligonucleotit đã được đánh dấu ở đầu tận cùng 5' (13,3nM) được ủ với protein DME (250nM) trong 15ml phản ứng với 40mM HEPES-KOH (độ pH =8,0), 0,1M KCl, 0,1mM EDTA, 0,5mM dithiothreitol, và 200mg/ml BSA ở nhiệt độ 37° trong thời gian 1 giờ. Phản ứng này được kết thúc bằng 15ml formamit 95%, 20mM EDTA, 0,05% xanh bromophenol, 0,05% xylene cyanol FF và được đun sôi trong thời gian 5 phút. Để cảm ứng quá trình loại bỏ, NaOH được bổ sung vào ở nồng độ cuối cùng 0.1M và hỗn hợp phản ứng được đun sôi trong thời gian 7 phút. Các sản phẩm được phân đoạn trên gel polyacrylamit 15% chứa 7,5M ure và 1xTBE. Bước điện di được thực hiện ở hiệu điện thế 1000V trong thời gian 4 giờ bằng thiết bị gel Hoefer SQ3. Gel được phơi sáng với phim Kodak BioMax MR ở nhiệt độ -80°C.

Các phương pháp phân tích

Các trị số gần đúng và các thành phần cấu thành chính khác ở hạt, các thành phần thực phẩm và các mẫu thực phẩm được xác định bằng cách áp dụng các phương pháp chuẩn, ví dụ, nêu dưới đây.

Hàm lượng ẩm của hạt được đo theo phương pháp AOAC 925.10 (Hiệp hội các Nhà hóa học phân tích chính thức - Association of Official Analytical Chemists). Một cách vắn tắt, các mẫu hạt (~2g) được sấy khô đến trọng lượng không đổi trong lò ở nhiệt độ 130°C trong thời gian khoảng 1 giờ.

Hàm lượng tro được đo theo phương pháp AOAC 923.03. Các mẫu được sử dụng để xác định hàm lượng ẩm được nung thành tro trong lò buồng kín ở nhiệt độ 520°C trong thời gian 15 giờ.

Hàm lượng protein của hạt, các thành phần thực phẩm và mẫu thực phẩm

Hàm lượng protein được đo theo phương pháp AOAC 992.23. Một cách vắn tắt, tổng nitơ được phân tích theo phương pháp đốt cháy Dumas bằng cách sử dụng máy

phân tích nitơ tự động (Elementar Rapid N cube, ElementarAnalysensysteme GmbH, Hanau, Germany). Hàm lượng protein của hạt hoặc các mẫu thực phẩm (g/100g) được ước tính bằng cách nhân hàm lượng nitơ với 6,25.

Đường, tinh bột và các polysacarit khác

Tổng hàm lượng tinh bột được đo theo phương pháp AOAC 996.11 mà áp dụng phương pháp enzym của McCleary và các đồng tác giả (1997).

Lượng đường được đo theo phương pháp AOAC 982.14. Một cách vắn tắt, các đường đơn giản được chiết bằng dung dịch nước etanol (80% etanol) và sau đó được định lượng theo phương pháp sắc ký lỏng cao áp (HPLC) bằng cách sử dụng cột gel polyme liên kết với polyamin, bằng cách sử dụng axetonitril:nước (theo tỷ lệ thể tích 75:25) làm pha động và thiết bị dò rải rác ánh sáng làm bay hơi.

Tổng các polysacarit phi tinh bột trung tính (NNSP) được đo theo quy trình sắc ký khí của Theander và các đồng tác giả (1995) với chút cải biến bao gồm 2 giờ thủy phân bằng axit sulfuric 1M tiếp theo là ly tâm.

Fructan (fructo-oligosacarit) được phân tích theo phương pháp chi tiết ở Phương pháp AOAC 999.03. Một cách vắn tắt, các fructo-oligosacarit được chiết vào nước tiếp theo là tiêu hóa bằng hỗn hợp sucraza/maltaza/invertaza. Tiếp đó, các đường tự do thu được được khử bằng natri bohyđrua và tiêu hóa thành fructoza/glucosa với fructanoza. Fructoza/glucosa được đo bằng cách sử dụng hydrazin axit p-hydroxybenzioc (PAHBAH).

Hàm lượng chất xơ

Tổng chất xơ từ chế độ ăn (total dietary fiber - TDF) được đo theo phương pháp AOAC 985.29 và chất xơ hòa tan và không hòa tan (soluble insoluble fiber - SIF) theo phương pháp AOAC 991.43. Một cách vắn tắt, TDF được xác định theo kỹ thuật phân tích trọng lượng của Prosky và các đồng tác giả (1985), như được nêu chi tiết trong Phương pháp AOAC 985.29, và SIF được xác định theo kỹ thuật phân tích trọng lượng như được bộc lộ trong AOAC 991.43.

Tổng lipid

Mẫu 5g bột được ủ với 1% Clarase 40000 (do Southern Biological cung cấp, MC23.31) ở nhiệt độ 45°C trong thời gian một giờ. Lipit được chiết từ các mẫu vào clorofom/metanol bằng cách chiết nhiều lần. Sau khi ly tâm để tách pha, phân đoạn clorofom/metanol được loại bỏ và làm khô ở nhiệt độ 101°C trong thời gian 30 phút để

thu hồi lipit. Khối lượng của phần còn lại là tổng lipit trong mẫu này (Phương pháp AOAC 983.23).

Biên dạng axit béo của lipit

Lipit được chiết ra từ bột đã nghiền vào clorofom theo phương pháp AOAC 983.23. Một phần của phân đoạn clorofom chứa lipit được làm bay hơi trong môi trường nitơ sau khi bổ sung phần phân ước axit hepta-đecanoic vào làm chuẩn bên trong. Cặn được tạo huyền phù trong axit sulfuric 1% trong metanol khan và hỗn hợp này được đun nóng ở 50°C trong thời gian 16 giờ. Hỗn hợp này được pha loãng bằng nước và chiết hai lần bằng hexan. Dung dịch hexan kết hợp được nạp vào cột Florisil nhỏ và cột được rửa bằng hexan và tiếp đó metyl este của axit béo được rửa giải bằng 10% ete trong hexan. Dung môi rửa giải được làm bay hơi đến khô và cặn được hòa tan trong iso-octan để nạp lên GC. Các metyl este của axit béo được định lượng theo hỗn hợp gồm các axit béo chuẩn. Các điều kiện GC: cột SGE BPX70 30m x 0,32mm x 0,25µm; Nạp 0,5µl; Thiết bị nạp 250°C; tỷ lệ tách 15:1; Dòng 1,723ml/phút dòng đều; Lò 150°C trong thời gian 0,5 phút, 10°C/phút đến 180°C, 1,5°C/phút đến 220°C, 30°C/phút đến 260°C (tổng thời gian thực-hiện 33 phút); Bộ dò FID ở nhiệt độ 280°C.

Hoạt tính của chất chống oxy hóa (ORAC-H)

Hoạt tính của chất chống oxy hóa ưa nước (ORAC-H) được xác định theo phương pháp của Huang (2002a và 2002b) với các cải biến như được mô tả bởi Wolbang và các đồng tác giả (2010). Các mẫu được chiết lấy các chất chống oxy hóa ưa chất béo, tiếp theo là các chất chống oxy hóa ưa nước như sau: 100mg mẫu được cân lặp lại ba lần vào các ống nghiệm nhỏ loại dung tích 2ml. Sau đó, 1ml hexan:diclometan (theo tỷ lệ 50:50) được bổ sung vào và trộn kỹ trong thời gian 2 phút và được ly tâm với tốc độ 13.000 vòng/phút trong thời gian 2 phút ở nhiệt độ 10°C. Dịch nổi được chuyển sang bình thủy tinh và viên được chiết lại bằng 2ml hỗn hợp hexan:diclometan nữa. Bước trộn và bước ly tâm tiếp đó được lặp lại, và dịch nổi được chuyển sang cùng một bình thủy tinh. Dung môi còn lại từ viên được làm bay hơi dưới dòng nitơ nhẹ. Sau đó, 1ml hỗn hợp axeton: nước: axit axetic (theo tỷ lệ 70:29,5:0,5) được bổ sung vào và trộn kỹ trong thời gian 2 phút. Sau đó, hỗn hợp này được ly tâm như trước và dịch nổi được dùng trong thử nghiệm đĩa ORAC-H. Các mẫu được pha loãng nếu cần bằng dung dịch đệm phosphat. Diện tích dưới đường cong (AUC) được tính và được so sánh với các trị số AUC đối với các chuẩn Trolox. Trị số ORAC được thông báo theo đương lượng µMTrolox/g mẫu.

Các chất phenol

Tổng hàm lượng các chất phenol cũng như các chất phenol ở trạng thái tự do, trạng thái tiếp hợp và trạng thái liên kết được xác định sau khi chiết theo phương pháp được mô tả bởi Li và các đồng tác giả (2008) có sửa đổi không đáng kể. Một cách vắn tắt, các chất phenol tự do được xác định trong các mẫu 100mg sau khi chiết vào 2ml metanol 80% bằng cách xử lý bằng năng lượng âm thanh trong thời gian 10 phút trong bình thủy tinh (dung tích 8ml). Dịch nổi được chuyển sang bình thủy tinh thứ hai và bước chiết cạn được lặp lại. Dịch nổi kết hợp được làm bay hơi đến khô trong khí quyển nitơ. 2ml axit axetic (2%) được bổ sung để điều chỉnh độ pH đến 2 và sau đó 3ml etyl axetat được bổ sung vào để chiết các chất phenol và lắc trong thời gian 2 phút. Các bình được ly tâm với tốc độ 2000 x g trong thời gian 5 phút ở nhiệt độ 10°C. Dịch nổi được chuyển sang bình thủy tinh sạch và bước chiết được lặp lại thêm hai lần nữa. Dịch nổi kết hợp được làm bay hơi trong khí quyển nitơ ở nhiệt độ 37°C. Cặn được hòa tan trong 2ml metanol 80% và được để tủ lạnh.

Các mẫu về các chất phenol đã tiếp hợp được xử lý như đối với thử nghiệm phenolic tự do đối với bước chiết ban đầu bằng metanol 80%. Tại thời điểm này 2,5ml natri hydroxit (2M) và thanh từ tính được bổ sung vào dịch nổi đã được làm bay hơi trong bình thủy tinh mà sau đó được nạp nitơ và được bịt nắp chặt. Các bình được trộn và đun nóng ở nhiệt độ 110°C trong khoảng thời gian 1 giờ và khuấy. Các mẫu được làm nguội trên nước đá trước khi chiết bằng 3ml etyl axetat bằng cách lắc lư trong thời gian 2 phút. Các bình được ly tâm với tốc độ 2000 x g trong thời gian 5 phút ở nhiệt độ 10°C. Dịch nổi được gạn và độ pH được điều chỉnh đến 2 bằng HCl 12M. Các chất phenol được chiết bằng cách sử dụng 3 x 3ml phần phân ước của etyl axetat như được bộc lộ cho các chất phenol tự do. Dịch nổi được kết hợp và làm bay hơi đến khô trong khí quyển nitơ ở nhiệt độ 37°C và cặn được đưa vào 2ml metanol 80% và được để tủ lạnh.

Các chất phenol liên kết được đo từ cặn sau khi chiết các chất phenol tự do bằng metanol. 2,5ml (2M) natri hydroxit và thanh từ tính được bổ sung vào cặn trước khi đưa nitơ vào bình này và đậy nắp chặt cho nó. Các bình được trộn và đun nóng ở nhiệt độ 110°C trong khoảng thời gian 1 giờ và khuấy. Các mẫu được làm nguội trên nước đá trước khi chiết bằng 3ml etyl axetat bằng cách lắc lư trong thời gian 2 phút. Các bình được ly tâm với tốc độ 2000 x g trong thời gian 5 phút ở nhiệt độ 10°C. Dịch nổi được gạn và độ pH được điều chỉnh đến 2 bằng HCl 12M. Các chất phenol được chiết bằng 3 x 3ml phần phân ước của etyl axetat như được bộc lộ cho các chất phenol tự do. Dịch

nồi được kết hợp và làm bay hơi đến khô trong khí quyển nitơ ở 37°C và cặn được đưa vào 2ml metanol 80% và được để tủ lạnh.

Tổng các chất phenol được xác định bằng cách sử dụng các mẫu 100mg bằng cách bổ sung 200ul metanol 80% vào các mẫu ướt trước khi thủy phân. 2,5ml (2M) natri hydroxit và thanh từ tính được bổ sung trước khi đưa nitơ vào bình này và bịt nắp chặt. Các bình được trộn và đun nóng ở nhiệt độ 110°C trong thời gian 1 giờ và khuấy. Các mẫu được làm nguội trên nước đá trước khi chiết bằng 3ml etyl axetat bằng cách lắc lư trong thời gian 2 phút. Các bình được ly tâm với tốc độ 2000 x g trong thời gian 5 phút ở nhiệt độ 10°C. Dịch nổi được gạn và độ pH được điều chỉnh đến 2 bằng HCl 12M. Các chất phenol được chiết bằng 3 x 3ml phần phân ước của etyl axetat như được bộc lộ cho các chất phenol tự do. Dịch nổi được kết hợp và làm bay hơi đến khô trong khí quyển nitơ ở nhiệt độ 37°C và cặn được đưa vào 4ml metanol 80% và được để tủ lạnh.

Lượng chất phenol trong các mẫu đã được xử lý/đã được chiết được đo bằng cách áp dụng thử nghiệm FolinCiocalteu's để xác định các chất phenol. Các chuẩn axit galic ở nồng độ 0µg/ml, 1,56µg/ml, 3,13µg/ml, 6,25µg/ml, 12,5µg/ml, và 25µg/ml được dùng để tạo ra đường cong chuẩn. 1ml chuẩn được bổ sung vào ống nghiệm thủy tinh loại dung tích 4ml. Đối với các mẫu thử nghiệm, 100µl phần phân ước của các mẫu đã được trộn kỹ được bổ sung vào 900µl nước trong các ống nghiệm thủy tinh loại dung tích 4ml, sau đó 100µl chất phản ứng FolinCiocalteu được bổ sung vào từng ống nghiệm mà được xoáy ngay lập tức. 700µl dung dịch natri bicacbonat (1M) được bổ sung vào sau thời gian 2 phút và sau đó được trộn bằng cách tạo xoáy. Từng dung dịch được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong bóng tối trong khoảng thời gian 1 giờ và sau đó mức độ hấp thụ được đọc ở bước sóng 765nm. Kết quả được biểu hiện theo µg đương lượng axit galic/g mẫu.

Phytat

Việc xác định hàm lượng phytat của các mẫu bột là dựa trên phương pháp của Harland và Oberleas, như được bộc lộ trong tài liệu *AOAC Official Methods of Analysis* (1990). Một cách vắn tắt, mẫu bột 0,5g được cân và chiết bằng HCl 2,4% bằng cách sử dụng bánh quay (30 vòng/phút) trong thời gian 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Tiếp đó, hỗn hợp này được ly tâm với tốc độ 2000 x g trong thời gian 10 phút và dịch nổi được chiết và được pha loãng 20 lần bằng nước milli-Q. Cột trao đổi anion (500mg do Agilent Technologies cung cấp) được đặt trên đường ống phân phối chân không và được tạo điều kiện để sử dụng theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Tiếp đó, dịch nổi đã được pha loãng được nạp lên cột và các loại không là phytat được loại ra bằng cách rửa

bằng HCl 0,05M. Sau đó, phytat được rửa giải bằng HCl 2M. Dịch giải hấp gom được được tiêu hóa bằng cách sử dụng khối làm nóng. Mẫu được làm nguội và thể tích được điều chỉnh đến 10ml bằng nước milli-Q. Mức phospho được xác định bằng quang phổ kế bằng cách áp dụng phương pháp tạo màu molybđat, axit sulphonic với mức độ hấp thu đọc ở bước sóng 640nm. Phytat được tính bằng cách áp dụng công thức sau:

$$\text{Phytat (mg/g)} = \text{nồng độ P} * V1 * V2 / (1000 * \text{trọng lượng của mẫu} * 0,282)$$

trong đó nồng độ P là nồng độ của phospho ($\mu\text{g/ml}$), như được xác định theo đo quang phổ, V1 là thể tích của dung dịch cuối cùng, V2 là thể tích của dung dịch phytat chiết được, và 0,282 là hệ số chuyển đổi phospho thành phytat.

Ước tính tổng hàm lượng chất khoáng

Tổng hàm lượng chất khoáng của các mẫu được đo theo thử nghiệm tro bằng cách áp dụng các phương pháp AOAC 923.03 và 930.22. Khoảng 2g bột được đun nóng ở nhiệt độ 540°C trong thời gian 15 giờ và tiếp đó khối lượng của cặn tro được cân. Các mẫu bột thô 0,5g được tiêu hóa bằng cách áp dụng cách tiêu hóa khối ống nghiệm bằng axit nitric 8M ở nhiệt độ 140°C trong thời gian tám giờ. Tiếp đó, hàm lượng kẽm, sắt, kali, magie, phospho và lưu huỳnh được phân tích bằng cách sử dụng phép đo quang phổ phát xạ nguyên tử plasma liên hợp theo cách cảm ứng (ICP-AES) theo Zarcinas (1983a và 1983b).

Các chất khoáng được phân tích tại CSIRO, Urrbrae, Adelaide South Australia, ở Waite Analytical Service (University of Adelaide, Waite, South Australia) và ở Dairy Technical Services (DTS, North Melbourne, Victoria.). Các nguyên tử được xác định bằng phổ phát xạ quang học - plasma liên hợp theo cách cảm ứng (ICP-OES) sau khi tiêu hóa bằng dung dịch axit nitric (CSIRO) hoặc axit nitric loãng và hydro peroxit (DTS) hoặc bằng phổ phát xạ nguyên tử plasma liên hợp theo cách cảm ứng (ICP-AES) sau khi tiêu hóa bằng dung dịch axit nitric/percloric.

Vitamin

Các phân tích vitamin B1 (niacin), B3 (pyridoxin) và tổng folat được thực hiện bằng DTS cũng như National Measurement Institute (NMI). Niacin được đo theo tài liệu: AOAC Methods 13th Ed (1980) 43.045, theo Lahey và các đồng tác giả (1999). Pyridoxin được đo theo Mann và các đồng tác giả (2001). Phương pháp này kết hợp biến nạp trước cột đối với dạng đã vitamin B6 đã được phosphoryl hóa và dạng vitamin B6 tự do thành pyridoxin (pyridoxol). Cách thủy phân axit phosphatase được áp dụng để loại phosphoryl, tiếp theo là khử amin bằng axit glyoxylic khi có Fe^{2+} chuyển hóa

pyridoxamin thành pyridoxal. Tiếp đó, pyridoxal được khử bằng natri bohydrua thành pyridoxin.

Axit folic được đo theo kit axit folic VitaFast bằng cách áp dụng hướng dẫn của nhà sản xuất, hoặc theo phương pháp AOAC 2004.05.

Ví dụ 2. Phân lập và xác định tính chất của đột biến aloron dày (ta)

Thiết lập và nuôi trồng quần thể lúa đã được gây đột biến

Khoảng 8000 hạt (được gọi là hạt M₀) từ giống lúa loại thường Zhonghua11 (ZH11) được gây đột biến theo cách xử lý bằng 60mM etyl metan sulfonat (EMS) bằng cách áp dụng các điều kiện chuẩn. Hạt đã được gây đột biến được gieo trên cánh đồng và các cây thu được được nuôi trồng để tạo ra hạt M₁. Hạt M₁ được gom và tiếp đó được gieo trên cánh đồng để tạo ra cây M₁. 8925 chùy được thu gom từ 1327 cá thể cây M₁. Từ các cây này 36.420 hạt M₂ được sàng lọc, bao gồm ít nhất là 4 hạt từ mỗi chùy.

Sàng lọc đột biến bằng cách nhuộm hạt nửa

Vỏ quả (trấu trên và trấu dưới) của hạt gạo M₂ được loại bỏ. 36.420 hạt được chia thành hai phần theo chiều ngang. Các nửa chứa phôi được giữ vào trong đĩa loại 96 lỗ để nảy mầm sau đó, trong khi từng hạt nửa không có phôi được nhuộm bằng xanh Evans và được quan sát trên kính hiển vi phân tích để phát hiện hạt đột biến có aloron dày so với loại thường. Việc nhuộm màu là dựa trên nguyên lý rằng xanh Evans chỉ có thể thâm nhập và nhuộm màu các tế bào không thể phát triển được như các tế bào của nội nhũ tinh bột trong khi không thay đổi về màu sắc được quan sát thấy ở lớp aloron có thể phát triển được. Từ phân tích nhuộm xanh Evans và phân tích mô học ban đầu, cá thể hạt thể hiện mức tăng đáng kể về độ dày của aloron cũng như hạt thể hiện mức dày lên đáng kể ở aloron mặt bụng của hạt giống được quan sát. Các hạt khác thể hiện hiện tượng tăng độ dày của aloron nhưng ở mức độ thấp hơn. Vùng không nhuộm của mặt bụng của từng hạt được đặc biệt kiểm tra về độ dày của lớp aloron. Các thể biến dị có tăng độ dày của lớp aloron trên mặt lưng của hạt cũng được quan sát. Chỉ các thể biến dị với mức tăng đáng kể về độ dày của lớp aloron trên toàn bộ mặt cắt ngang được chọn để phân tích tiếp.

Được so sánh với các hạt nửa loại thường, các hạt nửa có vùng không nhuộm màu dày hơn với xanh Evans được chọn. Trong số 36.420 hạt đã kiểm tra, 219 hạt (0,60%) có khác biệt về độ dày của aloron được xác định và được chọn. Chúng được thu nhận từ 162 chùy từ 140 cá thể cây M₁, và do đó hầu hết là đột biến độc lập. Một hạt đột biến cụ thể được nhận dạng và xác định tính chất tiếp như được bộc lộ dưới đây,

có đột biến được gọi là aloron dày 2 (*ta2*). Do đó, gen loại thường tương ứng được gọi là *Ta2*; tên gọi đó được sử dụng trong bản mô tả này.

Để duy trì dòng được cho là đột biến, mọi hạt nửa đã được tạo phôi tương ứng được gieo mầm trên môi trường chứa các môi trường muối MS bán nồng độ (Murashige và Skoog, 1962) đã được hóa rắn bằng 1% Bacto aga (Bacto, 214030) và được nuôi cấy ở nhiệt độ 25°C dưới ánh sáng với cường độ 1500 đến 2000 Lux theo chu kỳ 16 giờ chiếu sáng/8 giờ bóng tối. Các cây non được chuyển sang đất ở giai đoạn có hai đến ba lá non và các cây thu được được cho sinh trưởng đến thành thực. Sau khi nảy mầm và nuôi trồng hạt nửa đã được tạo phôi tương ứng, 115 hạt (52,5% sống sót) được cho sinh trưởng để tạo ra các cây thành thực và tốt giống.

Các cây đột biến ứng viên mà thể hiện ít hoặc không thể hiện lỗi ở ở tính trạng nông học chung như các cây có chiều cao cây, khả năng sinh sản (khả năng sinh sản đực và cái), cỡ hạt và trọng lượng của 1000 hạt bình thường so với giống bố mẹ loại thường cũng như thể hiện khả năng di truyền ổn định tính trạng aloron dày được xác định, được chọn và được phân tích tiếp. Trong số chúng, thể đột biến được gọi là *ta2* mà thể hiện kiểu hình đa aloron cực độ hơn gồm sáu đến bảy lớp tế bào được chọn và được phân tích chi tiết. Hạt loại thường thể hiện aloron gồm một lớp tế bào, như mong đợi.

Các phân tích mô học đối với hạt đột biến ta2

Hạt đang phát triển từ các cây ZH11 loại thường và các cây đột biến *ta2* được nghiên cứu và được so sánh theo các thay đổi về mặt hình thái từ 1 đến 30 ngày sau khi thụ phấn (DAP). Pha chín của hạt lúa có thể được coi là gồm ba giai đoạn: giai đoạn hạt sữa, giai đoạn chín sấp và giai đoạn hạt thành thực. Ở giai đoạn chín sấp, hạt ở chùy loại thường bắt đầu thay đổi về màu từ xanh sang vàng, tiếp theo là hiện tượng tàn phá dần dần của mô túi nối thân cây và quả thóc. Hạt ở chùy *ta2* bị trì hoãn thay đổi về màu. Xét nghiệm trên kính hiển vi các mặt cắt ngang của hạt gạo cũng cho thấy hiện tượng tăng mức trắng như phấn (độ mờ đục) ở hạt đột biến *ta2*. Sau đó, việc soi quét trên kính hiển vi điện tử (SEM) được thực hiện để nghiên cứu cấu trúc của cấu tạo hạt nhỏ tinh bột ở phần giữa của nội nhũ tinh bột. Ở hạt loại thường, các hạt nhỏ tinh bột được xếp chặt và thể hiện bề mặt nhẵn và hình dáng đều đặn, trong khi ở hạt *ta2* quan sát thấy các hạt nhỏ tinh bột có hình dáng không đều xếp lỏng. Tóm lại, quan sát được ít nhất là ba thay đổi ở các cây và hạt có đột biến *ta2*: trì hoãn trong quá trình thành thực của hạt, hiện tượng tăng mức trắng như phấn của hạt và ở cấu trúc hạt nhỏ tinh bột.

Hạt đang phát triển loại thường và đột biến tại thời điểm 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 18, 21, 24, 27 và 30 ngày sau thụ phấn (DAP) được nhuộm bằng xanh Evans và lớp aloron được kiểm tra bằng kính hiển vi quang học. Không quan sát thấy được khác biệt đáng kể về độ dày của lớp aloron đang phát triển giữa hạt loại thường và hạt đột biến *ta2* cho đến 10 ngày sau thụ phấn (DAP). Sau khi thụ phấn 10 ngày (DAP), lớp aloron của đột biến *ta2* là dày hơn ở hạt loại thường, và khác biệt này đạt đến mức tối đa tại thời điểm khoảng 20 ngày sau thụ phấn (DAP). Các kết quả này là phù hợp với các kết quả từ thử nghiệm nhuộm đỏ Sudan.

Hạt loại thường và hạt đột biến *ta2* (30DAP) được kiểm tra tiếp về các khác biệt về mặt mô học bằng cách cắt (1µm), nhuộm màu và soi kính hiển vi quang học. Sau khi nhuộm xanh toluidin 0,1% mà nó nhuộm xanh axit nucleic và hồng polysacarit, một lớp các tế bào hình chữ nhật to định hướng cân đối được quan sát thấy ở aloron loại thường. Trái lại, các lát của hạt đột biến *ta2* có lớp aloron gồm sáu đến tám lớp tế bào, các tế bào còn có kích thước thay đổi và định hướng bất quy tắc. Các quan sát này cho thấy rằng aloron dày ở hạt *ta2* chủ yếu là do hiện tượng tăng số lượng của lớp tế bào hơn là sự to ra của từng tế bào aloron.

Nhuộm tiếp 0,01% trắng Calcoflour, nhuộm thành tế bào huỳnh quang, không thể hiện khác biệt gì về độ dày thành tế bào giữa loại thường và hạt đột biến *ta2*. Thành tế bào của các tế bào aloron là dày hơn thành tế bào ở nội nhũ tinh bột đối với cả hạt loại thường và hạt *ta2*.

Phân tích các tính chất nông học của các cây và hạt đột biến ta2

Sau khi được lai chéo với cây loại thường (ZH11) đối với ba thể hệ trên cánh đồng để tạo ra thể hệ BC3F3, nhờ đó loại bỏ các đột biến bổ sung không liên quan mà mà có thể xuất hiện từ xử lý gây đột biến, các cây đột biến *ta2* được phân tích về một số tính trạng nông học. Các cây và hạt đột biến *ta2* khác không đáng kể so với cây và hạt loại thường, về chiều cao của cây, trọng lượng của 1000 hạt, cỡ hạt (chiều dài, chiều rộng và độ dày) và hình thái học của quả thóc (Bảng 2). Trái lại, cây loại thường thể hiện tỷ lệ ra quả của hạt là 98,9% trong khi các cây đột biến *ta2* thể hiện hiện tượng giảm về tỷ lệ ra quả của hạt ở mức 73,4%. Tỷ lệ ra quả ở hạt giống được tính theo tỷ lệ phần trăm của hoa con ở thực vật mà có hạt giống cho đến giai đoạn hạt thành thực. Hơn thế nữa, hạt đột biến *ta2* thể hiện hiện tượng giảm về khả năng nảy mầm 75,1% so với hạt loại thường là 97,3% khi được nuôi cấy ở nhiệt độ 28°C trong các chu kỳ 12 giờ chiếu sáng/12 giờ bóng tối không kiểm soát độ ẩm trong buồng sinh trưởng. Nảy mầm được xác định là khi rễ con nảy một cách nhìn thấy được qua vỏ hạt giống.

Ví dụ 3. Phân tích di truyền đột biến *ta2*

Trên cơ sở nguồn gốc mẹ của mô aloron và mô nội nhũ ở cây đang sinh trưởng, hai thử nghiệm di truyền được thực hiện để xác định kiểu hình aloron dày có được xác định theo mẹ. Trước hết, lai chéo thử nghiệm được thực hiện giữa cây *ta2* (đột biến) mẹ và cây bố loại thường, và thu được hạt thế hệ con F2. Trong số các hạt F2, 49,4% (n=634) thể hiện kiểu hình aloron dày, mà trệch đi ở mức độ đáng kể so với tỷ lệ 3:1 (loại thường:đột biến) đã được dự đoán cho mức độ di truyền theo thuyết Mendel của gen trội ở quần thể F2. Thứ hai, bước lai chéo thuận nghịch được thực hiện giữa cây *ta2* và cây loại thường. Tất cả các hạt F1 (100%; n=589) thể hiện kiểu hình aloron dày, trong khi ở phép lai chéo thuận nghịch bằng cách sử dụng loại thường làm cây mẹ, tất cả các hạt F1 (n=197) tạo ra kiểu hình loại thường. Các phép lai chéo này cho thấy rằng kiểu hình aloron được xác định theo kiểu di truyền của cây mẹ.

Bảng 2. So sánh cây loại thường (ZH11) và cây đột biến *ta2* về các tính trạng nông học.

	ZH11	<i>ta2</i>
Chiều cao của cây (cm)	103,7 ($\pm 3,24$)	112,2 ($\pm 6,05$)
Tỷ lệ ra quả của hạt giống (%)	98,9 ($\pm 3,41$)	73,41 ($\pm 3,41$)
trọng lượng 1000 hạt (g)	22,73 ($\pm 0,17$)	22,07 ($\pm 0,33$)
Chiều dài của hạt giống (mm)	7,46 ($\pm 0,26$)	7,55 ($\pm 0,27$)
Chiều rộng của hạt giống (mm)	3,27 ($\pm 0,12$)	3,15 ($\pm 0,10$)
Độ dày của hạt giống (mm)	2,35 ($\pm 0,10$)	2,27 ($\pm 0,11$)

Nhằm để xác minh liệu tác dụng theo mẹ được xác định theo kiểu di truyền thể giao tử hay thể bào tử, cây F1 mà là dị hợp tử *Ta2/ta2*, thu được từ bước lai chéo giữa cây đồng hợp tử *Ta2/Ta2* và cây đồng hợp tử *ta2/ta2*, sử dụng trong bước lai thuận nghịch với cây đồng hợp tử *ta2* (*ta2/ta2*) hoặc cây loại thường. Ở bước lai thuận nghịch giữa dị hợp tử mẹ và loại thường bố, 47,3% (n=188) hạt F1 thể hiện kiểu hình đột biến *ta2*, trong khi ở bước lai chéo thuận nghịch giữa cây *ta2* mẹ và dị hợp tử bố, 99,3% (n=425) cá thể F1 thể hiện kiểu hình đột biến *ta2*. Từ các kết quả này, kết luận rằng gen *TA2* truyền kiểu hình theo kiểu di truyền thể giao tử theo mẹ.

Theo các phân tích di truyền nêu trên, mẫu hình di truyền *ta2* có thể được đề xuất, theo kiểu di truyền thể giao tử theo mẹ. Khi kiểu di truyền của thể giao tử mẹ là *ta2*, thì kiểu hình của nội nhũ là đột biến *ta2* (aloron dày) và là độc lập với kiểu di

truyền của bố. Do đó, kiểu hình aloron dày chỉ được xác định bởi kiểu di truyền của thể giao tử mẹ trong quá trình phát triển của nội nhũ tinh bột và aloron tam bội, sao cho di hợp tử mẹ tạo nên 50% thể hệ con có kiểu hình aloron dày, độc lập với kiểu di truyền của bố, và đồng hợp tử *ta2/ta2* theo mẹ khiến 100% thể hệ con có kiểu hình aloron dày. Các thử nghiệm tiếp theo là cần thiết để thử nghiệm liệu tác động của thể giao tử mẹ của *TA2* được gây ra bởi sự có mặt của bản sao bổ sung gen của mẹ ở nội nhũ tam bội hoặc nhờ tác động của sự hòa đồng gen nhờ thể giao tử mẹ kìm hãm sự biểu hiện của gen *TA2* của bố.

Ví dụ 4. Xác định gen Ta2 nhờ lập bản đồ gen và phân tích trình tự

Xác định và sử dụng các gen đánh dấu SSR và INDEL để lập bản đồ gen

Để lập bản đồ gen, quần thể F2 của các cây được tạo ra từ bước lai chéo về mặt di truyền giữa cây chứa đột biến *ta2* trong nền tảng di truyền của ZH11 (giống Nhật) và cây thuộc giống ấn độ NJ6. Để xác định các gen đánh dấu di truyền mà là đa hình giữa ZH11 và NJ6 và sau đó có thể được dùng trong việc lập bản đồ gen, một bộ thử nghiệm PCR được thực hiện trên các mẫu ADN của lá từ các cây đồng hợp tử ZH11, các cây đồng hợp tử NJ6 và hỗn hợp ADN theo tỷ lệ 1:1. Phân tích các sản phẩm PCR theo phương pháp điện di gel cho phép so sánh các sản phẩm từ ZH11, NJ6 và hỗn hợp để xác định các gen đánh dấu đa hình. Các cặp đoạn mồi được chọn lọc để lập bản đồ gen chỉ khi các bước khuếch đại với các ADN riêng biệt của ZH11 và NJ6 thể hiện các sản phẩm khuếch đại riêng biệt và khác nhau và ADN lẫn này thể hiện sự kết hợp của cả hai sản phẩm. Theo cách đó, tổng cộng 124 cặp đoạn mồi được chọn lọc kể cả 54 dạng đa hình cài xen-xóa bỏ (INDEL) và 70 dạng đa hình lặp lại trình tự ngắn (SSR). Các gen đánh dấu di truyền được phân bố ở khoảng cách 3Mbp đến 4Mbp dọc theo hệ gen của lúa và là mức độ bao phủ tốt để lập bản đồ gen.

Để lập bản đồ di truyền của alen *ta2*, 143 cây từ quần thể F2 được ghi điểm với 124 gen đánh dấu đa hình. Tính đồng hợp tử của các cây F2 trong quần thể lập bản đồ đối với kiểu hình aloron được đánh giá một cách cẩn thận bằng cách xác định kiểu hình của hạt thể hệ F3 thu được từ mỗi cây F2. ADN của lá được chiết như được mô tả trong Ví dụ 1. Các bước khuếch đại PCR được thực hiện như được mô tả trong Ví dụ 1 và các sản phẩm được tách theo phương pháp điện di gel qua 3% agarosa. Từ các kết quả này kết luận rằng locus *ta2* nằm giữa các gen đánh dấu INDEL 127 và INDEL 129 trên nhiễm sắc thể 1 (hình 1, dòng cao nhất), mà từ trình tự hệ gen của lúa tương ứng với khoảng cách vật lý khoảng 217kb.

5000 cây F2 khác được sàng lọc bằng cặp gen đánh dấu này. 362 cá thể được xác định và được chọn mà thể hiện sự tái tổ hợp giữa INDEL 127 và INDEL 129. Khi

các cây tái tổ hợp này được xác định kiểu hình, thì locus *ta2* được lập bản đồ theo cách đó đến vùng 42,8kb mà nằm giữa các gen đánh dấu INDEL 149 và INDEL 128 (hình 1, dòng thứ hai).

Để thu được trình tự nucleotit của vùng này ở các cây đột biến *ta2* và so sánh nó với trình tự loại thường và bằng cách đó xác định đột biến tương ứng với *ta2*, các đoạn mỗi nằm bên sườn vùng hệ gen được thiết kế và xác định trình tự ADN được thực hiện. Việc so sánh các trình tự ADN của hệ gen xác định được hai chất đa hình nucleotit đơn (SNP) trong vùng đã xác định được trình tự, cả hai đều ở gen được chú thích là LOC_01g11900. Đầu tiên là hiện tượng đa hình một nucleotit G (loại thường) thành A (*ta2*) tại vị trí nucleotit Chr1: 6451738, tham chiếu đến trình tự hệ gen của lúa của giống Nhật, nằm ở intron 14 giữa exon 14 và exon 15 của gen LOC_01g11900 ở nhiễm sắc thể 1 (dấu hoa thị trên Hình 1). Hiện tượng đa hình thứ hai là thay thế G (loại thường) cho A (*ta2*) ở vị trí Chr1: 6452308, mà nằm ở vùng intron (intron15) giữa các exon 15 và 16 của gen LOC_01g11900 ở nhiễm sắc thể 1.

Sau khi chiết ARN, phiên mã ngược và xác định trình tự ADN bổ trợ tương ứng với alen *ta2*, quan sát thấy rằng hiện tượng đa hình thứ nhất G thành A ở Chr1: 6451738 liên quan đến việc cài xen 21bp (hình 2) giữa exon 14 và exon 15, tương ứng với việc cài xen trong khung bảy axit amin trình tự axit amin đã dự đoán trước (hình 3). Trái lại, không có thay đổi nào ở trình tự ADN bổ trợ cho đột biến giữa các exon 15 và 16, tương ứng với hiện tượng đa hình thứ hai ở vị trí locus Chr1: 6452308. Từ các dữ liệu này, kết luận rằng hiện tượng đa hình thứ nhất ở intron 14 là thay đổi có tính nguyên nhân, tức là đột biến *ta2* ở hạt đó. Kết luận này được xác nhận trong các ví dụ dưới đây. Còn kết luận được rằng đột biến này dẫn đến thay đổi về mẫu hình ghép nối của bản sao ARN của gen *ta2* so với gene *Ta2* loại thường, nhờ đó gây ra kiểu hình *ta2*. Từ tỷ lệ giữa số lượng của ADN bổ trợ có cài xen 21 nucleotit so với số lượng của ADN bổ trợ không có cài xen, ước tính rằng khoảng 80% bản sao ARN từ gen *ta2* (đột biến) được phân cắt tại vị trí phân cắt mới được tạo ra. Giả sử rằng polypeptit đột biến có cài xen 7 axit amin không có hoạt tính, kết luận rằng gen đột biến *ta2* duy trì khoảng 20% hoạt tính so với loại thường.

Gen ở vị trí LOC_01g11900 ở nhiễm sắc thể 1 của hệ gen của lúa đã được chú thích là gen *ROS1a* của lúa (*OsROS1a*), thể tương đồng của gen *Demeter* của *Arabidopsis thaliana* (*AtDME*) mà ghi mã ADN hai chức năng glycosylaza/lyaza. Enzym DME của *Arabidopsis* hoạt động như ADN demetylaza, làm giảm mức độ metyl hóa ở các gốc C ở ADN. Do đó gen *Ta2* đồng nghĩa với gen *OsROS1a* và thể tương đồng gen *DME* của *Arabidopsis*.

Trình tự nucleotit của gen *ROS1a* của lúa được thể hiện trong trình tự SEQ ID NO:9, bao gồm gen khởi đầu và 5-UTR (vùng không dịch mã) gồm 4726 nucleotit, vùng mã hóa protein từ các nucleotit 4727 đến 15869 bao gồm 16 intron, và 3'UTR gồm 615 nucleotit. Các vị trí nucleotit của 16 intron được nêu trong phần chú thích cho SEQ ID NO:9. SEQ ID NO:9 còn bao gồm ở đầu tận cùng 3' của nó vùng xuôi gồm 401 nucleotit mà không được xem là một phần của gen *OsROS1*. Trình tự nucleotit của ADN bổ trợ tương ứng với gen *OsROS1* loại thường được thể hiện ở trình tự SEQ ID NO:8, và polypeptit được mã hóa gồm 1952 axit amin được thể hiện ở SEQ ID NO:2.

Lúa có bốn gen *ROS1* mà ghi mã các polypeptit được gọi là *OsROS1a*, *OsROS1b* (LOC_Os02g29230), *OsROS1c* (LOC_Os05g3735) và *OsROS1d* (LOC_Os05g37410). Lúa còn có hai thể tương đồng *Demeter* khác mà được xem là ghi mã ADN glycosylaza, là kiểu *Demeter-2* (DML2) và kiểu *Demeter-3* (DML3).

Mô tả dấu hiệu cấu trúc ở polypeptit TA2 của lúa loại thường

Sau khi phát hiện ra rằng gen *TA2* của lúa giống *OsROS1a*, trình tự axit amin polypeptit *OsTA2* (*OsROS1*) được thử nghiệm. Vài dấu hiệu cấu trúc điển hình của ADN glycosylaza được xác định. Miền glycosylaza của các protein *ROS1* có ít nhất ba motif đã được xác định mà được bảo toàn đủ để dễ nhận biết: motif vòng xoắn-kép tóc-vòng xoắn (HhH) (được thể hiện, ví dụ, bằng các axit amin 1491 đến 1515 ở *OsTA2*), motif giàu glyxin/prolin tiếp theo là axit aspartic bảo toàn (GPD), và bốn gốc xystein bảo toàn (ví dụ trong vùng gồm các axit amin 1582 đến 1598) để giữ cụm [4Fe-4S] tại vị trí. Còn có vùng giàu lysin (được thể hiện, ví dụ, bằng các axit amin 87 đến 139 ở *OsTA2*). Không giống như các thành viên khác của siêu họ ADN glycosylaza HhH, các thành viên của họ *ROS1* chứa hai miền bảo toàn bổ sung (miền A và miền B) nằm bên sườn của miền glycosylaza trung tâm (xem tài liệu: Mok *et al.*, 2010). Ở polypeptit *TA2* của lúa (SEQ ID NO:2), miền A xuất hiện ở các axit amin 859 đến 965, miền glycosylaza xuất hiện ở các axit amin 1403 đến 1616, và miền B xuất hiện ở các axit amin 1659 đến 1933. Miền A chứa cụm sặc hỗn hợp lặp lại ở các axit amin 882 đến 892. Đã có thông báo rằng miền ADN glycosylaza bảo toàn của *AtDME* và các miền A và B nằm bên sườn là cần và đủ cho hoạt tính enzym của ADN glycosylaza/lyaza, như được thể hiện bởi phân tích gây đột biến (xem tài liệu: Mok *et al.*, 2010).

Ví dụ 5. Phân tích các thành phần dinh dưỡng ở hạt đột biến ta2

Để đo thành phần của hạt đột biến, đặc biệt là về các thành phần quan trọng về mặt dinh dưỡng, các cây ZH11 và *ta2* được cho sinh trưởng tại cùng một thời điểm và trong cùng các điều kiện trên cánh đồng. Các mẫu bột nguyên hạt được chế biến từ hạt

được thu gom từ các cây và sử dụng cho phân tích thành phần này. Các kết quả (trung bình của các phép đo lặp lại hai lần) của các phân tích gần đúng đối với các loại bột được thể hiện trong Bảng 2.

Bảng 2. Phân tích thành phần của hạt lúa (tính theo g/100g hạt)

	Hàm lượng ẩm	Tro	Protein	Tổng chất béo	Tổng tinh bột	Tổng đường	Tổng chất xơ	Chất xơ hòa tan	Chất xơ không hòa tan
ZH 11	9,54	1,79	15,3	3,30	66,0	1,02	1,6	0,7	2,9
ta2	8,99	2,27	15,6	4,96	60,3	2,58	4,9	0,4	3,9

Các phân tích gần đúng biểu thị mức tăng khoảng 50% về tổng hàm lượng chất béo ở bột đột biến *ta2*. Các phân tích tổng nitơ không thể hiện thay đổi đáng kể về lượng protein giữa hạt đột biến *ta2* và hạt loại thường. Các thử nghiệm về tro, mà đo lượng nguyên liệu còn lại sau khi đốt cháy các mẫu bột mất ẩm, thể hiện mức tăng 26% ở hạt *ta2* so với loại thường. Tổng lượng chất xơ tăng khoảng 200% ở hạt *ta2*. Hàm lượng tinh bột giảm 8,6% ở hạt *ta2* so với loại thường. Các dữ liệu này thể hiện rằng mức tăng độ dày của lớp aloron ở đột biến *ta2* gây ra hiện tượng tăng nồng độ của các chất dinh dưỡng giàu aloron như lipid, các chất khoáng và các chất xơ không làm thay đổi kích thước của hạt giống. Để hiểu chi tiết hơn về các thay đổi này và các thay đổi khác, các phân tích kỹ hơn được thực hiện như dưới đây.

Các chất khoáng

Để đo hàm lượng các chất khoáng, ICP-AES được áp dụng mà tổ hợp kỹ thuật plasma liên hợp theo cách cảm ứng (ICP) với kỹ thuật đo phổ phát xạ nguyên tử (AES). Đây là phương pháp chuẩn đo hàm lượng chất khoáng, là cách định lượng nhạy và hiệu suất cao đối với nhiều nguyên tố trong một phân tích. Dữ liệu thu được từ phân tích này cho thấy rằng hạt đột biến có lượng kẽm và sắt mà được gia tăng khoảng 15% trên cơ sở trọng lượng so với hạt loại thường. Lượng kẽm tăng từ 13,9mg/kg đến 16,0mg/kg, trong khi sắt tăng từ 12,4mg/kg đến 14,2mg/kg.

Mức tăng về kali, magie, phospho và lưu huỳnh cũng được quan sát thấy, tăng lần lượt khoảng 28%, 23%, 22% và 9%. Các kết quả này là phù hợp với mức tăng hàm lượng tro ở hạt *ta2*, mà đo hầu hết các chất khoáng.

Các chất chống oxy hóa

Các chất chống oxy hóa là các phân tử sinh học có khả năng hoạt động đối nghịch với các tác dụng tiêu cực của quá trình oxy hóa ở mô động vật, do đó bảo vệ chống lại các bệnh liên quan đến sự căng thẳng mag tính oxy hóa như viêm, bệnh tim mạch, ung thư và các rối loạn liên quan đến quá trình lão hóa (xem tài liệu của Huang, 2005).

Khả năng của chất chống oxy hóa ở bột thu được từ hạt lúa đột biến *ta* và hạt lúa loại thường được đo theo thử nghiệm về khả năng hấp thu gốc oxy (ORAC) như được mô tả trong Ví dụ 1. Theo thử nghiệm ORAC, khả năng của chất chống oxy hóa được thể hiện bởi động lực học cạnh tranh giữa các phân tử dọn dẹp gốc nội sinh và florescein ở mẫu huỳnh quang phân tử dễ bị oxy hóa, đối nghịch với các gốc tổng hợp tự do được tạo ra bởi AAPH (2,2'-azobis(2-amidino-propan)dihydroclorua). Khả năng này được tính bằng cách so sánh diện tích dưới đường cong động học (AUC), thể hiện động học của quá trình thoái biến huỳnh quang của florescein mẫu phân tử đối với hạt với AUC được tạo ra theo chuẩn Trolox (Prior, 2005). Phương thức khác để định lượng khả năng của chất chống oxy hóa là thông qua việc sử dụng chất phản ứng Folin-Ciocalteu (FCR); nó thể hiện khả năng của chất chống oxy hóa bằng cách đo khả năng khử của tổng các hợp chất phenol trong mẫu thực phẩm. Thử nghiệm FCR là tương đối đơn giản, thuận tiện và dễ làm lại. Tuy nhiên, thời gian mà thử nghiệm ORAC cần để đo càng dài thì hoạt tính càng liên quan về mặt sinh học. Vì các chất chống oxy hóa bao gồm nhiều loại polyphenol, tác nhân khử và ái nhân, nên số đo theo cả FCR và ORAC có thể mang lại mức độ bao phủ tốt hơn và thể hiện toàn diện hơn tổng khả năng của chất chống oxy hóa. Như đã được thông báo bởi Prior (2005), kết quả của thử nghiệm FCR và số đo ORAC thường là phù hợp.

Cả hai thử nghiệm FCR và ORAC đều thể hiện khả năng chống oxy hóa tốt hơn của bột từ bột nguyên hạt đột biến *ta2* so với bột nguyên hạt ZH11 loại thường. FCR thể hiện mức tăng khoảng 35% ở tổng các hợp chất phenol ở đột biến *ta2*. Còn có mức tăng 83% ở hàm lượng chất chống oxy hóa ưa nước ở bột từ đột biến *ta2*.

Phytat

Khi sinh trưởng trong các điều kiện với phospho thích hợp, khoảng 70% tổng hàm lượng phospho ở hạt lúa là ở dạng phytat hoặc axit phytic (myo-inositol-1,2,3,4,5-,6-hexakisphosphat). Phytat trong chế độ dinh dưỡng còn có thể có vai trò có lợi đối với sức khỏe như một chất chống oxy hóa mạnh (xem tài liệu của Schlemmer, 2009). Các phân tích về tổng phytat thể hiện mức tăng hàm lượng phytat khoảng 19% ở *ta2* so với loại thường, tăng từ 10,8mg/g đến 12,7mg/g.

Các vitamin B

Lượng các vitamin B3, B6 và B9 trong bột *ta2* là cao hơn lượng ở bột loại thường lần lượt khoảng 19%, 63% và 58%. Khi thử nghiệm này được lặp lại với bốn mẫu lặp lại, mức tăng trung bình lần lượt là khoảng 20%, 33% và 38%. Aloron được biết là giàu các vitamin B3, B6 và B9 hơn nội nhũ (Calhoun, 1960), nên mức tăng độ dày của aloron ở hạt đột biến *ta* được kết luận là chịu trách nhiệm về mức tăng hàm lượng vitamin B3, B6 và B9.

Chất xơ trong chế độ dinh dưỡng

Quan sát thấy rằng tổng chất xơ từ trong chế độ dinh dưỡng đo được như được mô tả trong Ví dụ 1 tăng khoảng 70%. Chất xơ không hòa tan tăng khoảng 55%.

Hyđrat cacbon

Mức giảm hàm lượng tinh bột của hạt *ta2* là 9% tính trên cơ sở trọng lượng. Trái lại, lượng sucroza tăng 2,5 lần ở hạt đột biến, và monosacarit (arabinoza, xyloza, galactoza, glucoza) tăng từ 31% đến 118% so với loại thường.

Kết luận

Các phân tích dinh dưỡng cho thấy rằng bột nguyên hạt tạo ra được từ hạt *ta2* trồng trên cánh đồng tăng ở mức độ đáng kể so với loại thường về hầu hết các chất dinh dưỡng giàu aloron, kể cả các chất dinh dưỡng đại phân tử như lipid và chất xơ, các chất vi dinh dưỡng như các chất khoáng (sắt, kẽm, kali, magie, phospho, lưu huỳnh), các vitamin B như B3, B6 và B9, các chất chống oxy hóa, và các phân tử sinh học liên quan đến aloron như các hợp chất phenol và phytat. Còn có mức tăng đáng kể về sucroza tự do và các monosacarit. Đồng thời với mức tăng ở các chất dinh dưỡng này và các chất vi dinh dưỡng có mức giảm nhẹ về hàm lượng tinh bột ở đột biến *ta2*, theo tỷ lệ phần trăm tương đối.

Ví dụ 6. Sàng lọc các alen đột biến bổ sung ở gen Ta2

Quần thể cây lúa đã được gây đột biến về nền tảng di truyền ZH11 theo sáng chế (Ví dụ 2) được sàng lọc theo các thử nghiệm TILLING như được mô tả trong Ví dụ 1 để xác định dạng đa hình khác nữa ở gen *Ta2*, sao cho chúng có thể được thử nghiệm về kiểu hình aloron dày. Phương pháp này áp dụng việc tạo chuỗi kép dị hợp đối với ARN loại thường đã được đánh dấu và ARN đột biến ứng viên với tiêu hóa bằng endonucleaza *CelI* cơ bản như được mô tả bởi Jiang và các đồng tác giả (2013). Vùng

5' của gen *TA2* được chọn để sàng lọc trước tiên, nhưng vùng bất kỳ của gen có thể được chọn.

Nhiều dạng đa hình một nucleotit được xác định ở vùng 5' của gen *Ta2* theo thử nghiệm TILLING. Hạt từ các cây có dạng đa hình được kiểm tra về aloron dày và kiểu hình khác của hạt như đối với đột biến *ta2* đầu tiên. Một số hạt thể hiện aloron dày. Các hạt mà thể hiện kiểu hình đột biến được chọn lọc và các cây con thu được từ chúng. Trình tự nucleotit của gen *Ta2* ở mỗi cây được xác định, xác nhận sự có mặt của các đột biến. (Các) nucleotit thay đổi ở gen *Ta2* ở mỗi thể đột biến được xác định. Ba đột biến aloron dày khác cũng được xác định trình tự. Hạt khác mà chứa dạng đa hình nhưng không thể hiện aloron dày cũng được xác định và được duy trì để so sánh. Đột biến và các dòng đa hình khác, và kiểu hình aloron của chúng, mà đã được xác định được tóm tắt trong Bảng 3. Đột biến có aloron dày được thể hiện là: ++, aloron rất dày; +, aloron hơi dày; -, kiểu hình aloron không thay đổi. Rõ ràng rằng thu được nhiều loại đột biến và kiểu hình kết quả.

Aloron ở hạt ZH11 loại thường thể hiện độ dày là một lớp tế bào. Trái lại, ở đột biến cụ thể, aloron ở hạt đột biến chứa đột biến V441A dày hơn ở mặt lưng, chứa khoảng 5 đến 6 lớp tế bào. Aloron ở hạt đột biến S1357F có độ dày gồm khoảng 4 đến 5 lớp tế bào và hạt bị teo, trong khi aloron ở hạt đột biến R482K dày 2 đến 3 lớp tế bào và hạt không bị teo. Aloron ở hạt đột biến S214F chứa 2 đến 4 lớp tế bào và hạt bị teo, như hạt từ đột biến S156F và S1413N. Trái lại, aloron của hạt K501S có 2 đến 3 lớp tế bào và hạt của nó không bị teo. Do đó, nhiều loại đột biến và kiểu hình dễ dàng thu được ở gen *Ta2*.

Bảng 3. Các đột biến xác định được ở gen *Ta2* của lúa.

Tên đột biến	Vùng gen	Đột biến	Aloron dày	Kiểu hình hạt giống
A1810	Exon	S156F	++	teo
B19	Exon	S214F	++	teo
A155	Exon	S1413N	++	teo
A1774	Exon	A441V	++	thường
A2918	Exon	S1357F	++	teo
D11253	Exon	K501S	+	thường
A775	Exon	R482K	+	thường
A1711	Exon	Cần được xác định	++	
D11190	Exon	Cần được xác định	++	
B857	Exon	Cần được xác định	+	
D11080	Exon	D3V	-	

A654	Exon	T221I	-	
D113281	Exon	P883S	-	
D10394	Exon	P843C	-	
A3033	Exon	A78V	-	
B1193	Exon	E123K	-	
D11321	Exon	R487K	-	
A790	Exon	R530K	-	
D11029	Exon	D1425N	-	
A2004	Exon	S1272N	-	
A1152	Exon	P1225L	-	
A2435	Exon	R1390N	-	
B696	Exon	đồng nghĩa	-	
D11283	Exon	đồng nghĩa	-	
D11184	Exon	đồng nghĩa	-	
D11253	Exon	đồng nghĩa	-	
A1687	Exon	đồng nghĩa	-	
B1339	Exon	đồng nghĩa	-	
B1979	Exon	đồng nghĩa	-	
B2089	Exon	đồng nghĩa	-	
A3033	Exon	A78V	-	

Trong số 60 dòng mới xác định có dạng đa hình ở gen *TA2*, 19 dòng có thay đổi (thay thế) axit amin ở các sản phẩm polypeptit dự đoán. Trong số này, ít nhất 7 dòng thể hiện kiểu hình aloron dày. Các đột biến S1413N và D1425N nằm trong miền glycosylaza; các đột biến đã xác định khác nằm ngoài miền glycosylaza. Ngoài đột biến biến dị vị trí cắt ban đầu, toàn bộ các đột biến đã xác định được là các thay thế axit amin. Không có loại bỏ hoặc codon dừng, khiến cho các tác giả sáng chế kết luận rằng các đột biến vô hiệu ở *OsROS1* có thể là gây chết. Đã có thông báo rằng ở *Arabidopsis*, các đột biến *dme* theo mẹ tạo ra hạt bị thui (xem tài liệu: Choi *et al.*, 2002 và 2004). Ở lúa, sự có mặt của alen vô hiệu theo mẹ *ROS1a* gây ra hiện tượng không phát triển nội nhũ ở giai đoạn đầu bất kể kiểu di truyền của bố (xem tài liệu: Ono *et al.*, 2012).

Sự thu hồi mười alen đột biến độc lập mới ở gen *TA2* (*OsROS1a*), mỗi alen có lớp aloron dày ở hạt, biểu thị chắc chắn rằng các đột biến ở gen này gây ra kiểu hình aloron dày. Hơn thế nữa tất cả các đột biến mới này đều nằm ở vùng khác của gen so

với đột biến *ta2* ban đầu cho thấy rằng gen này có thể bị thay đổi ở các vị trí khác nhau dọc theo gen dài đầy đủ để đạt được kiểu hình aloron dày.

Một vài gen *ta2* từ các thể đột biến thể hiện aloron dày được tách dòng và polypeptit mã hóa được biểu hiện và thử nghiệm về hoạt tính ADN glycosylaza/lyaza. Điều này xác nhận rằng các polypeptit giảm ADN glycosylaza/hoạt tính lyaza so với polypeptit loại thường.

Ví dụ 7. Phân tích bổ trợ đối với thể đột biến ta2

Nhằm để củng cố kết luận rằng các đột biến ở gen *Ta2* (*OsROS1a*) chịu trách nhiệm về aloron dày và các kiểu hình có liên quan, các thử nghiệm bù được thực hiện bằng cách đưa bản sao loại thường của gen này vào dòng đột biến bằng cách biến nạp. Để dựng bước biến nạp này, plasmid cho thử nghiệm bù, đoạn ADN gồm 16.882 nucleotit (trình tự nucleotit đã được nêu ở SEQ ID NO:9) bao gồm gen *Ta2* được phân lập được từ hệ gen của lúa loại thường. Đoạn này chứa, theo thứ tự, trình tự ngược gồm 4726 cặp bazơ mà được xem là chứa gen khởi đầu của gen này, toàn bộ vùng mã hóa protein *OsTA2* kể cả tất cả các intron, 3'-UTR gồm 615 nucleotit và vùng xuôi gồm 401 cặp bazơ. Nó được khuếch đại từ ADN hệ gen ZH11 bằng cách sử dụng một loạt đoạn mồi oligonucleotit, tập hợp lại, và sau đó đã được tiêu bằng *KpnI* và *SalI* và được nối vào vật truyền lưỡng phân pCAMBIA1300. Vật truyền còn chứa gen kháng hygromycin làm gen đánh dấu chọn lọc được. Plasmid để biến nạp và plasmid đối chứng (vật truyền rỗng) được đưa riêng rẽ vào chủng *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 và được sử dụng để biến nạp các tế bào nhận của lúa bằng cách áp dụng phương pháp đã được mô tả bởi Nishimura và các đồng tác giả (2006). Tổng cộng 32 cây chuyển gen T₀ được tái tạo từ bước biến nạp này với gene *Ta2* loại thường. Các cây này được chuyển sang đất và được cho sinh trưởng đến thành thực trong buồng sinh trưởng. Khi PCR được dùng để thử nghiệm về sự có mặt của gen kháng hygromycin, 20 dòng biến nạp được xác định và được chọn mang gen hygromycin. Chúng được cho sinh trưởng đến thành thực và hạt (hạt giống T₁) được thu gom từ mỗi cây. Mỗi cây trong số này chứa T-ADN từ vật truyền chứa gene *Ta2* loại thường như được thể hiện bởi thử nghiệm PCR.

Hạt thu gom được từ các cây này được xét nghiệm về kiểu hình aloron của chúng bằng cách nhuộm xanh Evans. Ít nhất là ba trong số các cây đã biến nạp tạo ra hạt với aloron bình thường như loại thường, biểu thị sự biểu hiện dương tính của gen được đưa vào và do đó bổ trợ đột biến *ta2*. Điều này chứng minh chắc chắn rằng các đột biến ở gen *Ta2* gây ra kiểu hình đột biến.

Dưới đây, gen *Ta2* được gọi là gen *ROS1a*; các thuật ngữ này được sử dụng thay thế lẫn nhau.

Ví dụ 8. Các thử nghiệm hoạt tính enzym in vitro đối với các protein TA2 và ta2 biểu hiện tái tổ hợp

Như đã được bộc lộ trong Ví dụ 4 trên đây, gen *Ta2* ở lúa là giống như gen *OsROS1a*, mà là tương đồng với ADN demetylaza/glycosylaza của *Arabidopsis thaliana* được gọi là Demeter (DME; xem tài liệu: Gehring *et al.*, 2006). DME phá vỡ liên kết phosphodiester ở phía 3' của gốc 5-methylxytosin ở cơ chất ADN đã bị bán methyl hóa.

Do đó, hoạt tính enzym từ đã được biểu hiện theo cách tái tổ hợp protein Ta2 và ta2 của lúa được thử bằng cách đo hoạt tính của chúng đối với cơ chất ADN đã được bán methyl hóa mà đã được đánh dấu, để tạo ra các ADN đã được đánh dấu ở đầu tận cùng mà di trú trên gel polyacrylamit làm biến tính tại vị trí đã được dự đoán trước đối với các sản phẩm loại β , như được mô tả bởi Gehring và các đồng tác giả (2006).

Nhằm để biểu hiện theo cách tái tổ hợp và tinh chế các polypeptit Ta2 và ta2, ADN bổ trợ dài đầy đủ *ROS1a* từ cây loại thường và cây đột biến *ta2* được dùng làm khuôn trong phản ứng PCR với các oligonucleotit JH021 (5'-TTAATCTAGAATGCA-GAGCATTATGGACTCG-3'; SEQ ID NO:42) và JH017 (5'-CGGTCGACTTAGGT-TTGTTGTTCTTCAATTTGC-3'; SEQ ID NO:43), mà lần lượt bổ sung các vị trí cắt giới hạn *XbaI* và *Sall* vào các đầu của đoạn ADN đã được khuếch đại. Các sản phẩm PCR được tiêu bằng *XbaI* và *Sall* và tách dòng vào vật truyền pMAL-c2x (NEB) để tạo ra các cấu trúc di truyền c2x-*ROS1a*. Các cấu trúc di truyền này được biến nạp vào các tế bào Rosetta của *E. coli* (do Novagen cung cấp). Để tạo ra polypeptit, các tế bào đã được biến nạp được cho sinh trưởng ở nhiệt độ 28°C trong LB có bổ sung 0,2% glucoza, 100µg/ml ampicilin và 50µg/ml cloramphenicol cho đến khi đạt được OD600 bằng 0,4. Sự biểu hiện của protein dung hợp *ROS1a*-Mal được cảm ứng bằng 10µM IPTG ở nhiệt độ 18°C trong khoảng thời gian 1 giờ. Giống cây được ly tâm với tốc độ 6,500 vòng/phút trong thời gian 15 phút ở nhiệt độ 4°C và viên được tạo huyền phù lại trong 30ml dung dịch đệm cột ở nhiệt độ 4°C (20mM Tris-HCl, độ pH=7,4, 200mM NaCl, 1mM EDTA). Các tế bào được xử lý siêu âm trong thời gian 2 phút trên nước đá bằng cách sử dụng Branson Sonifier 250 ở mức năng lượng đầu ra 4. Dịch phân giải được ly tâm với tốc độ 9.000 vòng/phút trong thời gian 25 phút ở nhiệt độ 4°C và dịch nổi được gom và được đưa đến bước tinh chế trên cột theo trọng lực. Các protein dung hợp *ROS1a*-Mal được tinh chế qua nhựa amyloza theo hướng dẫn của nhà sản xuất (New England Biolabs). Các protein đã rửa giải ra được thẩm tách trong catxet thẩm

tách Slide-A-Lyzer (10.000 MWCO; do Pierce cung cấp) đối với 50% glyxerol ở nhiệt độ 4°C qua đêm. Nồng độ protein được xác định theo phương pháp Bradford bằng cách sử dụng kit thử nghiệm protein (do Bio-Rad Laboratories cung cấp) và các protein được bảo quản ở nhiệt độ -20°C cho đến lần sử dụng tiếp theo.

Các protein dung hợp *ROS1a*-Mal được thử nghiệm về hoạt tính ADN glycosylaza đối với các cơ chất ADN sợi đôi đã được bán metyl hóa như được mô tả trong Ví dụ 1 (xem tài liệu: Gehring *et al.*, 2006).

Để làm đối chứng, không hoạt tính lyaza hoặc bất cộng hóa trị được dò khi *ROS1a* được ủ với các oligonucleotit ADN không được metyl hóa hoặc khi cơ chất ADN đã được bán metyl hóa được ủ khi không có enzym.

Ví dụ 9. Các thể tương đồng của gen ROS1a ở lúa

Các gen thực vật mà ghi mã ADN glycosylaza mà gián tiếp quá trình loại metyl ở ADN đã được xác định trình tự chủ yếu ở *Arabidopsis thaliana* (xem tài liệu: Chan *et al.*, 2005; Law and Jacobsen, 2010; Zhu, 2009). Chúng bao gồm *Demeter* (DME, xem các tài liệu: Choi *et al.*, 2002; Gehring *et al.*, 2006), *ROS1* (xem các tài liệu: Gong *et al.*, 2002; Agius *et al.*, 2006), gen kiểu *Demeter 2* (*DML2*) và gen kiểu *Demeter 3* (*DML3*, xem các tài liệu: Choi *et al.*, 2002; Ortega-Galisteo *et al.*, 2008). Gen lớn nhất trong số các gen này (và các polypeptit được mã hóa), *DME*, biểu hiện mạnh nhất ở tế bào trung tâm của nhiễm sắc thể gồm hai sợi giống hệt nhau của thể giao tử cái trước khi thụ tinh khi nó thúc đẩy hypomethyl hóa toàn cầu đặc hiệu alen mẹ và sự biểu hiện của gen in vết kể cả ở nội nhũ. Trái lại, *ROS1*, *DML2* và *DML3* được biểu hiện ở các mô thực vật (xem các tài liệu: Gong *et al.*, 2002; Penterman *et al.*, 2007). So sánh với *ROS1*, mức độ biểu hiện của các gen *DML2* và *DML3* là thấp (xem tài liệu: Mathieu *et al.*, 2007). Hơn thế nữa, các đột biến đồng hợp tử ở *ros1*, *dml2* và *dml3* không tạo ra kiểu hình hình thái hiển nhiên nào trong khi đột biến *dme* mẹ khiến hạt bị thui, tức là chết phôi, và không truyền sang thế hệ con (xem tài liệu: Choi *et al.*, 2002 và 2004). Dù các polypeptit *ROS1*, *DML2* và *DML3* có mức độ biểu hiện thấp, chúng vẫn thực hiện chức năng của ADN glycosylaza/lyaza (xem các tài liệu: Gong *et al.*, 2002; Morales-Ruiz *et al.*, 2006; Penterman *et al.*, 2007). Từ dữ liệu này, không thể mong đợi đột biến *ROS1* tạo ra kiểu hình aloron dày.

Phân tích hệ phát sinh giống loài cho thấy rằng hệ gen của lúa mã hóa 6 ADN glycosylaza giả định cho việc loại metyl ở xytosin, kể cả bốn enzym mà dường như là *ROS1* orthologs (*OsROS1a*, *OsROS1b*, *OsROS1c*, *OsROS1d*) và hai thể tương đồng khác loài biểu kiến *DML3* (xem tài liệu: Zemach *et al.*, 2010). Đột biến vô hiệu ở *OsROS1a* được xác định nhưng không được truyền từ cây đục hay cây cái chứa đột

biến sang thể hệ con, có lẽ vì ADN glycosylaza loại thường của *ROS1a* là không thể thiếu được trong quá trình phát triển của cả thể giao tử đực và cái (xem tài liệu: Ono *et al.*, 2012). Các tác giả sáng chế không tìm thấy nào công bố về các đột biến từng phần ở *OsROS1a*.

Ba motif đã được xác định ở miền ADN glycosylaza, cụ thể là motif vòng xoắn-kẹp tóc-vòng xoắn (HhH), motif giàu glyxin/prolin tiếp theo là axit aspartic bảo toàn (GPD), và bốn gốc xystein bảo toàn (theo Ví dụ 4) có mặt trong mỗi thành phần của họ Demeter. Cấu trúc của miền glycosylaza còn được tìm thấy ở ADN glycosylaza 8-oxoguanin của người (hOGG1), ADN glycosylaza adenin của *E. coli* (MutY), và endonucleaza III (Endo III) (xem các tài liệu: Bruner *et al.* 2000; Guan *et al.* 1998; Mok *et al.*, 2010). Không giống như các thành viên khác của siêu họ ADN glycosylaza HhH, các thành viên của họ DME chứa hai miền bảo toàn bổ sung (miền A và miền B) nằm bên sườn miền glycosylaza trung tâm (xem tài liệu: Mok *et al.*, 2010).

Các trình tự nucleotit của các vùng mã hóa protein đối với gen tương đồng được duỗi thẳng nhờ ClustalW (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/). Mức độ đồng nhất về trình tự của vùng mã hóa protein *ROS1a* lúa với vùng tương ứng của gen tương đồng ở các loài khác được thể hiện trong Bảng 4.

Từ các phân tích này, các tác giả sáng chế kết luận rằng lúa có nhiều thể tương đồng gen *ROS1* nhưng không có gen *DME*. Ở lúa, cũng như đối với *Arabidopsis*, *ROS1* rõ ràng khác biệt so với các thể tương đồng *DML2* và *DML3* của nó ở cùng loài về mức độ đồng nhất về trình tự.

Bảng 4. Mức độ đồng nhất về trình tự nucleotit với vùng mã hóa của *OsROS1a* hoặc *TaROS1a-5B* của lúa.

Gen	Số hiệu gửi lưu	Mức độ đồng nhất với <i>OsROS1a</i>
<i>OsROS1a</i>	LOC_Os01g11900	100%
<i>OsROS1b</i>	LOC_Os02g29230	41,7%
<i>OsROS1c</i>	LOC_Os05g37350	42,0%
<i>OsROS1d</i>	LOC_Os05g37410	41,9%
<i>OsDML3a</i>	LOC_Os02g29380	34,9%
<i>OsDML3b</i>	LOC_Os04g28860	33,2%
<i>AtDME</i>	NM001085058.1	40,6%
<i>AtROS1</i>	NM129207.4	41,5%
<i>AtDML2</i>	NM111836.5	39,2%
<i>AtDML3</i>	NM119567.3	40,4%

Ví dụ 10. Biểu hiện gen ROS1a ở lúa

Các thử nghiệm được thực hiện để phân tích sự biểu hiện của gen *TA2* ở các mô khác nhau của lúa, kể cả ở các phần của hạt đang phát triển. Ở thử nghiệm thứ nhất, ARN thông tin *TA2* được phát hiện ở các lát cắt mô lúa bằng cách lai tại chỗ như được mô tả bởi Brewer và các đồng tác giả (2006). Một cách vắn tắt, các mô lúa khác nhau được cố định trong thuốc hãm FAA trong thời gian 8 giờ ở nhiệt độ 4°C sau khi thâm nhiễm trong chân không, được loại nước bằng cách áp dụng seri etanol theo bậc, tiếp theo là seri xylen, và được gắn vào Paraplast Plus (do Sigma-Aldrich cung cấp). Các lát cắt vi phẫu (8µm) được gắn trên các bản kính hiển vi Probe-On Plus (do Fisher cung cấp).

Từ các tín hiệu lai, kết luận rằng *TA2* được biểu hiện ở các mô vỏ, vỏ ngoài của hạt và aloron và ở nội nhũ tinh bột của lúa, nhưng không biểu hiện ở bó mạch.

Phản ứng chuỗi polymeraza phiên mã ngược thời gian thực (RT-PCR) được áp dụng để đánh giá mức độ biểu hiện tương đối ở các mô thực vật khác nhau. Đáng ngạc nhiên là, các kết quả cho thấy mức độ biểu hiện cao nhất ở phần hoa, tiếp theo là bao phấn, chùy non và mô aloron (hình 6). Cho rằng sự biểu hiện cụ thể của *OsROS1a* ở bao phấn có thể liên quan đến sự kim hãm gen nhảy ở thể giao tử đực. Ở phần hoa ba tế bào của *Arabidopsis*, việc tích cực loại methyl cho ADN là quan trọng trong quá trình duy trì mức biểu hiện cơ bản của gen nhảy ở nhân của tế bào thực vật sao cho tạo ra ARN can thiệp ngăn để củng cố quá trình methyl hóa ADN phụ thuộc vào ARN (RdDM) của các gen nhảy ở các giao tử đực, tức là hai tế bào tinh (xem các tài liệu: Zhu, 2009; Zhu *et al.*, 2007).

Sự biểu hiện *ROS1a* ở hạt giống đang phát triển tăng đến 10 ngày sau khi nở hoa và từ đó về sau giảm. Mức biểu hiện mạnh được quan sát thấy ở cả nội nhũ tinh bột và mô aloron. Mẫu hình biểu hiện ở giai đoạn sớm trong quá trình phát triển của hạt giống là phù hợp với sự hình thành aloron dày, trước khi tách tế bào ở nội nhũ trong quá trình phát triển của hạt giống. Các tác giả sáng chế kết luận rằng mức biểu hiện giảm của *ROS1a* trong khoảng thời gian từ ngày nở hoa đến 7 ngày sau khi nở hoa (thụ phấn) (0 đến 7 DAP) là giai đoạn quan trọng để hình thành aloron dày.

Ví dụ 11. Mẫu hình của quá trình methyl hóa gen ở lúa

Để xác định các mẫu hình methyl hóa chung cho tất cả các gen lúa ở các cây đột biến *ta2* so với cây *TA2* loại thường, ADN được phân lập từ nội nhũ và phôi và được xử lý bằng bisulfit mà phản ứng với xytosin không được methyl hóa, tiếp theo là xác định trình tự theo Illumina. Các nội nhũ được phân lập tại thời điểm 10 ngày sau thụ phấn (DAP) từ hạt gạo đang phát triển của cây *ta2* và cây loại thường (ZH11), và phôi

từ các cây loại thường ở cùng giai đoạn phát triển của hạt. Để xác định trình tự sau khi xử lý bằng bisulfit, các gen thích ứng Illumina tùy biến được tổng hợp, trong đó xytosin được thế bằng 5-methylxytosin, sao cho các gen thích ứng có thể vượt qua quá trình chuyển hóa bisulfit. Các gen thích ứng ghép cặp đầu cuối (paired end - PE) được tổng hợp mà cho phép mỗi phân tử được giải trình tự từ cả hai đầu tận cùng, do đó tạo điều kiện cho việc duỗi thẳng tiếp theo thành trình tự lỗi protein của hệ gen. Khoảng 0,5 đến 1 µg ADN hệ gen được phân lập từ nội nhũ được cắt ra thành từng mảnh từ mỗi cây loại thường và cây *ta2* cũng như từ các phôi loại thường. Các chế phẩm ADN phân lập được cắt bằng cách xử lý bằng năng lượng âm thanh thành các đoạn gồm 100 đến 500 cặp bazơ. Các gen thích ứng được nối vào các đoạn đã được cắt này theo quy trình của Illumina. Tiếp đó, các ADN được xử lý hai lần bằng natri bisulfit, mà chuyển đổi xytosin không được methyl hóa (C) thành uridin (U), bằng cách sử dụng kit Qiagen EpiTect và được khuếch đại theo 18 chu kỳ PCR bằng cách sử dụng ADN polymeraza PfuTurboCx (do Stratagene cung cấp), enzym đọc sửa mà dung nạp uridin ở sợi khuôn. Bước khuếch đại theo PCR này tạo ra thư viện gồm các đoạn ADN với các gen thích ứng khác biệt ở mỗi đầu tận cùng, sao cho đoạn mỗi xác định trình tự Illumina 'về phía trước' tạo ra trình tự nucleotit từ sợi 'nguyên gốc' có nguồn gốc từ ADN hệ gen (trong đó C tương ứng với C đã được methyl hóa, và T tương ứng với C chưa được methyl hóa, trong đó C xuất hiện ở trình tự của hệ gen), và đoạn mỗi 'ngược' xác định trình tự Illumina tạo ra trình tự nucleotit từ sợi bổ trợ (trong đó G tương ứng với C đã được methyl hóa trên sợi đối, và A tương ứng với C chưa được methyl hóa, trong đó C xuất hiện ở trình tự của hệ gen).

Phạm vi của CG và quá trình methyl hóa CHG ở ADN thu được từ nội nhũ *ta2* là mạnh hơn ở ADN thu được từ nội nhũ ZH11 đối chứng, cho thấy rằng đột biến *TA2* (*OsROS1a*) làm giảm quá trình loại methyl ở nội nhũ của lúa, trong khi mức độ của quá trình methyl hóa CHH ở nội nhũ *ta2* khác không đáng kể so với mức độ đó ở nội nhũ ZH11 loại thường.

Ví dụ 12. Phân tích tiếp các thành phần dinh dưỡng ở hạt đột biến ta2

Các phân tích tiếp được thực hiện để đo các thành phần dinh dưỡng của hạt đột biến so với hạt loại thường tương ứng (ZH11), trồng tại cùng một thời điểm và trong cùng các điều kiện trên cánh đồng. Các mẫu bột của hạt nguyên vẹn được chuẩn bị từ hạt thu gom được từ cây và sử dụng cho phân tích thành phần như được mô tả trong Ví dụ 5. Kết quả của các phân tích gần đúng về bột đối với sinh trưởng ở Úc được thể hiện trong Bảng 5. Các kết quả đối với sinh trưởng ở Trung Quốc được thể hiện trong Bảng 6.

Các phân tích gần đúng biểu thị mức tăng khoảng 50% về tổng hàm lượng lipid ở bột đột biến *ta2*. Các phân tích tổng nitơ thể hiện thay đổi đáng kể về lượng protein giữa hạt đột biến *ta2* và hạt loại thường ở Trung Quốc chứ không ở Úc, mà có thể là do chế độ bón nitơ khác nhau. Tổng nồng độ chất xơ tăng khoảng 66% hoặc 91% ở hạt *ta2*. Hàm lượng tinh bột giảm 9% ở hạt *ta2* so với loại thường. Các dữ liệu này xác nhận rằng mức tăng độ dày của lớp aloron ở đột biến *ta2* làm tăng đáng kể lượng các chất dinh dưỡng giàu aloron như lipid, các chất khoáng và các chất xơ mà không làm thay đổi kích thước của hạt giống. Mặc dù con số tuyệt đối khác biệt ở hai môi trường sinh trưởng, các mức tăng tương đối ở hạt *ta2* là tương đối thống nhất.

Bảng 5. Thành phần của hạt lúa *ROS1a* đột biến (Úc) so với loại thường

Thành phần		Đơn vị	ZH11	<i>ta2</i>	% thay đổi
Tổng tinh bột		g/100g	67,9	61,8	-9%
Chất xơ	Tổng chất xơ từ chế độ ăn	g/100g	3,45	5,73	66%
	Chất xơ hòa tan từ chế độ ăn	g/100g	0,54	0,56	4%
	Chất xơ không hòa tan từ chế độ ăn	g/100g	2,74	4,26	55%
Các vitamin B	Niabin (vitamin B3)	mg/100g	6,53	7,90	21%
	Pyridoxin (vitamin B6)	mg/100g	0,10	0,13	33%
	Folat (vitamin B9)	µg/100g	19,4	25,6	32%
Chất khoáng	Tổng tro	g/100g	1,79	2,39	33%
	Sắt	mg/kg	12,4	14,2	14%
	Kẽm	mg/kg	13,7	16,0	17%
	Kali	mg/kg	3,930	4,780	22%
	Magie	mg/kg	1,270	1,560	23%
	Lưu huỳnh	mg/kg	1,240	1,350	9%
Đường đơn giản	Sucroza	g/100g	0,95	2,54	169%
NNSP	Tổng	mg/100mg	1,54	2,48	61%
Các thành phần NNSP	Arabinoza	mg/100mg	0,28	0,62	61%
	Xyloza	mg/100mg	0,26	0,50	89%
	Manoza	mg/100mg	0,11	0,16	59%
	Galactoza	mg/100mg	0,10	0,20	53%
	Glucosa	mg/100mg	0,77	1,01	47%
Protein		g/100g	15,18	15,26	1%
Phytat		mg/g	10,79	12,69	18%
Các chất phenol	Tổng các chất phenol	µg/g	3,180	4,570	43%
	Các chất phenol tự do	µg/g	529	665	26%
	Các chất phenol tiếp hợp	µg/g	348	692	99%
	Các chất phenol liên kết	µg/g	2,250	2,950	31%
Các chất chống oxy hóa	ORAC	µmol/g	12,3	22,6	84%
Độ ẩm			9,5	8,9	-6%

Lipit	Tổng lipit	g/100g	3,29	4,95	50%
Thành phần lipit	Axit béo 18:0		5,1%	4,5%	-13%
	Axit béo 18:1n9t		3,3%	2,6%	-22%
	Axit béo 18:1n9c		32,7%	43,2%	32%
	Axit béo 18:1n7		1,7%	1,4%	-19%
	Axit béo 18:2n6		36,0%	27,9%	-22%

Bảng 6. Thành phần của hạt lúa đột biến *ROS1a* (Trung Quốc) so với loại thường

Thành phần	Thành phần cụ thể	ZH11	ta2	% thay đổi
Protein	tổng protein	12,38	14,12	14,05
Axit amin	Asparagin	1,16	1,53	31,90
	Threonin	0,45	0,54	20,00
	Serin	0,64	0,73	14,06
	Glutamin	2,29	2,40	4,80
	Glyxin	0,59	0,76	28,81
	Alanin	0,71	0,84	18,31
	Xystein	0,26	0,30	15,38
	Valin	0,72	0,79	9,72
	Methionin	0,22	0,22	0,00
	Isoleuxin	0,50	0,53	6,00
	Leuxin	1,02	1,05	2,94
	Tyrosin	0,59	0,58	-1,69
	Phenylalanin	0,66	0,69	4,55
	Histidin	0,43	0,54	25,58
	Lysin	0,43	0,60	39,53
	Arginin	1,14	1,39	21,93
	Prolin	0,52	0,59	13,46
Tinh bột	amyloza	9,80	5,14	-47,55
Chất khoáng	Selen (Se)	0,03	0,03	8,78
	Canxi	167,89	231,39	37,82
	Fe	15,24	17,76	16,54
	Zn	28,68	41,37	44,25
Chất chống oxy hóa	tổng flavonoit	0,06	0,08	33,33
Chất xơ	Tổng chất xơ từ chế độ ăn	3,26	6,23	91,10
Vitamin	Vitamin A	1,53	5,52	260,78
	Vitamin E	0,47	1,00	112,77
	Vitamin B1	0,50	0,57	12,97
	Vitamin B2	0,04	0,08	116,67

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này biết rằng nhiều biến thể và/hoặc cải biến có thể được tạo ra đối với sáng chế như được thể hiện theo các phương án cụ thể mà không vượt quá tinh thần hoặc phạm vi của sáng chế đã được mô

tả theo cách rộng. Do đó, các phương án này cần được xem là chỉ nhằm mục đích minh họa và không giới hạn theo mọi khía cạnh.

Đơn yêu cầu đăng ký sáng chế này yêu cầu hưởng quyền ưu tiên của đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền sáng chế Úc số AU 2015904754 nộp ngày 18/11/2015, toàn bộ nội dung của nó được đưa vào đây hoàn toàn bằng cách viện dẫn.

Mọi công bố đã được bản luận và/hoặc viện dẫn đến trong bản mô tả này được kết hợp hoàn toàn vào đây.

Mọi bản luận về các tài liệu, hoạt động, nguyên liệu, thiết bị, vật phẩm hoặc tương tự mà đã được gộp vào sáng chế chỉ nhằm mục đích làm rõ tình huống của sáng chế. Không nên xem là thừa nhận rằng yếu tố bất kỳ hoặc tất cả các yếu tố này tạo nên một phần của tình trạng kỹ thuật hoặc là kiến thức chung thông thường trong lĩnh vực kỹ thuật liên quan đến sáng chế như đã tồn tại trước ngày ưu tiên của từng yêu cầu bảo hộ của đơn này.

CÁC TÀI LIỆU VIỆN DẪN

- Agius *et al.* (2006) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 103:11796-11801.
- Almeida and Allshire (2005) TRENDS Cell Biol 15: 251-258.
- Barker *et al.* (1983) Plant Mol. Biol. 2: 235-350.
- Baumlein *et al.* (1991) Mol. Gen. Genet. 225:459-467.
- Becraft *et al.* (2001a) In Bhojwani and Soh (eds). Current Trends in Embryology of Angiosperms, Kluwer Academic Publishers, pp353-374.
- Becraft *et al.* (2001b) Plant Physiol. 127:4039-4048.
- Becraft *et al.* (2002) Development 129:5217-5225.
- Becraft and Yi (2011) J. Exp. Botany 62:1669-1675.
- Bevan *et al.* (1983) Nucl. Acid Res. 11: 369-385.
- Bourque (1995) Plant Sci. 105: 125-149.
- Brewer *et al.* (2006) Nature Protocols. 1:1462-1467.
- Broun *et al.* (1998) Plant J. 13:201-210.
- Bruner *et al.* (2000) Nature 403:859-866.
- Buri *et al.* (2004) Cereal Foods World 49:274-282.
- Buttrose *et al.* (1963) Aust. J. Biol. Sci. 16:768-774.
- Calhoun (1960) Cereal Chemistry. 37:755.
- Capecchi (1980) Cell 22:479-488.
- Chan *et al.* (2005) Nature Rev. Genet. 6 :351-360.
- Choi *et al.* (2002) Cell 110:33-42.
- Choi *et al.* (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101:7481-7486.
- Clapp (1993) Clin. Perinatol. 20:155-168.
- Curiel *et al.* (1992) Hum. Gen. Ther. 3:147-154.
- Comai *et al.* (2004) Plant J 37: 778-786.
- Doyon *et al.* (2011) Nat. Methods 8:74-79.
- Eglitis *et al.* (1988) Biotechniques 6:608-614.
- Fahim (2012) Plant Biotechnology Journal. 10:150-163.
- Garfinkel *et al.* (1983) Cell 27: 143-153.
- Gehring (2006) Cell 124:495-506.
- Gong *et al.* (2002) Cell 111:803-814.
- Graham *et al.* (1973) Virology 54:536-539.
- Greve (1983) J. Mol. Appl. Genet. 1: 499-511.
- Guan *et al.* (1998) Nature Structural Biology 5:1058-1064.
- Guddeti (2005) Cell Research. 15:631-638.

- Guo *et al.* (2010) *J. Mol. Biol.* 400:96-107.
- Harland and Oberleadls (1990) Newer methods for the analysis of phytate and its hydrolysis products. In: Spiller GA, ed. *CRC handbook of dietary fiber in human nutrition*. 2nd ed. Boca Raton, Florida: CRC Press; pages 101-104.
- Henikoff *et al.* (2004) *Plant Physiol* 135: 630-636.
- Hinchee *et al.* (1988) *Biotech.* 6:915.
- Hoshikawa (1993) in Matsuo and Hoshikawa (eds), *Science of the Rice Plant: Morphology*. Nobunkyo, Tokyo, pp 339-376.
- Huang (2002a) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50:1815-1821.
- Huang (2002b) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50:4437-4444.
- Huang (2005) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53:1841-1856.
- Jiang *et al.* (2013) *Molecular Cell*. 14:787-799.
- Jones (1969) *Planta* 85:359-375.
- Jones-Rhoades and Bartel (2004) *Mol. Cell* 14:787-799.
- Joshi (1987) *Nucl. Acids Res.* 15:6643-6653.
- Kapazoglou *et al.* (2012) *BMC Plant Biology* 13:172.
- Kawakatsu *et al.* (2009) *The Plant J.* 59:908-920.
- Kawashima (2009) *The Plant Journal*. 57:313-321.
- Kessler *et al.* (2002) *Development* 129:1859-1869.
- Kim *et al.* (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:1156-1160.
- Lahey *et al.* (1999) *Food Chemistry* 65:129-133.
- Langridge *et al.* (2001) *Aust. J. Agric. Res.* 52: 1043-1077.
- Law and Jacobsen (2010) *Nature Rev. Genet.* 11:204-220.
- Lemieux (2000) *Current Genomics* 1: 301-311.
- Lewis *et al.* (2009) *Plant and Cell Physiol.* 50:554-571.
- Li *et al.* (2008) *J. Agric. Food Chem.* 56:9732-9739.
- Lid *et al.* (2004) *Planta* 218:370-378.
- Lu *et al.* (1993) *J. Exp. Med.* 178:2089-2096.
- Mann *et al.* (2001) *J. AOAC Int.* 84:1593.
- Mathieu *et al.* (2007) *Cell* 130:851-862.
- McCleary *et al.* (1997) *J AOAC Int.* 80:571-580.
- Medberry *et al.* (1992) *Plant Cell* 4: 185-192.
- Medberry *et al.* (1993) *Plant J.* 3: 619-626.
- Miller *et al.* (2007) *Nat. Biotechnol.* 25:778-785.
- Millar and Waterhouse (2005) *Funct Integr Genomics* 5:129-135.
- Mok *et al.* (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107:19225-19230.

- Morales-Ruiz *et al.* (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103:6853-6858.
- Murashige and Skoog (1962) *Physiologia Plantarum* 15:473-497.
- Needleman and Wunsch (1970) *J. Mol Biol.* 45:443-453.
- Niedz *et al.* (1995) *Plant Cell Reports* 14: 403-406.
- Nishimura *et al.* (2006) *Nature Protocols.* 1:2796-2802.
- Ono *et al.* (2012) *Plant J.* 71:564-574.
- Ortega-Galisteo *et al.* (2008) *Plant Mol. Biol.* 67 :671-681.
- Ossowski (2008) *The Plant Journal.* 53:674-690.
- Ow *et al.* (1986) *Science* 234:856-859.
- Pasquinelli *et al.* (2005) *Curr Opin Genet Develop* 15: 200-205.
- Penterman *et al.* (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104:6752-6757.
- Potenza *et al.* (2004) *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant* 40:1-22.
- Prasher *et al.* (1985) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 126: 1259-68.
- Prior (2005) *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 53:4290-4302.
- Prosky *et al.* (1985) *AOAC Official method* 991.
- Salomon *et al.* (1984) *EMBO J.* 3: 141-146.
- Schlemmer (2009) *Molecular Nutrition and Food Research.* 55(Supplement 2):S330-S375.
- Senior (1998) *Biotech. Genet. Engin. Revs.* 15: 79-119.
- Shen *et al.* (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:6552-6557.
- Slade and Knauf (2005) *Transgenic Res.* 14: 109-115.
- Smith *et al.* (2000) *Nature* 407: 319-320.
- Sreenivasulu (2010) *The Plant Journal.* 64:589-603.
- Stalker *et al.* (1988) *Science* 242:419-423.
- Szczepek *et al.* (2007) *Nat. Biotechnol.* 25:786-793.
- Taylor (1997) *The Plant Cell* 9:1245-1249.
- Theander *et al.* (1995) *J AOAC Int.* 78:1030-1044.
- Thillet *et al.* (1988) *J. Biol. Chem.* 263:12500.
- Wagner *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:6099-6103.
- Walbot (1994) p78-80 in Freeling and Walbot (eds), *The Maize Handbook*, Springer Verlag, New York.
- Waterhouse *et al.* (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 13959-13964.
- Wolbang (2010) *J. Agric Food Chem.* 58, 1732-1740.
- Zarcinas (1983a) *CSIRO Division of Soils Technical Paper.* 1-36.
- Zarcinas (1983b) *Communications in Soil Science and Plant Analysis.* 18:131-146.
- Zemach *et al.* (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107:18729-18734.
- Zhu (2009) *Annual Review of Genetics* 43:143-166.
- Zhu *et al.* (2007) *Current Biology* 17:54-59.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hạt của cây lúa, hạt này chứa aloron, nội nhũ tinh bột, gen *ROS1a* mã hóa polypeptit ROS1a và một hoặc nhiều biến dị di truyền mà từng biến dị làm giảm hoạt tính của ít nhất là một gen *ROS1a* ở cây này so với cây lúa loại thường tương ứng, trong đó aloron dày hơn so với aloron từ loại hạt thường tương ứng, và trong đó một hoặc nhiều biến dị di truyền bao gồm cải biến di truyền đã được đưa vào ở gen *ROS1a*.
2. Hạt theo điểm 1, trong đó hạt này còn khác biệt ở một hoặc nhiều hoặc tất cả các dấu hiệu:
 - (a) polypeptit ROS1a có hoạt tính ADN glycosylaza;
 - (b) polypeptit ROS1a là khác về trình tự axit amin so với polypeptit ROS1a loại thường tương ứng;
 - (c) polypeptit ROS1a có mức độ hoạt tính ADN glycosylaza nằm trong khoảng từ 2% đến 60% mức độ của hoạt tính ADN glycosylaza của polypeptit ROS1a loại thường tương ứng và/hoặc của polypeptit ROS1a có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO: 2;
 - (d) nồng độ polypeptit ROS1a có ở hạt nằm trong khoảng từ 2% đến 60% nồng độ của polypeptit ROS1a ở hạt loại thường tương ứng; và
 - (e) aloron dày hơn chứa ít nhất là hai, ít nhất là ba, ít nhất là bốn hoặc ít nhất là năm lớp tế bào, khoảng 3, khoảng 4, khoảng 5 hoặc khoảng 6 lớp tế bào, hoặc 2 đến 8, 2 đến 7, 2 đến 6 hoặc 2 đến 5 lớp tế bào.
3. Hạt theo điểm 1 hoặc điểm 2, trong đó một hoặc nhiều biến dị di truyền độc lập là:
 - (a) gen *ROS1a* mã hóa polypeptit ROS1a đột biến có hoạt tính ADN glycosylaza giảm so với polypeptit ROS1a loại thường (SEQ ID NO:2);
 - (b) gen *ROS1a* mà khi được biểu hiện tạo ra polypeptit ROS1a loại thường ở mức giảm, ví dụ, chứa đột biến tại vị trí nối ghép mà khiến gen *ROS1a* biểu hiện ở mức độ giảm so với gen *ROS1a* loại thường mà trình tự ADN bổ trợ của nó được thể hiện ở SEQ ID NO:8, hoặc gen *ROS1a* chứa đột biến ở gen khởi đầu của nó mà khiến gen *ROS1a* biểu hiện ở mức độ giảm so với gen *ROS1a* loại thường; và
 - (c) gen *ROS1a* chứa codon dừng dịch mã sớm ở vùng mã hóa protein của nó sao cho gen này mã hóa polypeptit cắt so với polypeptit ROS1a loại thường.

4. Hạt theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó cây lúa khác biệt ở một hoặc nhiều hoặc tất cả dấu hiệu dưới đây:

(a) cây lúa có hoạt tính ADN glycosylaza trong hạt đang phát triển của nó ở mức độ nằm trong khoảng từ 2% đến 60% mức độ hoạt tính ADN glycosylaza ở hạt loại thường tương ứng đang phát triển;

(b) hoạt tính của ít nhất là một gen *ROS1a* ở cây lúa bị giảm ở một hoặc nhiều hoặc tất cả aloron, vỏ quả, phần lõi ra ở nhân, bầu nhụy, vỏ ngoài của hạt và nội nhũ tinh bột của hạt đang phát triển;

(c) hoạt tính của gen *ROS1a* bị giảm ít nhất tại thời điểm giữa thời điểm nở hoa và 7 ngày sau khi nở hoa, và/hoặc ở tế bào trứng trước khi nở hoa;

(d) cây lúa là hữu dục đực và hữu dục cái; và

(e) cây lúa thể hiện quá trình thành thực hạt trễ.

5. Hạt theo một hoặc nhiều điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó hạt này còn khác biệt ở một hoặc nhiều dấu hiệu trong số:

(a) hạt này, so với hạt loại thường tương ứng, chứa một hoặc nhiều hoặc toàn bộ thành phần dưới đây, mọi thành phần đều được tính theo trọng lượng,

i) hàm lượng khoáng cao hơn, trong đó hàm lượng khoáng là hàm lượng của một hoặc nhiều hoặc tất cả kẽm, sắt kali, magie, phospho và lưu huỳnh,

ii) hàm lượng chất chống oxy hóa cao hơn,

iii) hàm lượng phytat cao hơn,

iv) hàm lượng của một hoặc nhiều hoặc tất cả các vitamin B3, B6 và B9 cao hơn,

v) hàm lượng của chất xơ trong chế độ dinh dưỡng và/hoặc hàm lượng chất xơ không hòa tan cao hơn,

vi) hàm lượng tinh bột nằm trong khoảng từ 90% đến 100% trọng lượng so với hàm lượng tinh bột của hạt loại thường tương ứng;

vii) hàm lượng sucroza cao hơn,

viii) hàm lượng monosacarit cao hơn, và

ix) hàm lượng lipid ít nhất là 90% hoặc ít nhất là 100% so với hàm lượng lipid của hạt loại thường tương ứng,

(b) hạt này chứa phôi;

(c) hạt này là nguyên hạt hoặc hạt nứt vỡ;

(d) hạt này đã được xử lý sao cho nó không còn khả năng nảy mầm;

(e) hạt này có tỷ lệ nảy mầm nằm trong khoảng từ 70% đến 100% so với tỷ lệ nảy mầm của hạt loại thường tương ứng;

(f) hạt chứa amyloza với tỷ phần cao hơn trong tổng hàm lượng tinh bột của nó so với hạt loại thường tương ứng; và

(g) hạt chứa axit oleic với tỷ phần cao hơn và/hoặc axit palmitic với tỷ phần thấp hơn trong tổng hàm lượng axit béo của nó so với hạt loại thường tương ứng.

6. Hạt theo một hoặc nhiều điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, mà khác biệt ở một hoặc nhiều hoặc tất cả các dấu hiệu trong số:

(a) hạt chứa gen *ROS1a* mà mã hóa polypeptit ROS1a mà có hoạt tính ADN glycosylaza, trong đó polypeptit ROS1a mà có hoạt tính ADN glycosylaza là polypeptit ROS1a đột biến;

(b) hạt chứa polypeptit ROS1a đột biến có hoạt tính ADN glycosylaza giảm khi được biểu hiện ở cây lúa so với polypeptit ROS1a loại thường tương ứng; và

(c) hạt có tổng lượng polypeptit ROS1a giảm so với hạt loại thường tương ứng, với điều kiện hạt này chứa ít nhất là một gen *ROS1a* mà mã hóa polypeptit ROS1a mà có hoạt tính ADN glycosylaza.

7. Tế bào tái tổ hợp chứa polynucleotit ngoại sinh mã hóa polypeptit ROS1a mà trình tự axit amin của nó khác trình tự axit amin của polypeptit ROS1a loại thường tương ứng và có hoạt tính ADN glycosylaza giảm so với polypeptit ROS1a loại thường tương ứng, trong đó cây lúa chứa gen *ROS1a* mã hóa polypeptit ROS1a nêu trên sản sinh hạt có aloron dày hơn so với aloron từ hạt thường tương ứng.

8. Tế bào của cây lúa chứa gen *ROS1a* mã hóa polypeptit ROS1a và biến dị di truyền mà làm giảm hoạt tính của ít nhất là một gen *ROS1a* trong tế bào so với tế bào loại thường tương ứng, trong đó hạt của cây lúa có aloron dày hơn so với aloron từ hạt loại thường tương ứng, và trong đó biến dị di truyền bao gồm cải biến di truyền đã được đưa vào gen *ROS1a*.

9. Cây lúa mà tạo ra hạt theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6 và/hoặc chứa tế bào theo điểm 7 hoặc điểm 8.

10. Phương pháp tạo ra tế bào theo điểm 7, phương pháp bao gồm bước đưa polynucleotit ngoại sinh mã hóa polypeptit ROS1a mà trình tự axit amin của nó khác trình tự axit amin của polypeptit ROS1a loại thường tương ứng và có hoạt tính ADN glycosylaza thấp hơn so với polypeptit ROS1a loại thường tương ứng, vào trong tế bào,

trong đó cây lúa chứa gen *ROS1a* mã hóa polypeptit *ROS1a* nêu trên sản sinh hạt có aloron dày hơn so với aloron từ hạt loại thường tương ứng.

11. Phương pháp tạo ra cây lúa theo điểm 9 hoặc hạt từ nó, phương pháp này bao gồm các bước

i) đưa vào tế bào lúa đột biến của gen *ROS1a* nội sinh sao cho gen *ROS1a* đột biến mã hóa polypeptit *ROS1a* mà trình tự axit amin của nó khác trình tự axit amin của polypeptit *ROS1a* loại thường tương ứng và có hoạt tính ADN glycolaza giảm so với polypeptit *ROS1a* loại thường tương ứng, hoặc không mã hóa polypeptit *ROS1a*,

ii) thu nhận cây lúa từ tế bào thu được theo bước i), cây lúa này chứa đột biến của gen *ROS1a* nội sinh, và

iii) tùy ý thu hoạch hạt từ cây theo bước ii), hạt này chứa đột biến của gen *ROS1a* nội sinh, và

iv) tùy ý tạo ra một hoặc nhiều thế hệ cây con từ hạt, các cây con này chứa đột biến của gen *ROS1a* nội sinh, nhờ đó tạo ra cây lúa hoặc hạt lúa.

12. Phương pháp chọn lọc cây lúa theo điểm 9 hoặc hạt lúa theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, phương pháp này bao gồm các bước

i) sàng lọc quần thể cây lúa hoặc hạt mà chúng độc lập thu được từ xử lý đột biến đối với tế bào, hạt hoặc cây lúa tổ tiên, để tạo ra hạt theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6 hoặc để có mặt của đột biến ở gen *ROS1a*, hoặc sự có mặt của hạt lúa theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, và

ii) chọn lọc từ quần thể theo bước (i) cây lúa mà tạo ra hạt theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, hoặc hạt lúa theo bước (i) mà là hạt lúa theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6,

bằng cách đó chọn lọc cây lúa hoặc hạt lúa.

13. Phương pháp chọn lọc cây lúa theo điểm 9, phương pháp này bao gồm các bước

i) tạo ra một hoặc nhiều cây con từ hạt lúa, hạt lúa này thu được từ việc lai hai cây lúa bố mẹ,

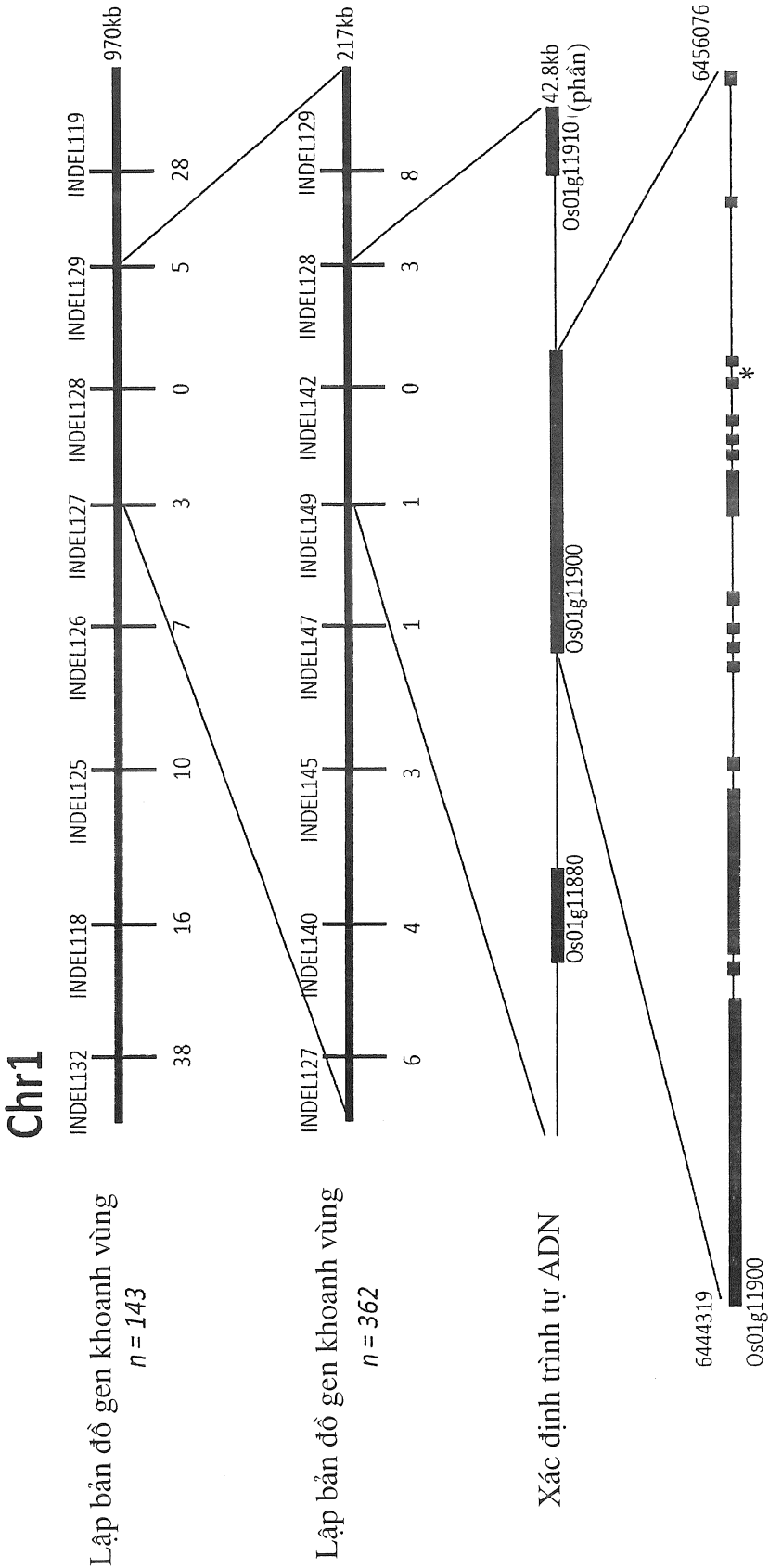
ii) sàng lọc một hoặc nhiều cây con theo bước i) để tạo ra hạt theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, và

iii) chọn lọc cây con mà tạo ra hạt, bằng cách đó chọn lọc cây lúa.

14. Phương pháp xác định cây lúa mà tạo ra hạt theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, phương pháp này bao gồm các bước
- A) i) thu nhận mẫu axit nucleic từ cây lúa, và
 - ii) sàng lọc mẫu theo hiện tượng có hoặc không có biến dị di truyền mà làm giảm hoạt tính của gen *ROS1a* ở cây so với cây lúa loại thường tương ứng.
 - B) i) thu nhận hạt từ cây lúa, và
 - ii) sàng lọc hạt hoặc phần của nó theo một trong số các dấu hiệu:
 - a) aloron dày hơn,
 - b) lượng peptit *ROS1a* và/hoặc hoạt tính ở hạt, và
 - c) lượng ARN thông tin được mã hóa bởi các gen *ROS1a* ở hạt.
15. Phương pháp tạo ra một phần của cây lúa, phương pháp này bao gồm các bước,
- a) trồng cây lúa theo điểm 9, hoặc ít nhất là 100 cây lúa như vậy trên cánh đồng, và
 - b) thu hoạch một phần cây lúa từ cây lúa hoặc các cây lúa.
16. Phương pháp tạo ra gạo bột, cám, bột nguyên hạt, mạch nha, tinh bột hoặc dầu thu được từ hạt, phương pháp bao gồm các bước;
- a) thu nhận hạt theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, và
 - b) xử lý hạt này để tạo ra bột, cám, bột nguyên hạt, mạch nha tinh bột hoặc dầu.
17. Sản phẩm tạo ra được từ hạt theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, hoặc cây lúa theo điểm 9, hoặc từ một phần của hạt đó hoặc cây lúa đó, trong đó sản phẩm này chứa một hoặc nhiều hoặc tất cả gen *ROS1a*, biến dị di truyền, polynucleotit ngoại sinh và aloron dày, và, trong đó sản phẩm này là thành phần thực phẩm, thành phần đồ uống, thành phần thực phẩm hoặc thành phần đồ uống.
18. Sản phẩm theo điểm 17, trong đó
- i) thành phần thực phẩm hoặc thành phần đồ uống được chọn từ nhóm bao gồm bột nguyên hạt, bột, cám, tinh bột, mạch nha và dầu,
 - ii) thành phần thực phẩm được chọn từ nhóm bao gồm: bánh mỳ lên men hoặc bánh mỳ không lên men, mỳ ống, mỳ, củ khô cho động vật, ngũ cốc để ăn sáng, đồ ăn qua loa, bánh ngọt, bánh nướng và thực phẩm chứa xốt làm từ bột, hoặc
 - iii) thành phần đồ uống là đồ uống đóng gói hoặc đồ uống chứa etanol.

19. Phương pháp chế biến thành phần thực phẩm hoặc thành phần đồ uống theo điểm 17 hoặc theo điểm 18, phương pháp bao gồm

- A) việc xử lý hạt theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, hoặc cám, bột, bột nguyên hạt, mạch nha, tinh bột hoặc dầu từ hạt, để tạo ra thành phần thực phẩm hoặc thành phần đồ uống
- B) việc trộn hạt theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, hoặc cám, bột, bột nguyên hạt, mạch nha, tinh bột hoặc dầu từ hạt, với thành phần khác của thực phẩm hoặc đồ uống.



Hình 1

WT

CAATGAG-----GTATTTGCTGATCATGACTCAAGCCGGA
 CAATGAG-----GTATTTGCTGATCATGACTCAAGCCGGA
 CAATGAG-----GTATTTGCTGATCATGACTCAAGCCGGA
 CAATGAG-----GTATTTGCTGATCATGACTCAAGCCGGA
 CAATGAG-----GTATTTGCTGATCATGACTCAAGCCGGA
 CAATGAGTGTTCAAATGTTATGCGGCAGGTATTTGCTGATCATGACTCAAGCCGGA
 CAATGAGTGTTCAAATGTTATGCGGCAGGTATTTGCTGATCATGACTCAAGCCGGA
 CAATGAGTGTTCAAATGTTATGCGGCAGGTATTTGCTGATCATGACTCAAGCCGGA
 CAATGAGTGTTCAAATGTTATGCGGCAGGTATTTGCTGATCATGACTCAAGCCGGA
 CAATGAGTGTTCAAATGTTATGCGGCAGGTATTTGCTGATCATGACTCAAGCCGGA
 CAATGAGTGTTCAAATGTTATGCGGCAGGTATTTGCTGATCATGACTCAAGCCGGA
 CAATGAGTGTTCAAATGTTATGCGGCAGGTATTTGCTGATCATGACTCAAGCCGGA
 CAATGAGTGTTCAAATGTTATGCGGCAGGTATTTGCTGATCATGACTCAAGCCGGA
 CAATGAG-----GTATTTGCTGATCATGACTCAAGCCGGA
 CAATGAG-----GTATTTGCTGATCATGACTCAAGCCGGA
 CAATGAGTGTTCAAATGTTAAGCGGCAGGTATTTGCTGATCATGACTCAAGCCGGA
 CAATGAGTGCTCAAATGTTATGCGGCAGGTATTTGCTGATCATGACTCAAGCCGGA
 CAATGAGTGTTCAAATGTTATGCGGCAGGTATTTGCTGATCATGACTCAAGCCGGA
 CAATGAGTGTTCAAATGTTATGCGGCAGGTATTTGCTGATCATGACTCAAGCCGGA

ta2

Hình 2

CNSQENGELCASNTCGSCNSIREAQAQKVRGTLLIPCRTAMRGSFPLNGTYFQVNE----
CNSQENGELCASNTCGSCNSIREAQAQKVRGTLLIPCRTAMRGSFPLNGTYFQVNECSNV

---VFADHDSSRNPIDVPRSWIWNLPRTVYFGTSIPTIFKGLTTEEQHCFWRGFVCVR
MRQVFADHDSSRNPIDVPRSWIWNLPRTVYFGTSIPTIFKGLTTEEQHCFWRGFVCVR

GFDRTSRAPRPLYARLHFPASKITRNKKSAGSAPGRDDE
GFDRTSRAPRPLYARLHFPASKITRNKKSAGSAPGRDDE

Hình 3

Hình 4

5/11

AtDME QPQGLIRGQQPCVPLIDQQPATPKGFTHLNQMVATS-MSSPGLRPHSQSQVPTTYLHVE
 AtROS1a LQEKQLDSGN-----QELKDCLLSAPSTPKRKRSQGR-----
 OsROS1a INSNVF-----TLADA-----QRLIAREKSRASQ-----
 : : : . : : *

AtDME SVSRILNGTTGTCQRSRAPAYDSLQQDIHQGNKYILS--HEISNGNGCKKALPQNSS--
 AtROS1a -----KGVQPKKNGSN-LEEVDISMAQAARRQGPTCCDM-NLS----G
 OsROS1a -----RMISFRSSKNDMVNRSEMVHQHGRPAPHGSACRESIEVPDKQFG
 : . : : . * *

AtDME LPTPIMAKLEEA--RGSKRQYHRAMGQTEK-----HDL----NLA---
 AtROS1a -----IQYDEQCDYQKMHWLYSPNLQQGGMRYDAICSVFSGQQ
 OsROS1a LMTEELTQLPSMPNNPQREKYIPQTGSCQLQSL-----HDMVKGHNLAGEL
 : : : *

AtDME -QQIAQSQDVERHNSSTCVEYLDAAKTKIKV-----VQENLHGM-----
 AtROS1a HNYVSAF-----HATCYSSSTQLSANRVLTVEEERREGIFQ---GRQE-----SELN
 OsROS1a HKQVTSPQVV--IQSNFCVTPPDVLR-R-TSGEHLRTLAPTHASTCKDTLKALSCQLE
 : : : * . : . :

AtDME -----PPEVIEIEDDPTDGARKGKNTASISKGASKGNSSPVKKTAKEKCIVPKTPAKK
 AtROS1a VLSDKIDTPIKKKTGHA---RFRN----LSSM-----NKLVEVPEH-----LTS
 OsROS1a SSRDIIRPPVNI GPSSADVPRTDNHQVKVSEE-----TVTAKLPEKRVGRPRKELKP
 : : * : : * . : * :

AtDME GRAGRKKSVPFP--AHASEIQLWQPTPPKTPLSRSKPK-----GKGRKSIQD--
 AtROS1a GYCSKPQQNNK--ILVDTRVTVSKKPTKSEKSTKQKNLLPNLCRFPPSFTGLSPDEL-
 OsROS1a GEKPKPRGRPRKGKVVGGEL-----ASKDSHTNPLQNESTSCSYGPYAGEASVGRAV
 * : : . : * : :

AtDME --SGKARGPSGELL-CQDSIAEIIYRMQNLYLGDKEREQEQNAMVLYKG-----D
 AtROS1a -----WKRRNSIETISEL---LRLLDINREHSETALVPYTMNSQIVLFGGGA
 OsROS1a KANRVGENISGAMVSLDSDLIVIQK---IKVLDINKSEDPV---TABPHGALVPYNGEF
 : * : : : * : . . .

AtDME GALVPYES--KKRKP RPKV DIDDETTRIWNLLMGKGDEKEGDEEKDKKKEKWWEERRVF
 AtROS1a GAIVPVT- PVKKPRRPKV DLDDETDREVWKLLENIN-SEGVDGSDEQKAKWEEERNVF
 OsROS1a GPIVPFEGKVKKRSRAKVDLDPVTALMWKLLMGPDMSDCAEGMDKDKKWLNEERKIF
 * : * * : : * * * : * : * : : : * : * * : * : *

AtDME RGRADSFIARMHLVQGDRRFSPWKGSSVVDVIGVFLTQNVSDHLSSSAFMSLAARFPKPL
 AtROS1a RGRADSFIARMHLVQGDRRFSPWKGSSVVDVIGVFLTQNVSDHLSSSAFMSLASQFPVPF
 OsROS1a QGRVDSFIARMHLVQGDRRFSPWKGSSVVDVIGVFLTQNVSDHLSSSAFMALAAKFPVKP
 : * . *

AtDME SSSREDERNVRSVVVEDPEGCILNLNEIPSWQEK--VQHPSDMEVSGVDSGSK-----E
 AtROS1a VPSSNFDA-----GTS-SMP----SI-----QITYLDSEETMSS----
 OsROS1a EASEKPANVMFHTISEN-GDCSGLFGNSVKLQGEILVQEASNTAASFITTEDKEGSNSVE
 * : . . : : : .

AtDME QLRDCSNSGIERF-----NFLEKSIQNL-----EEEVL
 AtROS1a -----PPDHNHS---SV-TLKNTQPDEE--KDYVPSNETS--
 OsROS1a LLGSSFGDGDGAAGVYSNIYENLPARLHATRRPVVQTGNAVEAEDGSLEGVSSSENSTI
 : : *

AtDME SSQDSFDPALFQSC-----GRVGSCSCSKSDAEFPTRCETKT---VSGTS-
 AtROS1a --RSSSEIA--ISAH-----ES-----VDKTTD
 OsROS1a SSQNSSDYL FHMSDHMFSSMLLNFTAEDIGSRNMPKATRTTYTELLRMQELKNKSNETIE
 : . * : *

AtDME QSVQTGSPNL-SD-----EICLQGNR-----PHLYEGSGDVQKQETTNAQKKPDLEK
 AtROS1a SKEYVDSR-----KGS-----SVEVD-----
 OsROS1a SSEYHGVPVSCSNNIQVLNGIQNIGSKHQPLHSSISYHOTGQVH-----LPDIVH
 . . * .

Hình 4 (tiếp theo)

AtDME TMNWKDSVCFGQPRN-----DTNWQTPSSSYEQCATRQPHVLDIEDFGMQGEGGLGYSW
 AtROS1a -----KTDEKCRVLNLFPSSEDSAL-TCQ-----
 OsROS1a ASDLEQSVYTGLNRLVDSNVQTSTSYPPSPHPGI-ACN-----
 . : . *

AtDME MSISPRVDRVKNKNVPRRFFRQGGSVPREFTGQIIPSTPHELPGMGLSGSSSAVQEHQDD
 AtROS1a -----HSMVSDAPQNTERAGSSSEIDLEGEYRTSFMKLLQGVQVSLSDSNQVSPNMS
 OsROS1a -----NETQK-----ADSLSNMLYGIDRSDKTTSLSEPTPR
 . . * . * * : * . :

AtDME TQHNQQDEMKNKASHLQKTFDLNLSSEECLTRQ-----
 AtROS1a PG-----DCSS-----
 OsROS1a ID---NCFQPLSSEKMSFAREQSSSENYLSRNEAEAFVKQHGTSTNVQGDNTVRTEQNG
 : .

AtDME -----S-----STKQNIITDGCLPRDRTAEDVVDPLSNSSSLQNILV
 AtROS1a -----EIKGFQSMKEPTKSSVDSSEPGCCSQDD--GDVLSCQ-----
 OsROS1a GENSGSGYSQQDDNVGFQTATT--SNL--YSSNLCQNQKANSEVLHGVSS----NLIE
 * . . : * :

AtDME ESNSSNKEQTAVEYKETNATILREMKGTLADGKKPTSQWDSLKRDVEGNEGRQERNKNNM
 AtROS1a -----KP-----TLKEKGKKVLKEEKKAFDWDCLRREAQARAGIREKTRSTM
 OsROS1a NSKDDKKTSP----KVPVDGSKAKRPRVGAGKKKTYDWDMLRKEVLYSHGNKERSQNAK
 . : : * : : * * * : . * : * : .

AtDME DSIDYEAIRRASISEISEAIKERGMNNMLAVRIKDFLERIVKDHGGIDLEWLRESPPDKA
 AtROS1a DTVDWKAIRAADVKEVAETIKSRGMNHKLAERIQGFLDRLVNDHGSIDLEWL RDVPDKA
 OsROS1a DSIDWETIRQAEVKEISDTIRERGMNNMLAERIKDFLNLRLVRDHGSIDLEWLRYVDSDKA
 * : * : * * * . * . : * : : * : * * * . * * * : * : * : * . * * * * * * * * * * *

AtDME KDYLLSIRGLGLKSVECVRLLTLLHNLAFPVDTNVGRIAVRMGWVPLQPLPESLQLHLLEL
 AtROS1a KEYLLSFNGLGLKSVECVRLLTLLHHLAFPVDTNVGRIAVRLGWVPLQPLPESLQLHLLEM
 OsROS1a KDYLLSIRGLGLKSVECVRLLTLLHMAFPVDTNVGRICVRLGWVPLQPLPESLQLHLLEM
 * : * * * : . * * * * * * * * * * * : * * * * * * * * * * * . * * : * * * * * * * * * * :

AtDME YPVLESIQKFLWPRCLKLDQRTLYELHYQLITFGKVFCTKSRPNCNACPMRGEGRHFASA
 AtROS1a YPMLESIQKYLWPRCLKLDQRTLYELHYQMITFGKVFCTKSKPNCNACPMKGEGRHFASA
 OsROS1a YPMLENIQKYLWPRCLKLDQRTLYELHYQMITFGKVFCTKSKPNCNACPMRAECKHFASA
 * * : * * . * * : * * * * * * * : * * * * * * * : * * * * * * * : * * : * * * *

AtDME YASARLALPAPEERSLTSATIPVPPESYPPVAIPMIELPLPLEKSLASGAPSNRENCEPI
 AtROS1a FASARLALPSTEGMGTPDKNPLHLHP--EPFQR--EQGSEVV--QHSEPAKKVTCCEPI
 OsROS1a FASARLALPGPEEKSLVTSGTPIAAETFHQTYISSRPVVSQLEW--NSNTCHHGMNRRQPI
 : * * * * * * . * : . * : . : . : * :

AtDME IEEPASPGQEC--TEITESDIEDAYNEDPDEIPTIKLNIEQFGMTLREHMER--NMELQE
 AtROS1a IEEPASPEPET--AEVSIADIEEAF--EDPEEIPITIRLNMDAFTSNLKKIMEH--NKELQD
 OsROS1a IEEPASPEPEHEHEEMKECAIEDSFV--DDPEEIPITIKLNFEETQNLKSYMQANNIEIED
 * * * * * * * * * * * * : * : . * * : : : * : * * * * * * : * * . * : * * : :

AtDME GDMSKALVALHPTTTSIPTPKLKNISRLRTEHQVYELPDShRLLDGMDKREPDDPSPYLL
 AtROS1a GNMSSALVALTAETASLPMPLKNISQLRTEHRVYELPDEHPLLAQLEKREPDDPSPYLL
 OsROS1a ADMSKALVAITPEVASIPTPKLKNVSRRLRTEHQVYELPDShPLLEGFNQREPDDPCPYLL
 . : * * . * * * : . : * : * * * * : * * * * * * * * * * * . * * * : : * * * * * . * * *

AtDME AIWTPGETANSAQPPEQKCGGKASGKMCFDETCSECNSLREANSQTVRGTTLLIPCRTAMR
 AtROS1a AIWTPGETADSIQPSVSTCIFIQANGMLCDEETCFSCNSIKETRSQIVRGTTLLIPCRTAMR
 OsROS1a SIWTPGETAQSTDAPKSVCSNQEENGELCASNTCFSCNSIREAQAQKVRGTTLLIPCRTAMR
 : * * * * * * : * : . * : . * : * : * * . * * : : * : * * * : * * * * * *

AtDME GSFPLNGTYFQVNELFADHESSLKPIDVPRDWIWDLPRTTVYFGTSVTSIFRGLSTEQIQ
 AtROS1a GSFPLNGTYFQVNEVFADHASSLNPIINVPRELIWELPRTTVYFGTSVPTIFKGLSTEQIQ
 OsROS1a GSFPLNGTYFQVNEVFADHDSSRNPIDVPRSWIWNLPRTTVYFGTSIPTIFKGLTTEEQIQ
 * * * * * * * * * * * : * * * * * * * : * * : * * * . * * : * * * * * * * : * * : * * : * * *

Hình 4 (tiếp theo)

| | |
|---------|--|
| AtDME | FCFWKGFVCVRGFEQKTRAPRPLMARLHFPASKLKNNKT----- |
| AtROS1a | ACFWKGYVCVRGFDKTRGPKPLIARLHFPASKLKGQANLA----- |
| OsROS1a | HCFWRGFVCVRGFDRTSRAPRPLYARLHFPASKITRNKKSAGSAPGRDDE |
| | ***:*:*****:..*:.* ** *****;. . :: |

Hình 4 (tiếp theo)

8/11

```

AtROS1a MEKQRREESSFQQPPWIPQTPMKPFSPICPYTVEDQYHSSQLEERR--FVGNKDMSGLD
OsROS1a -----MQDFGQWLPQSQTADLYFSSIPIPSQFDTSIETQTRTSAVVSSEKE----
          :  *::*:  .  .  :  .*:::*  :  *  .*.::.

AtROS1a HLSFGDLLALANTASLIFSGQTPIPTRNTEVMQ----KGTEEVESLSSVSNNVAEQILK
OsROS1a -----SANSFVPHNGTGLVERISNDAGLTEVVGSSAGPTECIDLNKT
          *.::: :* . * :::  *  ** . *:  .:  :  .

AtROS1a TPEKPKRKKHRPKVRREAKPKREPKPRAPRKS VVTGQESKTPKRKYVRKKVEVSKDQ--
OsROS1a PARKPKKKKHRPKVLKDDKPSKTPKSATPI PST--EKVEKPSGKRKYVRKKTS PGQPPAE
          .***:***** : : **.: * : * . :  * . : *****.. : :

AtROS1a -----
OsROS1a QAASSHCRSELKSVKRSLDFGGEVLQESTQSGSQVPVAEICTGPKRQSIPSTIQRDSQSQ

AtROS1a -----
OsROS1a LACHVVSSTSSIHTSASQMVNAHLFPPDNMPNGVLLDLNNSTSQLQNEHAKFVDSPARLF

AtROS1a -----
OsROS1a GSRIRQTSGKNSLLEIYAGMSDRNVPDLNSSISQTHSMSTDFAQYLLSSSQASVRETQMA

AtROS1a -----
OsROS1a NQMLNGHRMPENPITPSHCIERAALKEHLNHVPHAKAAVMNGQMPHSYRLAQNPILPPNH

AtROS1a -----DATPVESSAAVET-----STRPKR-----LC
OsROS1a IEGYQVMENLSELVTNDYLTASPFSGTGAANRQHNIGDSMHIHALDPRRESNASSGSKI
          *:*.:::.*:::  :  *:

AtROS1a RRVLDFAENGE-----NQTNGDIREA-----
OsROS1a SLGVNFNQNNNGWASAGAADAASSHAPYFSEPHKRMRTAYLNYPNGVVGHFSTSTDL
          ::*: :*  *  ** : .

AtROS1a ----GEMESALQEKQLDSGNQELKDCLLSAPSTPKRKRSGQKRKGVPKKNNGSN-LEEVD
OsROS1a NNENENVASAINSNVF----TLADA----QRLIAREKSRASQRMISFRSSKNMVMNRSE
          : : **::: :  *  * .  *::*:::: : . . . : : :

AtROS1a ISMAQAAKRRQGPTCCDM-NLS----G-----IQYDEQCDYQKM
OsROS1a MVHQHGRPAPHGSACRESIEVPDKQFGLMTEELTQLPSMPNNPQREKYIPQTGSCQLQSL
          :  .  : * : * : :  *  *  .*: *:

AtROS1a HWLYSPNLQQGGMRYDAICSKVFSGQQHNYVSAF----HATCYSSTSQLSANRVLTVEE
OsROS1a E-----HDMVKGHNLAGELHKQVTSPQVVIQSNFCVTPPDVLGR-R-TSGEH
          .  * : . : :*: * : *:  * : . * . * : *.

AtROS1a RREGIFQ--GRQE-----SELNVLSDKIDTPIKKKTGHA---RFRN---LSSMNK
OsROS1a LRTLIAPTHASTCKDTLKALSCQLESSRDIIRPPVNPIGPSSADVPRTDNHQVKVSEETV
          *  *  .  :  .*:  *  *  *:  .  *  *  *  :*. .

AtROS1a LVEVPEH-----LTSGYCSKPQQNNK--ILVDTRVTVSKKKPTKSEKSQTKQKNLL
OsROS1a TAKLPEKRVGRPRKELKPGEKPKPRGRPRKGKVVGEL-----ASKDSHTNPLQNE
          .::*:  * . *  **: . :  *  . :  *:*.::: :

AtROS1a PNLCRFPSPFTGLSPDEL-----WKKRNSIETISELLRLLDINREHSETAL
OsROS1a STSCSYGPYAGEASVGRAVKANRVGENISGAMVSLDLSLDIVIQIKVLDINKSEDPV--
          .  * : *  *  .  .  :*: : : : :*:*****.. .

AtROS1a VPYTMNSQIVLFGGGAGAIVPVT-PVKKPRPRPKVDLDDTDRVWKLLENINSEGVGDS
OsROS1a -TAEPHGALVPYNGEFGPIVPFEGKVKRKRRAKVDLDPVTALMWKLLMGPDMSDCAEGM
          .. : * : *  *  ** .  **: *  *  *****  *  :****:  * : .:

```

Hình 5

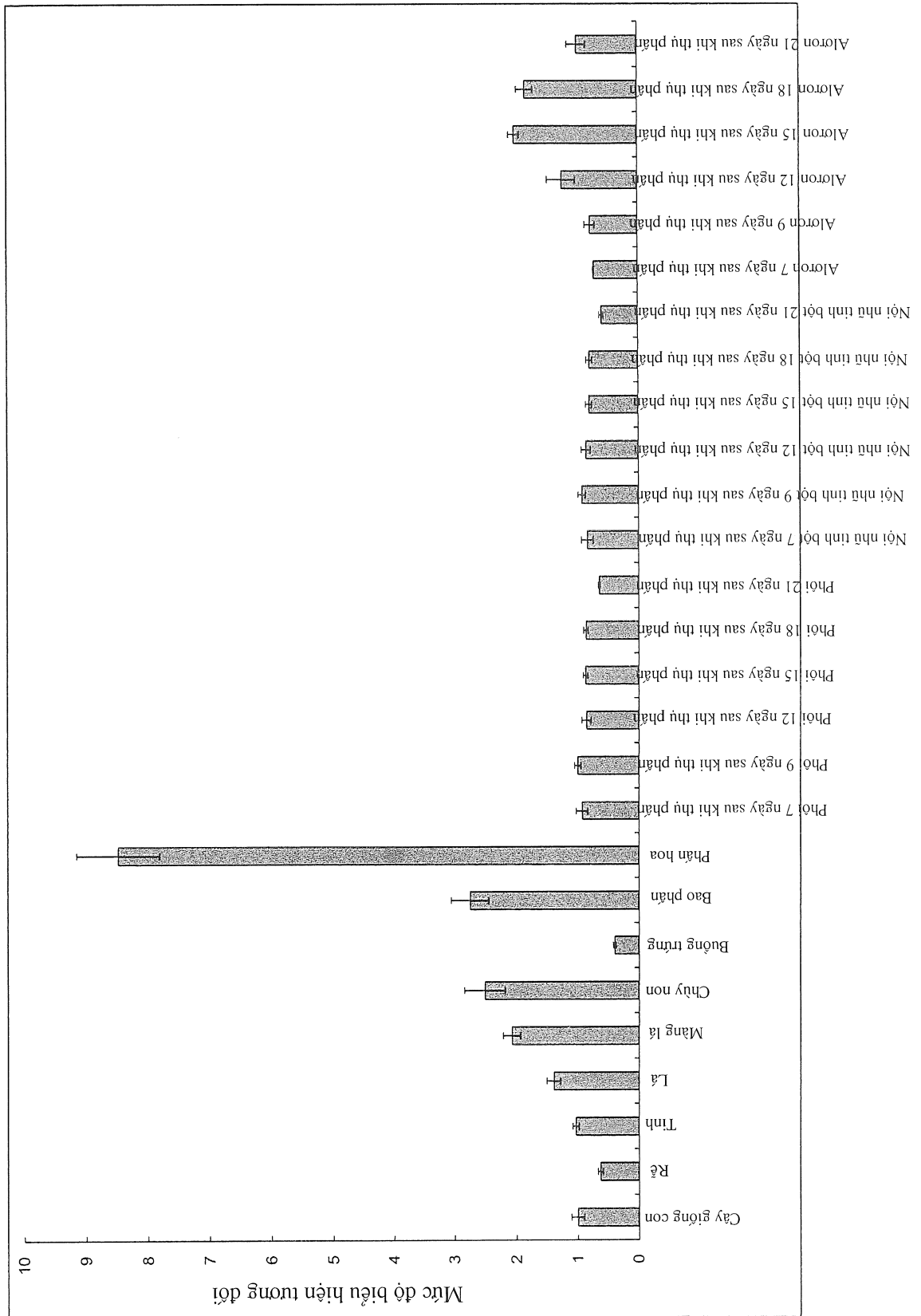
9/11

| | |
|---------|--|
| AtROS1a | DEQKAKWEEERNVFRGRADSFIA RMHLVQGDRRFTPWKGSVVDSVVG VFLTQNVSDHLS |
| OsROS1a | DKDKEKWLNEERKIFQGRVDSFIARMHLVQGDRRFSPWKGSVVDSVVG VFLTQNVSDHLS
*: * :*: *: *: *.*****:***** |
| AtROS1a | SSAFMSLASQFPVPFVPSSNFDA-----GTS-SMP----SI-----QIT |
| OsROS1a | SSAFMALAAKFPVKPEASEKPANVMFHTISENGDCSGLFGNSVKLQGEILVQEASNTAAS
*****: *: *: * : : * . : : : |
| AtROS1a | YLDSEETMSS-----PPDHNHS---SV-TLKNTQPDEE |
| OsROS1a | FITTEDKEGSNSVELLGS SFGDGV DGAAGVYSNIYENLPARLHATRRPVVQTGNAVEAED
: : *: . . * : * : * * : * : |
| AtROS1a | --KDYVPSNETS---RSSEIA--ISAH-----ES----- |
| OsROS1a | GSLEGVVSENSTISSQNSDYL FHMSDHMFSSMLLNFTAEDIGSRNMPKATRTTYTELL
: * *. *. * : *: : * * |
| AtROS1a | -----VDKTTDSKEYVDSDR-----KGS-----SVEVD----- |
| OsROS1a | RMQELKNKSNETIESSEYHGVPVSCSNNIQVLNGIQNIGSKHQPLHSSISYHOTGQVHLP
: * : * . ** * : . |
| AtROS1a | -----KTDEKCRVLNLFPSSEDSALTCQHSMVSDAPQNTERAGSSSEI |
| OsROS1a | DIVHASDLEQSVYTGLNRVLDSNVTQTSYYPSPHPGIACNNETQK-----
* . : . : * . : : * : . |
| AtROS1a | DLEGEYRTSFMKLLQGVQVSLEDSNQVSPNMSPGDCSS----- |
| OsROS1a | -----ADSLSNMLYGIDRSDKTTSLEPTPRIDNCFQPLSSEKMSFAREQSSSENYLSR
* : : * * : * : : . * . : * . |
| AtROS1a | -----EIKGFQSMKEPTKSSVDSSE |
| OsROS1a | NEAEAAFVKQHGTSNVQGDNTVRTEQNGGENSQSGYSQQDDNVGFQTATT--SNL--YS
: * *: . * : . |
| AtROS1a | PGCCSQD--GDVLSCQ-----KP-----TLKEKGKVKLKEEKAFFDWDCL |
| OsROS1a | SNLCQNQKANSEVLHGVSSNLIENSKDDKKTSPKVPVDGSKAKRPRVGAGKKKTYDWDML
* . : * . : * * . * * : * : * : * * * |
| AtROS1a | RREAQARAGIREKTRSTMDTVDWKAIRAADVKEVAETIKSRGMNHKLAERIQQFLDRLVN |
| OsROS1a | RKEVLYSHGNKERSQNAKDSIDWETIRQAEVKEISDTIRERGMNMLAERIKDFLNRVLR
* : * . * : : : : * : * : : * : * : * : * : * : * : * : * |
| AtROS1a | DHGSIDLEWL RDVPPDKAKEYLLSFNGLGLKSVECVRL LTLHHLAFPDVTNVGRIAVRLG |
| OsROS1a | DHGSIDLEWLRYVDSKADYLLSIRGLGLKSVECVRL LTLHHLAFPDVTNVGRICVRLG
***** * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * |
| AtROS1a | WVPLQPLPESLQLH LLEMYPMLESIQYLWPRLCKLDQKTLYELHYQMITFGKVFCTKSK |
| OsROS1a | WVPLQPLPESLQLH LLEMYPMLENIQYLWPRLCKLDQRTLYELHYQMITFGKVFCTKSK
***** . *****:***** |
| AtROS1a | PNCNACPMKGECRHFASAFASARLALPSTEKMGTPDKNPLPLHLP-EPFQR--EQGSEV |
| OsROS1a | PNCNACPMRAECKHFASAFASARLALPGPEEKSLVTSGTPIAAETFHQTYISSRPVVSQ
*****: *: *****: * : . . * : : : * : : |
| AtROS1a | V-QHSEPAKKVTCCEPIIEEPASPEPET--AEVSIADIEEAFEDPEEIPTIRLNMDAFT |
| OsROS1a | EWNSNTCHHGMNNRQPIIEEPASPEPEHETEEMKECAIEDSFVDDPEEIPTIKLNFEFT
: . : : : ***** * : . * : * : * : * : * |
| AtROS1a | SNLKKIMEH-NKELQDGNMSSALVALTAETASLPMPLKNISQLRTEHRVYELPDEHPLL |
| OsROS1a | QNLKSYMQANNIEIEDADMSKALVAITPEVASIPTPKLKNVSRRLRTEHQVYELPDHPLL
. * . * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * |
| AtROS1a | AQLEKREPDDPCSYLLAIWTPGETADSIQPSVSTCIFIQANGMLCDEETCFSCNSIKETRS |
| OsROS1a | EGFNQREPDDPCPYLLSIWTPGETAQSTDAPKSVCSNQENGELCASNTCFSCNSIREAQA
: : ***** * : *****: * : * . * * * . : *****: * : : |

Hình 5 (tiếp theo)

| | |
|---------|--|
| AtROS1a | QIVRGTILIPCRTAMRGSFPLNGTYFQVNEVFADHASSLNPINVPRELIWELPRRTVYFG |
| OsROS1a | QKVRGTLLIPCRTAMRGSFPLNGTYFQVNEVFADHDSSRNPIDVPRSWIWNLPRTVYFG |
| | * ****;***** ** **;***. **:***** |
| AtROS1a | TSVPTIFKGLSTEKIQACFWKGYVCVRGFDKTRGPKPLIARLHFPASKLKQQANLA-- |
| OsROS1a | TSIPTIFKGLTTEEIQHCFWRGFCVRGFDRTSRAPRPLYARLHFPASKITRNKKSAGSA |
| | **;*****;*:** **:*:*****.:*.*:* *****;. :. . . |
| AtROS1a | ----- |
| OsROS1a | PGRDDE |

Hình 5 (tiếp theo)



Hình 6

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation
 Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences

<120> Hạt của cây lúa, cây lúa, phương pháp tạo ra cây lúa, và phương
 pháp tạo ra thực phẩm hoặc đồ uống chứa hạt này

<130> 524026
 <150> AU 2015904754
 <151> 2015-11-18
 <160> 50
 <170> PatentIn phiên bản 3.5
 <210> 1
 <211> 1959
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> polypeptit ROS1a của lúa đột biến (Ta2)
 <400> 1

| |
|-----|
| Met | Gln | Asp | Phe | Gly | Gln | Trp | Leu | Pro | Gln | Ser | Gln | Thr | Thr | Ala | Asp | 1 | 5 | 10 | 15 |
| Leu | Tyr | Phe | Ser | Ser | Ile | Pro | Ile | Pro | Ser | Gln | Phe | Asp | Thr | Ser | Ile | 20 | 25 | 30 | |
| Glu | Thr | Gln | Thr | Arg | Thr | Ser | Ala | Val | Val | Ser | Ser | Glu | Lys | Glu | Ser | 35 | 40 | 45 | |
| Ala | Asn | Ser | Phe | Val | Pro | His | Asn | Gly | Thr | Gly | Leu | Val | Glu | Arg | Ile | 50 | 55 | 60 | |
| Ser | Asn | Asp | Ala | Gly | Leu | Thr | Glu | Val | Val | Gly | Ser | Ser | Ala | Gly | Pro | 65 | 70 | 75 | 80 |
| Thr | Glu | Cys | Ile | Asp | Leu | Asn | Lys | Thr | Pro | Ala | Arg | Lys | Pro | Lys | Lys | 85 | 90 | 95 | |
| Lys | Lys | His | Arg | Pro | Lys | Val | Leu | Lys | Asp | Asp | Lys | Pro | Ser | Lys | Thr | 100 | 105 | 110 | |
| Pro | Lys | Ser | Ala | Thr | Pro | Ile | Pro | Ser | Thr | Glu | Lys | Val | Glu | Lys | Pro | 115 | 120 | 125 | |
| Ser | Gly | Lys | Arg | Lys | Tyr | Val | Arg | Lys | Lys | Thr | Ser | Pro | Gly | Gln | Pro | 130 | 135 | 140 | |
| Pro | Ala | Glu | Gln | Ala | Ala | Ser | Ser | His | Cys | Arg | Ser | Glu | Leu | Lys | Ser | 145 | 150 | 155 | 160 |
| Val | Lys | Arg | Ser | Leu | Asp | Phe | Gly | Gly | Glu | Val | Leu | Gln | Glu | Ser | Thr | 165 | 170 | 175 | |
| Gln | Ser | Gly | Ser | Gln | Val | Pro | Val | Ala | Glu | Ile | Cys | Thr | Gly | Pro | Lys | 180 | 185 | 190 | |
| Arg | Gln | Ser | Ile | Pro | Ser | Thr | Ile | Gln | Arg | Asp | Ser | Gln | Ser | Gln | Leu | 195 | 200 | 205 | |
| Ala | Cys | His | Val | Val | Ser | Ser | Thr | Ser | Ser | Ile | His | Thr | Ser | Ala | Ser | 210 | 215 | 220 | |
| Gln | Met | Val | Asn | Ala | His | Leu | Phe | Pro | Pro | Asp | Asn | Met | Pro | Asn | Gly | 225 | 230 | 235 | 240 |

Val Leu Leu Asp Leu Asn Asn Ser Thr Ser Gln Leu Gln Asn Glu His
 245 250 255
 Ala Lys Phe Val Asp Ser Pro Ala Arg Leu Phe Gly Ser Arg Ile Arg
 260 265 270
 Gln Thr Ser Gly Lys Asn Ser Leu Leu Glu Ile Tyr Ala Gly Met Ser
 275 280 285
 Asp Arg Asn Val Pro Asp Leu Asn Ser Ser Ile Ser Gln Thr His Ser
 290 295 300
 Met Ser Thr Asp Phe Ala Gln Tyr Leu Leu Ser Ser Ser Gln Ala Ser
 305 310 315 320
 Val Arg Glu Thr Gln Met Ala Asn Gln Met Leu Asn Gly His Arg Met
 325 330 335
 Pro Glu Asn Pro Ile Thr Pro Ser His Cys Ile Glu Arg Ala Ala Leu
 340 345 350
 Lys Glu His Leu Asn His Val Pro His Ala Lys Ala Ala Val Met Asn
 355 360 365
 Gly Gln Met Pro His Ser Tyr Arg Leu Ala Gln Asn Pro Ile Leu Pro
 370 375 380
 Pro Asn His Ile Glu Gly Tyr Gln Val Met Glu Asn Leu Ser Glu Leu
 385 390 395 400
 Val Thr Thr Asn Asp Tyr Leu Thr Ala Ser Pro Phe Ser Gln Thr Gly
 405 410 415
 Ala Ala Asn Arg Gln His Asn Ile Gly Asp Ser Met His Ile His Ala
 420 425 430
 Leu Asp Pro Arg Arg Glu Ser Asn Ala Ser Ser Gly Ser Trp Ile Ser
 435 440 445
 Leu Gly Val Asn Phe Asn Gln Gln Asn Asn Gly Trp Ala Ser Ala Gly
 450 455 460
 Ala Ala Asp Ala Ala Ser Ser His Ala Pro Tyr Phe Ser Glu Pro His
 465 470 475 480
 Lys Arg Met Arg Thr Ala Tyr Leu Asn Asn Tyr Pro Asn Gly Val Val
 485 490 495
 Gly His Phe Ser Thr Ser Ser Thr Asp Leu Ser Asn Asn Glu Asn Glu
 500 505 510
 Asn Val Ala Ser Ala Ile Asn Ser Asn Val Phe Thr Leu Ala Asp Ala
 515 520 525
 Gln Arg Leu Ile Ala Arg Glu Lys Ser Arg Ala Ser Gln Arg Met Ile
 530 535 540
 Ser Phe Arg Ser Ser Lys Asn Asp Met Val Asn Arg Ser Glu Met Val
 545 550 555 560
 His Gln His Gly Arg Pro Ala Pro His Gly Ser Ala Cys Arg Glu Ser
 565 570 575

Ile Glu Val Pro Asp Lys Gln Phe Gly Leu Met Thr Glu Glu Leu Thr
 580 585 590
 Gln Leu Pro Ser Met Pro Asn Asn Pro Gln Arg Glu Lys Tyr Ile Pro
 595 600 605
 Gln Thr Gly Ser Cys Gln Leu Gln Ser Leu Glu His Asp Met Val Lys
 610 615 620
 Gly His Asn Leu Ala Gly Glu Leu His Lys Gln Val Thr Ser Pro Gln
 625 630 635 640
 Val Val Ile Gln Ser Asn Phe Cys Val Thr Pro Pro Asp Val Leu Gly
 645 650 655
 Arg Arg Thr Ser Gly Glu His Leu Arg Thr Leu Ile Ala Pro Thr His
 660 665 670
 Ala Ser Thr Cys Lys Asp Thr Leu Lys Ala Leu Ser Cys Gln Leu Glu
 675 680 685
 Ser Ser Arg Asp Ile Ile Arg Pro Pro Val Asn Pro Ile Gly Pro Ser
 690 695 700
 Ser Ala Asp Val Pro Arg Thr Asp Asn His Gln Val Lys Val Ser Glu
 705 710 715 720
 Glu Thr Val Thr Ala Lys Leu Pro Glu Lys Arg Lys Val Gly Arg Pro
 725 730 735
 Arg Lys Glu Leu Lys Pro Gly Glu Lys Pro Lys Pro Arg Gly Arg Pro
 740 745 750
 Arg Lys Gly Lys Val Val Gly Gly Glu Leu Ala Ser Lys Asp Ser His
 755 760 765
 Thr Asn Pro Leu Gln Asn Glu Ser Thr Ser Cys Ser Tyr Gly Pro Tyr
 770 775 780
 Ala Gly Glu Ala Ser Val Gly Arg Ala Val Lys Ala Asn Arg Val Gly
 785 790 795 800
 Glu Asn Ile Ser Gly Ala Met Val Ser Leu Leu Asp Ser Leu Asp Ile
 805 810 815
 Val Ile Gln Lys Ile Lys Val Leu Asp Ile Asn Lys Ser Glu Asp Pro
 820 825 830
 Val Thr Ala Glu Pro His Gly Ala Leu Val Pro Tyr Asn Gly Glu Phe
 835 840 845
 Gly Pro Ile Val Pro Phe Glu Gly Lys Val Lys Arg Lys Arg Ser Arg
 850 855 860
 Ala Lys Val Asp Leu Asp Pro Val Thr Ala Leu Met Trp Lys Leu Leu
 865 870 875 880
 Met Gly Pro Asp Met Ser Asp Cys Ala Glu Gly Met Asp Lys Asp Lys
 885 890 895
 Glu Lys Trp Leu Asn Glu Glu Arg Lys Ile Phe Gln Gly Arg Val Asp
 900 905 910

Ser Phe Ile Ala Arg Met His Leu Val Gln Gly Asp Arg Arg Phe Ser
 915 920 925
 Pro Trp Lys Gly Ser Val Val Asp Ser Val Val Gly Val Phe Leu Thr
 930 935 940
 Gln Asn Val Ser Asp His Leu Ser Ser Ser Ala Phe Met Ala Leu Ala
 945 950 955 960
 Ala Lys Phe Pro Val Lys Pro Glu Ala Ser Glu Lys Pro Ala Asn Val
 965 970 975
 Met Phe His Thr Ile Ser Glu Asn Gly Asp Cys Ser Gly Leu Phe Gly
 980 985 990
 Asn Ser Val Lys Leu Gln Gly Glu Ile Leu Val Gln Glu Ala Ser Asn
 995 1000 1005
 Thr Ala Ala Ser Phe Ile Thr Thr Glu Asp Lys Glu Gly Ser Asn
 1010 1015 1020
 Ser Val Glu Leu Leu Gly Ser Ser Phe Gly Asp Gly Val Asp Gly
 1025 1030 1035
 Ala Ala Gly Val Tyr Ser Asn Ile Tyr Glu Asn Leu Pro Ala Arg
 1040 1045 1050
 Leu His Ala Thr Arg Arg Pro Val Val Gln Thr Gly Asn Ala Val
 1055 1060 1065
 Glu Ala Glu Asp Gly Ser Leu Glu Gly Val Val Ser Ser Glu Asn
 1070 1075 1080
 Ser Thr Ile Ser Ser Gln Asn Ser Ser Asp Tyr Leu Phe His Met
 1085 1090 1095
 Ser Asp His Met Phe Ser Ser Met Leu Leu Asn Phe Thr Ala Glu
 1100 1105 1110
 Asp Ile Gly Ser Arg Asn Met Pro Lys Ala Thr Arg Thr Thr Tyr
 1115 1120 1125
 Thr Glu Leu Leu Arg Met Gln Glu Leu Lys Asn Lys Ser Asn Glu
 1130 1135 1140
 Thr Ile Glu Ser Ser Glu Tyr His Gly Val Pro Val Ser Cys Ser
 1145 1150 1155
 Asn Asn Ile Gln Val Leu Asn Gly Ile Gln Asn Ile Gly Ser Lys
 1160 1165 1170
 His Gln Pro Leu His Ser Ser Ile Ser Tyr His Gln Thr Gly Gln
 1175 1180 1185
 Val His Leu Pro Asp Ile Val His Ala Ser Asp Leu Glu Gln Ser
 1190 1195 1200
 Val Tyr Thr Gly Leu Asn Arg Val Leu Asp Ser Asn Val Thr Gln
 1205 1210 1215
 Thr Ser Tyr Tyr Pro Ser Pro His Pro Gly Ile Ala Cys Asn Asn
 1220 1225 1230

| | | | |
|-----------------|-----------------------------|-----------------------------|-------------|
| Glu Thr
1235 | Gln Lys Ala Asp Ser
1240 | Leu Ser Asn Met Leu
1245 | Tyr Gly Ile |
| Asp Arg
1250 | Ser Asp Lys Thr Thr
1255 | Ser Leu Ser Glu Pro
1260 | Thr Pro Arg |
| Ile Asp
1265 | Asn Cys Phe Gln Pro
1270 | Leu Ser Ser Glu Lys
1275 | Met Ser Phe |
| Ala Arg
1280 | Glu Gln Ser Ser Ser
1285 | Glu Asn Tyr Leu Ser
1290 | Arg Asn Glu |
| Ala Glu
1295 | Ala Ala Phe Val Lys
1300 | Gln His Gly Thr Ser
1305 | Asn Val Gln |
| Gly Asp
1310 | Asn Thr Val Arg Thr
1315 | Glu Gln Asn Gly Gly
1320 | Glu Asn Ser |
| Gln Ser
1325 | Gly Tyr Ser Gln Gln
1330 | Asp Asp Asn Val Gly
1335 | Phe Gln Thr |
| Ala Thr
1340 | Thr Ser Asn Leu Tyr
1345 | Ser Ser Asn Leu Cys
1350 | Gln Asn Gln |
| Lys Ala
1355 | Asn Ser Glu Val Leu
1360 | His Gly Val Ser Ser
1365 | Asn Leu Ile |
| Glu Asn
1370 | Ser Lys Asp Asp Lys
1375 | Lys Thr Ser Pro Lys
1380 | Val Pro Val |
| Asp Gly
1385 | Ser Lys Ala Lys Arg
1390 | Pro Arg Val Gly Ala
1395 | Gly Lys Lys |
| Lys Thr
1400 | Tyr Asp Trp Asp Met
1405 | Leu Arg Lys Glu Val
1410 | Leu Tyr Ser |
| His Gly
1415 | Asn Lys Glu Arg Ser
1420 | Gln Asn Ala Lys Asp
1425 | Ser Ile Asp |
| Trp Glu
1430 | Thr Ile Arg Gln Ala
1435 | Glu Val Lys Glu Ile
1440 | Ser Asp Thr |
| Ile Arg
1445 | Glu Arg Gly Met Asn
1450 | Asn Met Leu Ala Glu
1455 | Arg Ile Lys |
| Asp Phe
1460 | Leu Asn Arg Leu Val
1465 | Arg Asp His Gly Ser
1470 | Ile Asp Leu |
| Glu Trp
1475 | Leu Arg Tyr Val Asp
1480 | Ser Asp Lys Ala Lys
1485 | Asp Tyr Leu |
| Leu Ser
1490 | Ile Arg Gly Leu Gly
1495 | Leu Lys Ser Val Glu
1500 | Cys Val Arg |
| Leu Leu
1505 | Thr Leu His His Met
1510 | Ala Phe Pro Val Asp
1515 | Thr Asn Val |
| Gly Arg
1520 | Ile Cys Val Arg Leu
1525 | Gly Trp Val Pro Leu
1530 | Gln Pro Leu |
| Pro Glu
1535 | Ser Leu Gln Leu His
1540 | Leu Leu Glu Met Tyr
1545 | Pro Met Leu |

| | | | |
|-----------------|-----------------------------|-----------------------------|-------------|
| Glu Asn
1550 | Ile Gln Lys Tyr Leu
1555 | Trp Pro Arg Leu Cys
1560 | Lys Leu Asp |
| Gln Arg
1565 | Thr Leu Tyr Glu Leu
1570 | His Tyr Gln Met Ile
1575 | Thr Phe Gly |
| Lys Val
1580 | Phe Cys Thr Lys Ser
1585 | Lys Pro Asn Cys Asn
1590 | Ala Cys Pro |
| Met Arg
1595 | Ala Glu Cys Lys His
1600 | Phe Ala Ser Ala Phe
1605 | Ala Ser Ala |
| Arg Leu
1610 | Ala Leu Pro Gly Pro
1615 | Glu Glu Lys Ser Leu
1620 | Val Thr Ser |
| Gly Thr
1625 | Pro Ile Ala Ala Glu
1630 | Thr Phe His Gln Thr
1635 | Tyr Ile Ser |
| Ser Arg
1640 | Pro Val Val Ser Gln
1645 | Leu Glu Trp Asn Ser
1650 | Asn Thr Cys |
| His His
1655 | Gly Met Asn Asn Arg
1660 | Gln Pro Ile Ile Glu
1665 | Glu Pro Ala |
| Ser Pro
1670 | Glu Pro Glu His Glu
1675 | Thr Glu Glu Met Lys
1680 | Glu Cys Ala |
| Ile Glu
1685 | Asp Ser Phe Val Asp
1690 | Asp Pro Glu Glu Ile
1695 | Pro Thr Ile |
| Lys Leu
1700 | Asn Phe Glu Glu Phe
1705 | Thr Gln Asn Leu Lys
1710 | Ser Tyr Met |
| Gln Ala
1715 | Asn Asn Ile Glu Ile
1720 | Glu Asp Ala Asp Met
1725 | Ser Lys Ala |
| Leu Val
1730 | Ala Ile Thr Pro Glu
1735 | Val Ala Ser Ile Pro
1740 | Thr Pro Lys |
| Leu Lys
1745 | Asn Val Ser Arg Leu
1750 | Arg Thr Glu His Gln
1755 | Val Tyr Glu |
| Leu Pro
1760 | Asp Ser His Pro Leu
1765 | Leu Glu Gly Phe Asn
1770 | Gln Arg Glu |
| Pro Asp
1775 | Asp Pro Cys Pro Tyr
1780 | Leu Leu Ser Ile Trp
1785 | Thr Pro Gly |
| Glu Thr
1790 | Ala Gln Ser Thr Asp
1795 | Ala Pro Lys Ser Val
1800 | Cys Asn Ser |
| Gln Glu
1805 | Asn Gly Glu Leu Cys
1810 | Ala Ser Asn Thr Cys
1815 | Phe Ser Cys |
| Asn Ser
1820 | Ile Arg Glu Ala Gln
1825 | Ala Gln Lys Val Arg
1830 | Gly Thr Leu |
| Leu Ile
1835 | Pro Cys Arg Thr Ala
1840 | Met Arg Gly Ser Phe
1845 | Pro Leu Asn |
| Gly Thr
1850 | Tyr Phe Gln Val Asn
1855 | Glu Cys Ser Asn Val
1860 | Met Arg Gln |

Val Phe Ala Asp His Asp Ser Ser Arg Asn Pro Ile Asp Val Pro
 1865 1870 1875

Arg Ser Trp Ile Trp Asn Leu Pro Arg Arg Thr Val Tyr Phe Gly
 1880 1885 1890

Thr Ser Ile Pro Thr Ile Phe Lys Gly Leu Thr Thr Glu Glu Ile
 1895 1900 1905

Gln His Cys Phe Trp Arg Gly Phe Val Cys Val Arg Gly Phe Asp
 1910 1915 1920

Arg Thr Ser Arg Ala Pro Arg Pro Leu Tyr Ala Arg Leu His Phe
 1925 1930 1935

Pro Ala Ser Lys Ile Thr Arg Asn Lys Lys Ser Ala Gly Ser Ala
 1940 1945 1950

Pro Gly Arg Asp Asp Glu
 1955

<210> 2

<211> 1952

<212> PRT

<213> Oryza sativa

<400> 2

Met Gln Asp Phe Gly Gln Trp Leu Pro Gln Ser Gln Thr Thr Ala Asp
 1 5 10 15

Leu Tyr Phe Ser Ser Ile Pro Ile Pro Ser Gln Phe Asp Thr Ser Ile
 20 25 30

Glu Thr Gln Thr Arg Thr Ser Ala Val Val Ser Ser Glu Lys Glu Ser
 35 40 45

Ala Asn Ser Phe Val Pro His Asn Gly Thr Gly Leu Val Glu Arg Ile
 50 55 60

Ser Asn Asp Ala Gly Leu Thr Glu Val Val Gly Ser Ser Ala Gly Pro
 65 70 75 80

Thr Glu Cys Ile Asp Leu Asn Lys Thr Pro Ala Arg Lys Pro Lys Lys
 85 90 95

Lys Lys His Arg Pro Lys Val Leu Lys Asp Asp Lys Pro Ser Lys Thr
 100 105 110

Pro Lys Ser Ala Thr Pro Ile Pro Ser Thr Glu Lys Val Glu Lys Pro
 115 120 125

Ser Gly Lys Arg Lys Tyr Val Arg Lys Lys Thr Ser Pro Gly Gln Pro
 130 135 140

Pro Ala Glu Gln Ala Ala Ser Ser His Cys Arg Ser Glu Leu Lys Ser
 145 150 155 160

Val Lys Arg Ser Leu Asp Phe Gly Gly Glu Val Leu Gln Glu Ser Thr
 165 170 175

Gln Ser Gly Ser Gln Val Pro Val Ala Glu Ile Cys Thr Gly Pro Lys
 180 185 190

Arg Gln Ser Ile Pro Ser Thr Ile Gln Arg Asp Ser Gln Ser Gln Leu

| 195 | | | | | 200 | | | | | 205 | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ala | Cys | His | Val | Val | Ser | Ser | Thr | Ser | Ser | Ile | His | Thr | Ser | Ala | Ser |
| 210 | | | | | | 215 | | | | | 220 | | | | |
| Gln | Met | Val | Asn | Ala | His | Leu | Phe | Pro | Pro | Asp | Asn | Met | Pro | Asn | Gly |
| 225 | | | | | 230 | | | | | 235 | | | | | 240 |
| Val | Leu | Leu | Asp | Leu | Asn | Asn | Ser | Thr | Ser | Gln | Leu | Gln | Asn | Glu | His |
| 245 | | | | | 250 | | | | | 255 | | | | | |
| Ala | Lys | Phe | Val | Asp | Ser | Pro | Ala | Arg | Leu | Phe | Gly | Ser | Arg | Ile | Arg |
| | | | 260 | | | | | 265 | | | | | 270 | | |
| Gln | Thr | Ser | Gly | Lys | Asn | Ser | Leu | Leu | Glu | Ile | Tyr | Ala | Gly | Met | Ser |
| | | 275 | | | | | 280 | | | | | 285 | | | |
| Asp | Arg | Asn | Val | Pro | Asp | Leu | Asn | Ser | Ser | Ile | Ser | Gln | Thr | His | Ser |
| 290 | | | | | 295 | | | | | 300 | | | | | |
| Met | Ser | Thr | Asp | Phe | Ala | Gln | Tyr | Leu | Leu | Ser | Ser | Ser | Gln | Ala | Ser |
| 305 | | | | | 310 | | | | | 315 | | | | | 320 |
| Val | Arg | Glu | Thr | Gln | Met | Ala | Asn | Gln | Met | Leu | Asn | Gly | His | Arg | Met |
| | | | | 325 | | | | | 330 | | | | | 335 | |
| Pro | Glu | Asn | Pro | Ile | Thr | Pro | Ser | His | Cys | Ile | Glu | Arg | Ala | Ala | Leu |
| | | | 340 | | | | | 345 | | | | | 350 | | |
| Lys | Glu | His | Leu | Asn | His | Val | Pro | His | Ala | Lys | Ala | Ala | Val | Met | Asn |
| | | 355 | | | | | 360 | | | | | 365 | | | |
| Gly | Gln | Met | Pro | His | Ser | Tyr | Arg | Leu | Ala | Gln | Asn | Pro | Ile | Leu | Pro |
| | 370 | | | | | 375 | | | | | 380 | | | | |
| Pro | Asn | His | Ile | Glu | Gly | Tyr | Gln | Val | Met | Glu | Asn | Leu | Ser | Glu | Leu |
| 385 | | | | | 390 | | | | | 395 | | | | | 400 |
| Val | Thr | Thr | Asn | Asp | Tyr | Leu | Thr | Ala | Ser | Pro | Phe | Ser | Gln | Thr | Gly |
| | | | | 405 | | | | | 410 | | | | | 415 | |
| Ala | Ala | Asn | Arg | Gln | His | Asn | Ile | Gly | Asp | Ser | Met | His | Ile | His | Ala |
| | | | 420 | | | | | 425 | | | | | 430 | | |
| Leu | Asp | Pro | Arg | Arg | Glu | Ser | Asn | Ala | Ser | Ser | Gly | Ser | Trp | Ile | Ser |
| | | 435 | | | | | 440 | | | | | 445 | | | |
| Leu | Gly | Val | Asn | Phe | Asn | Gln | Gln | Asn | Asn | Gly | Trp | Ala | Ser | Ala | Gly |
| | 450 | | | | | 455 | | | | | 460 | | | | |
| Ala | Ala | Asp | Ala | Ala | Ser | Ser | His | Ala | Pro | Tyr | Phe | Ser | Glu | Pro | His |
| 465 | | | | | 470 | | | | | 475 | | | | | 480 |
| Lys | Arg | Met | Arg | Thr | Ala | Tyr | Leu | Asn | Asn | Tyr | Pro | Asn | Gly | Val | Val |
| | | | | 485 | | | | | 490 | | | | | 495 | |
| Gly | His | Phe | Ser | Thr | Ser | Ser | Thr | Asp | Leu | Ser | Asn | Asn | Glu | Asn | Glu |
| 500 | | | | | 505 | | | | | 510 | | | | | |
| Asn | Val | Ala | Ser | Ala | Ile | Asn | Ser | Asn | Val | Phe | Thr | Leu | Ala | Asp | Ala |
| | | 515 | | | | | 520 | | | | | 525 | | | |
| Gln | Arg | Leu | Ile | Ala | Arg | Glu | Lys | Ser | Arg | Ala | Ser | Gln | Arg | Met | Ile |

| | | | | |
|---------------------|-------------------------|-------------------------|--|-----|
| 530 | | 535 | | 540 |
| Ser Phe Arg Ser Ser | Lys Asn Asp Met Val | Asn Arg Ser Glu Met Val | | |
| 545 | 550 | 555 | | 560 |
| His Gln His Gly Arg | Pro Ala Pro His Gly | Ser Ala Cys Arg Glu Ser | | |
| | 565 | 570 | | 575 |
| Ile Glu Val Pro Asp | Lys Gln Phe Gly Leu Met | Thr Glu Glu Leu Thr | | |
| | 580 | 585 | | 590 |
| Gln Leu Pro Ser Met | Pro Asn Asn Pro Gln Arg | Glu Lys Tyr Ile Pro | | |
| | 595 | 600 | | 605 |
| Gln Thr Gly Ser Cys | Gln Leu Gln Ser Leu Glu | His Asp Met Val Lys | | |
| | 610 | 615 | | 620 |
| Gly His Asn Leu Ala | Gly Glu Leu His Lys Gln | Val Thr Ser Pro Gln | | |
| 625 | 630 | 635 | | 640 |
| Val Val Ile Gln Ser | Asn Phe Cys Val Thr Pro | Pro Asp Val Leu Gly | | |
| | 645 | 650 | | 655 |
| Arg Arg Thr Ser Gly | Glu His Leu Arg Thr Leu | Ile Ala Pro Thr His | | |
| 660 | 665 | 670 | | |
| Ala Ser Thr Cys Lys | Asp Thr Leu Lys Ala Leu | Ser Cys Gln Leu Glu | | |
| 675 | 680 | 685 | | |
| Ser Ser Arg Asp Ile | Ile Arg Pro Pro Val Asn | Pro Ile Gly Pro Ser | | |
| | 690 | 695 | | 700 |
| Ser Ala Asp Val Pro | Arg Thr Asp Asn His Gln | Val Lys Val Ser Glu | | |
| 705 | 710 | 715 | | 720 |
| Glu Thr Val Thr Ala | Lys Leu Pro Glu Lys Arg | Lys Val Gly Arg Pro | | |
| | 725 | 730 | | 735 |
| Arg Lys Glu Leu Lys | Pro Gly Glu Lys Pro Lys | Pro Arg Gly Arg Pro | | |
| | 740 | 745 | | 750 |
| Arg Lys Gly Lys Val | Val Gly Gly Glu Leu Ala | Ser Lys Asp Ser His | | |
| | 755 | 760 | | 765 |
| Thr Asn Pro Leu Gln | Asn Glu Ser Thr Ser Cys | Ser Tyr Gly Pro Tyr | | |
| | 770 | 775 | | 780 |
| Ala Gly Glu Ala Ser | Val Gly Arg Ala Val Lys | Ala Asn Arg Val Gly | | |
| 785 | 790 | 795 | | 800 |
| Glu Asn Ile Ser Gly | Ala Met Val Ser Leu Leu | Asp Ser Leu Asp Ile | | |
| | 805 | 810 | | 815 |
| Val Ile Gln Lys Ile | Lys Val Leu Asp Ile Asn | Lys Ser Glu Asp Pro | | |
| 820 | 825 | 830 | | |
| Val Thr Ala Glu Pro | His Gly Ala Leu Val Pro | Tyr Asn Gly Glu Phe | | |
| | 835 | 840 | | 845 |
| Gly Pro Ile Val Pro | Phe Glu Gly Lys Val Lys | Arg Lys Arg Ser Arg | | |
| 850 | 855 | 860 | | |
| Ala Lys Val Asp Leu | Asp Pro Val Thr Ala Leu | Met Trp Lys Leu Leu | | |

| | | | | | | |
|---|---|-----|------|-----|------|-----|
| 865 | | 870 | | 875 | | 880 |
| Met Gly Pro Asp | Met Ser Asp Cys Ala Glu Gly Met Asp Lys Asp Lys | | | | | |
| | 885 | | 890 | | 895 | |
| Glu Lys Trp Leu Asn Glu Glu Arg Lys Ile Phe Gln Gly Arg Val Asp | | | | | | |
| | 900 | | 905 | | 910 | |
| Ser Phe Ile Ala Arg Met His Leu Val Gln Gly Asp Arg Arg Phe Ser | | | | | | |
| | 915 | | 920 | | 925 | |
| Pro Trp Lys Gly Ser Val Val Asp Ser Val Val Gly Val Phe Leu Thr | | | | | | |
| | 930 | | 935 | | 940 | |
| Gln Asn Val Ser Asp His Leu Ser Ser Ser Ala Phe Met Ala Leu Ala | | | | | | |
| | 945 | | 950 | | 955 | 960 |
| Ala Lys Phe Pro Val Lys Pro Glu Ala Ser Glu Lys Pro Ala Asn Val | | | | | | |
| | 965 | | 970 | | 975 | |
| Met Phe His Thr Ile Ser Glu Asn Gly Asp Cys Ser Gly Leu Phe Gly | | | | | | |
| | 980 | | 985 | | 990 | |
| Asn Ser Val Lys Leu Gln Gly Glu Ile Leu Val Gln Glu Ala Ser Asn | | | | | | |
| | 995 | | 1000 | | 1005 | |
| Thr Ala Ala Ser Phe Ile Thr Thr Glu Asp Lys Glu Gly Ser Asn | | | | | | |
| | 1010 | | 1015 | | 1020 | |
| Ser Val Glu Leu Leu Gly Ser Ser Phe Gly Asp Gly Val Asp Gly | | | | | | |
| | 1025 | | 1030 | | 1035 | |
| Ala Ala Gly Val Tyr Ser Asn Ile Tyr Glu Asn Leu Pro Ala Arg | | | | | | |
| | 1040 | | 1045 | | 1050 | |
| Leu His Ala Thr Arg Arg Pro Val Val Gln Thr Gly Asn Ala Val | | | | | | |
| | 1055 | | 1060 | | 1065 | |
| Glu Ala Glu Asp Gly Ser Leu Glu Gly Val Val Ser Ser Glu Asn | | | | | | |
| | 1070 | | 1075 | | 1080 | |
| Ser Thr Ile Ser Ser Gln Asn Ser Ser Asp Tyr Leu Phe His Met | | | | | | |
| | 1085 | | 1090 | | 1095 | |
| Ser Asp His Met Phe Ser Ser Met Leu Leu Asn Phe Thr Ala Glu | | | | | | |
| | 1100 | | 1105 | | 1110 | |
| Asp Ile Gly Ser Arg Asn Met Pro Lys Ala Thr Arg Thr Thr Tyr | | | | | | |
| | 1115 | | 1120 | | 1125 | |
| Thr Glu Leu Leu Arg Met Gln Glu Leu Lys Asn Lys Ser Asn Glu | | | | | | |
| | 1130 | | 1135 | | 1140 | |
| Thr Ile Glu Ser Ser Glu Tyr His Gly Val Pro Val Ser Cys Ser | | | | | | |
| | 1145 | | 1150 | | 1155 | |
| Asn Asn Ile Gln Val Leu Asn Gly Ile Gln Asn Ile Gly Ser Lys | | | | | | |
| | 1160 | | 1165 | | 1170 | |
| His Gln Pro Leu His Ser Ser Ile Ser Tyr His Gln Thr Gly Gln | | | | | | |
| | 1175 | | 1180 | | 1185 | |
| Val His Leu Pro Asp Ile Val His Ala Ser Asp Leu Glu Gln Ser | | | | | | |

| | | | | |
|-----------------------------|---------------------|-------------|--|------|
| 1190 | | 1195 | | 1200 |
| Val Tyr Thr Gly Leu Asn Arg | Val Leu Asp Ser Asn | Val Thr Gln | | |
| 1205 | 1210 | 1215 | | |
| Thr Ser Tyr Tyr Pro Ser Pro | His Pro Gly Ile Ala | Cys Asn Asn | | |
| 1220 | 1225 | 1230 | | |
| Glu Thr Gln Lys Ala Asp Ser | Leu Ser Asn Met Leu | Tyr Gly Ile | | |
| 1235 | 1240 | 1245 | | |
| Asp Arg Ser Asp Lys Thr Thr | Ser Leu Ser Glu Pro | Thr Pro Arg | | |
| 1250 | 1255 | 1260 | | |
| Ile Asp Asn Cys Phe Gln Pro | Leu Ser Ser Glu Lys | Met Ser Phe | | |
| 1265 | 1270 | 1275 | | |
| Ala Arg Glu Gln Ser Ser Ser | Glu Asn Tyr Leu Ser | Arg Asn Glu | | |
| 1280 | 1285 | 1290 | | |
| Ala Glu Ala Ala Phe Val Lys | Gln His Gly Thr Ser | Asn Val Gln | | |
| 1295 | 1300 | 1305 | | |
| Gly Asp Asn Thr Val Arg Thr | Glu Gln Asn Gly Gly | Glu Asn Ser | | |
| 1310 | 1315 | 1320 | | |
| Gln Ser Gly Tyr Ser Gln Gln | Asp Asp Asn Val Gly | Phe Gln Thr | | |
| 1325 | 1330 | 1335 | | |
| Ala Thr Thr Ser Asn Leu Tyr | Ser Ser Asn Leu Cys | Gln Asn Gln | | |
| 1340 | 1345 | 1350 | | |
| Lys Ala Asn Ser Glu Val Leu | His Gly Val Ser Ser | Asn Leu Ile | | |
| 1355 | 1360 | 1365 | | |
| Glu Asn Ser Lys Asp Asp Lys | Lys Thr Ser Pro Lys | Val Pro Val | | |
| 1370 | 1375 | 1380 | | |
| Asp Gly Ser Lys Ala Lys Arg | Pro Arg Val Gly Ala | Gly Lys Lys | | |
| 1385 | 1390 | 1395 | | |
| Lys Thr Tyr Asp Trp Asp Met | Leu Arg Lys Glu Val | Leu Tyr Ser | | |
| 1400 | 1405 | 1410 | | |
| His Gly Asn Lys Glu Arg Ser | Gln Asn Ala Lys Asp | Ser Ile Asp | | |
| 1415 | 1420 | 1425 | | |
| Trp Glu Thr Ile Arg Gln Ala | Glu Val Lys Glu Ile | Ser Asp Thr | | |
| 1430 | 1435 | 1440 | | |
| Ile Arg Glu Arg Gly Met Asn | Asn Met Leu Ala Glu | Arg Ile Lys | | |
| 1445 | 1450 | 1455 | | |
| Asp Phe Leu Asn Arg Leu Val | Arg Asp His Gly Ser | Ile Asp Leu | | |
| 1460 | 1465 | 1470 | | |
| Glu Trp Leu Arg Tyr Val Asp | Ser Asp Lys Ala Lys | Asp Tyr Leu | | |
| 1475 | 1480 | 1485 | | |
| Leu Ser Ile Arg Gly Leu Gly | Leu Lys Ser Val Glu | Cys Val Arg | | |
| 1490 | 1495 | 1500 | | |
| Leu Leu Thr Leu His His Met | Ala Phe Pro Val Asp | Thr Asn Val | | |

| 1505 | 1510 | 1515 |
|-------------------------------------|-----------------------------|---------------------|
| Gly Arg Ile Cys Val Arg Leu
1520 | Gly Trp Val Pro Leu
1525 | Gln Pro Leu
1530 |
| Pro Glu Ser Leu Gln Leu His
1535 | Leu Leu Glu Met Tyr
1540 | Pro Met Leu
1545 |
| Glu Asn Ile Gln Lys Tyr Leu
1550 | Trp Pro Arg Leu Cys
1555 | Lys Leu Asp
1560 |
| Gln Arg Thr Leu Tyr Glu Leu
1565 | His Tyr Gln Met Ile
1570 | Thr Phe Gly
1575 |
| Lys Val Phe Cys Thr Lys Ser
1580 | Lys Pro Asn Cys Asn
1585 | Ala Cys Pro
1590 |
| Met Arg Ala Glu Cys Lys His
1595 | Phe Ala Ser Ala Phe
1600 | Ala Ser Ala
1605 |
| Arg Leu Ala Leu Pro Gly Pro
1610 | Glu Glu Lys Ser Leu
1615 | Val Thr Ser
1620 |
| Gly Thr Pro Ile Ala Ala Glu
1625 | Thr Phe His Gln Thr
1630 | Tyr Ile Ser
1635 |
| Ser Arg Pro Val Val Ser Gln
1640 | Leu Glu Trp Asn Ser
1645 | Asn Thr Cys
1650 |
| His His Gly Met Asn Asn Arg
1655 | Gln Pro Ile Ile Glu
1660 | Glu Pro Ala
1665 |
| Ser Pro Glu Pro Glu His Glu
1670 | Thr Glu Glu Met Lys
1675 | Glu Cys Ala
1680 |
| Ile Glu Asp Ser Phe Val Asp
1685 | Asp Pro Glu Glu Ile
1690 | Pro Thr Ile
1695 |
| Lys Leu Asn Phe Glu Glu Phe
1700 | Thr Gln Asn Leu Lys
1705 | Ser Tyr Met
1710 |
| Gln Ala Asn Asn Ile Glu Ile
1715 | Glu Asp Ala Asp Met
1720 | Ser Lys Ala
1725 |
| Leu Val Ala Ile Thr Pro Glu
1730 | Val Ala Ser Ile Pro
1735 | Thr Pro Lys
1740 |
| Leu Lys Asn Val Ser Arg Leu
1745 | Arg Thr Glu His Gln
1750 | Val Tyr Glu
1755 |
| Leu Pro Asp Ser His Pro Leu
1760 | Leu Glu Gly Phe Asn
1765 | Gln Arg Glu
1770 |
| Pro Asp Asp Pro Cys Pro Tyr
1775 | Leu Leu Ser Ile Trp
1780 | Thr Pro Gly
1785 |
| Glu Thr Ala Gln Ser Thr Asp
1790 | Ala Pro Lys Ser Val
1795 | Cys Asn Ser
1800 |
| Gln Glu Asn Gly Glu Leu Cys
1805 | Ala Ser Asn Thr Cys
1810 | Phe Ser Cys
1815 |
| Asn Ser Ile Arg Glu Ala Gln
1820 | Ala Gln Lys Val Arg
1825 | Gly Thr Leu
1830 |

| | | |
|---|------|---------|
| 1820 | 1825 | 1830 |
| Leu Ile Pro Cys Arg Thr Ala Met Arg Gly Ser Phe Pro Leu Asn | | |
| 1835 | 1840 | 1845 |
| Gly Thr Tyr Phe Gln Val Asn Glu Val Phe Ala Asp His Asp Ser | | |
| 1850 | 1855 | 1860 |
| Ser Arg Asn Pro Ile Asp Val Pro Arg Ser Trp Ile Trp Asn Leu | | |
| 1865 | 1870 | 1875 |
| Pro Arg Arg Thr Val Tyr Phe Gly Thr Ser Ile Pro Thr Ile Phe | | |
| 1880 | 1885 | 1890 |
| Lys Gly Leu Thr Thr Glu Glu Ile Gln His Cys Phe Trp Arg Gly | | |
| 1895 | 1900 | 1905 |
| Phe Val Cys Val Arg Gly Phe Asp Arg Thr Ser Arg Ala Pro Arg | | |
| 1910 | 1915 | 1920 |
| Pro Leu Tyr Ala Arg Leu His Phe Pro Ala Ser Lys Ile Thr Arg | | |
| 1925 | 1930 | 1935 |
| Asn Lys Lys Ser Ala Gly Ser Ala Pro Gly Arg Asp Asp Glu | | |
| 1940 | 1945 | 1950 |
| <210> 3 | | |
| <211> 1636 | | |
| <212> PRT | | |
| <213> Oryza sativa | | |
| <400> 3 | | |
| Met Glu Gly Gln Trp Leu His Glu Pro His Gly Ile Asn Leu Cys Phe | | |
| 1 | 5 | 10 15 |
| Ser Thr Ser Ser Thr Leu Pro Arg Met Asn Pro Ser Ile Glu Thr Gly | | |
| | 20 | 25 30 |
| Thr Arg Asn Val Thr His Val Pro Ser Lys Asn Val Ser Thr Ser Ser | | |
| | 35 | 40 45 |
| Ser Gln Ala Arg Lys Thr Thr Val Gln Lys Pro Lys Arg Lys Arg His | | |
| | 50 | 55 60 |
| Arg Pro Lys Val Ile Lys Glu Gly Lys Ala Thr Gln Ala His Lys Ser | | |
| 65 | 70 | 75 80 |
| Thr Thr Ser Glu Pro Pro Lys Glu Lys Asp Lys Pro Ala Gly Lys Arg | | |
| | 85 | 90 95 |
| Lys Tyr Val Arg Arg Lys Glu Gln Asn Thr Thr Pro Thr Glu His His | | |
| | 100 | 105 110 |
| Pro Pro Ser Lys Asp Ala Val Ala His Thr Ile Val Val Pro Thr Leu | | |
| | 115 | 120 125 |
| Ala Lys Arg Cys Phe Asn Phe Asp Gly Arg Asp His His Glu Glu Asn | | |
| | 130 | 135 140 |
| Val Asp Leu Leu Ser Gln Thr Arg Val Glu Glu Thr Pro Thr Cys Tyr | | |
| 145 | 150 | 155 160 |
| Gly Asp Ala Gln Leu Leu Thr Ser Ala Val Asp Gly Ser Asn Ile Gln | | |
| | 165 | 170 175 |

Leu Val Gln Pro Trp Cys Gly Ile Gly Ser Pro Ile Phe Ala Ser Val
 180 185 190
 Asp Pro Met Ala Asn Met Arg Gln Ile Trp Ala Glu Ser Ser Arg Ala
 195 200 205
 Asn Arg Val Thr Phe Asp Leu Asn Asn Ser Ala Val Asn His Ile Pro
 210 215 220
 Arg Arg Phe Ser Asn Pro Thr Asn Ser Tyr Gly Gln Asn Phe Gln Phe
 225 230 235 240
 Gly Ser Arg Glu Gln Ile Asn Gln Tyr Gln His Phe Tyr Asp Asp Asp
 245 250 255
 Ile Pro Asp Glu Ile Pro Glu Asn Leu Val Val Pro Ala Trp His Thr
 260 265 270
 Gly Arg Thr Trp Met Val Gly Asn Phe Asn His Glu Ala Ser Thr Arg
 275 280 285
 Val Val Asn Pro Met Pro Gln Gly Tyr Arg Val Pro Gln Ser Pro Ser
 290 295 300
 Glu Pro Pro Thr Cys Ser Glu Arg Asn Thr Thr Asn Ile Asn Leu Ser
 305 310 315 320
 Glu Phe Pro Ala Lys Asn Asp Gln Ser Lys Phe Ala Thr Asn Pro Asn
 325 330 335
 Asp Gln Ile Gly Ala Ser Phe Gly Leu Cys Asp Ser His Phe Ser Asp
 340 345 350
 Val His Ala Ile Gly Lys Lys Arg Gly Tyr Asp Thr Ile Thr Asp His
 355 360 365
 Gln Val Ser Phe Asp Ala Tyr Leu Glu Gln Ser Asn Ser Arg Arg Gln
 370 375 380
 Phe Tyr Ser Asp Pro Leu Ser Thr Ser Ser Glu Thr Tyr Leu Leu Thr
 385 390 395 400
 Glu Thr Cys Lys Arg Met Arg Ser Glu Asn His Ser Ser Trp Leu Asp
 405 410 415
 Gly Phe Ile Gly Asn Val Ser Ser Thr Ser Ala Asn Leu Ser Gly Asn
 420 425 430
 Trp Asn Thr Asn Asn Val Leu Ala Ile Asn His Gly Val Cys Thr Thr
 435 440 445
 Leu Ala Asp Val Gln Arg Ser Met Ala Leu Glu Glu Ser Arg Ser Ser
 450 455 460
 Arg Gln Tyr Thr Asp Pro Thr Leu Pro Cys Thr Ser Asn Thr His Phe
 465 470 475 480
 Ile Gly Ser Cys Ala Gln His Thr Asn Ser Pro Asp Ser Ala Met Asn
 485 490 495
 Ser Leu Gly Glu Asn Ile Gly His Arg Asn Gly Asp His Gln Leu Glu
 500 505 510

Ser Leu Glu Ile Arg Pro Thr Gln His Tyr Thr Ser Glu Cys Leu Gly
 515 520 525
 Leu Pro Asn Glu Trp Ser Gly His Leu Ser Ala Gly His Thr His Leu
 530 535 540
 Pro Asn Glu Thr Met Ile Pro Ser Ile Asn Lys Asn Trp Ser Cys Ser
 545 550 555 560
 Val Ala Trp Ala Ala Ser Ala Ala Gln Pro Thr Ala Thr Val Ser Gln
 565 570 575
 Val Ala Ser Ala Ala Ala Ala Thr Ser Thr Ala Gln Pro Ser Glu Gln
 580 585 590
 Arg Asp Tyr Ile Pro Ser Ser Gly Val His Gln Pro Gln Pro Leu Glu
 595 600 605
 Asn Gln Met Val Lys Gly Gln Asp Leu Cys Gln Thr His Lys Thr Ser
 610 615 620
 Thr Lys Tyr Val Ala Asp Gly Asn Pro Ser Ile Asn Thr Pro Val Glu
 625 630 635 640
 His Ile Gln Arg Thr Pro Ile Glu Val Met Ser Ser Phe Gln Ser Val
 645 650 655
 Asn Arg Pro Ala Thr Thr Lys Asn Cys His Leu Glu Ala Ser Arg Glu
 660 665 670
 Thr Thr Ser Ala Asn Pro Thr Glu Lys Pro Lys Val Trp Ser Arg Pro
 675 680 685
 Arg Lys Glu Val Glu Pro Val Gly Lys Pro Lys Ala Arg Gly His Pro
 690 695 700
 Lys Lys Gln Ala Glu Pro Asp Glu Lys Pro Lys Ala Arg Gly Arg Val
 705 710 715 720
 Arg Lys Thr Thr Glu Ala Asn Gly Lys Ala Glu Asp Arg Asp Pro Thr
 725 730 735
 Met Lys Glu Asn Asp Glu Ala Ile Ile Glu Lys Leu Lys Leu Leu Ser
 740 745 750
 Ile Asn Met Thr Ser Asn Asn Thr Val Glu Glu Thr Pro Lys Asp Leu
 755 760 765
 Gly Ala Leu Val Pro Leu Glu Gly Lys Val Lys Lys Arg Gly Ser Arg
 770 775 780
 Ala Glu Val Lys Ile Asp Pro Val Thr Asn Leu Met Trp Asn Leu Leu
 785 790 795 800
 Met Ala Leu Asp Lys Cys Glu Gly Val Glu Gly Ile Asp Glu Asp Lys
 805 810 815
 Glu Arg Leu Leu Glu Glu Glu Arg Arg Met Phe Arg Gly Arg Ile Asp
 820 825 830
 Ser Phe Ile Ala His Met His Leu Val Gln Gly Asp Arg Arg Phe Ser
 835 840 845

Pro Trp Lys Gly Ser Ile Val Asp Ser Val Val Asp Val Phe Leu Thr
 850 855 860
 Gln Asn Val Ser Asp His Leu Ser Ser Ser Ala Phe Met Ala Leu Ala
 865 870 875 880
 Ala Arg Phe Pro Val Lys Ser Glu Gly Pro Glu Lys Pro Ala Ala Val
 885 890 895
 Glu Lys Ser Thr Pro Thr Pro Pro Lys Gln Lys Asp Ser Cys Ser Gly
 900 905 910
 Val Leu Gly Glu Ser Ala Lys Leu Gln Gly Asn Phe Phe Val Glu Glu
 915 920 925
 Ile Gly Asp Leu Gly Ser Phe Asn Thr Val Asp Asp Gly Ser Leu Glu
 930 935 940
 Gly Val Leu Ser Ser Gln Asn Ser Val Val Ser Pro Arg Asn Phe Ser
 945 950 955 960
 Lys Tyr Leu Leu Asn Gly Thr Tyr Thr Met Gly Ser Ser Ser Ser Leu
 965 970 975
 Val Lys Phe Thr Gln Glu Val Gly Ser Ser Gly Cys His Gln Val Ser
 980 985 990
 Val Leu Pro Thr Ser Asp Leu Asn Lys Ala Ala Pro Phe Asp Leu Asp
 995 1000 1005
 Thr Thr Tyr Gln Ile Cys Thr Gly Leu Asp His Gly Val Asn Ile
 1010 1015 1020
 Ser Asp Val Ala Gln Ser Glu Val Ser Leu Tyr Gln Gln His Pro
 1025 1030 1035
 Ile Asp Ala Ser Ile Asn Lys Asn Lys Ala Lys Val Thr Asp Tyr
 1040 1045 1050
 Ser Ser Gly Ser Phe Leu Tyr Asp Asn Arg Asp Gly Ser Leu Ser
 1055 1060 1065
 Gln His Met Tyr Ser Ser Phe Pro Phe Gln Pro Ser Gln Glu Ala
 1070 1075 1080
 Glu Cys Ser Ala Thr Val Lys Gln Ser Phe Phe Gln Gln Phe Ile
 1085 1090 1095
 Ser Ser Glu Glu Val Pro Ile Ser Thr Gly His Ser Phe Tyr Asp
 1100 1105 1110
 Asn Ser Phe Thr Ser Asn Arg Thr Glu Asp Pro Tyr Val Glu Gln
 1115 1120 1125
 Gln Asp Cys Phe Asn Asn Leu Gln Glu Ala Tyr Thr Thr Arg Thr
 1130 1135 1140
 Ile Gln Ile Asn Ser Glu Arg Ser Gln Pro Glu Cys Ser Gln Gln
 1145 1150 1155
 Gln Asp Asn Asp Ile Arg Val Gln Ala Lys Thr Cys Glu Lys His
 1160 1165 1170

| | | | | | | | | | | | | | | |
|------|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|
| Ser | Ser | Ser | Asn | Leu | Cys | Gly | Asn | Met | Asn | Ser | His | Ser | Asp | Val |
| 1175 | | | | | | 1180 | | | | | 1185 | | | |
| Pro | Leu | Gly | Ile | Ala | Ser | Gly | Ser | Ile | Gly | Lys | Ser | Lys | His | Thr |
| 1190 | | | | | | 1195 | | | | | 1200 | | | |
| Glu | Lys | Arg | Pro | Lys | Ala | Arg | Asn | Val | Arg | Gly | Arg | Thr | Lys | Met |
| 1205 | | | | | | 1210 | | | | | 1215 | | | |
| Lys | His | Tyr | Asp | Trp | Asp | Asn | Leu | Arg | Lys | Glu | Val | Leu | His | Asn |
| 1220 | | | | | | 1225 | | | | | 1230 | | | |
| His | Gly | Asn | Arg | Gln | Arg | Ser | Asp | Lys | Ala | Lys | Asp | Thr | Ile | Asp |
| 1235 | | | | | | 1240 | | | | | 1245 | | | |
| Trp | Glu | Ala | Asp | Phe | Leu | Asn | Arg | Leu | Val | Arg | Asp | His | Gly | Ser |
| 1250 | | | | | | 1255 | | | | | 1260 | | | |
| Ile | Asp | Leu | Glu | Trp | Leu | Arg | Asp | Ile | Glu | Pro | Asp | Lys | Ala | Lys |
| 1265 | | | | | | 1270 | | | | | 1275 | | | |
| Gly | Phe | Leu | Leu | Ser | Ile | Arg | Gly | Leu | Gly | Leu | Lys | Ser | Thr | Glu |
| 1280 | | | | | | 1285 | | | | | 1290 | | | |
| Cys | Val | Arg | Leu | Leu | Thr | Leu | His | Gln | Met | Ala | Phe | Pro | Val | Asp |
| 1295 | | | | | | 1300 | | | | | 1305 | | | |
| Thr | Asn | Val | Ala | Arg | Ile | Cys | Val | Arg | Leu | Gly | Trp | Val | Pro | Leu |
| 1310 | | | | | | 1315 | | | | | 1320 | | | |
| Gln | Pro | Leu | Pro | Glu | Ser | Leu | Gln | Leu | His | Leu | Leu | Glu | Leu | Tyr |
| 1325 | | | | | | 1330 | | | | | 1335 | | | |
| Pro | Leu | Leu | Glu | His | Ile | Gln | Lys | Tyr | Ile | Trp | Pro | Arg | Leu | Cys |
| 1340 | | | | | | 1345 | | | | | 1350 | | | |
| Lys | Leu | Asp | Gln | Leu | Ile | Leu | Tyr | Glu | Leu | His | Tyr | Gln | Met | Ile |
| 1355 | | | | | | 1360 | | | | | 1365 | | | |
| Thr | Phe | Gly | Lys | Val | Phe | Cys | Ser | Lys | Ser | Lys | Pro | Asn | Cys | Asn |
| 1370 | | | | | | 1375 | | | | | 1380 | | | |
| Ser | Cys | Pro | Met | Arg | Ala | Glu | Cys | Lys | His | Phe | Ala | Ser | Ala | Phe |
| 1385 | | | | | | 1390 | | | | | 1395 | | | |
| Ala | Ser | Ala | Arg | Leu | Ala | Leu | Pro | Gly | Pro | Ser | Lys | Lys | Thr | Ser |
| 1400 | | | | | | 1405 | | | | | 1410 | | | |
| Lys | Pro | Glu | Tyr | Pro | Asn | Asp | Ala | Glu | Ser | Ser | His | Lys | Lys | Tyr |
| 1415 | | | | | | 1420 | | | | | 1425 | | | |
| Thr | His | Ser | Arg | Pro | Met | Gly | Gln | Leu | Ser | Trp | Asn | Thr | Asn | His |
| 1430 | | | | | | 1435 | | | | | 1440 | | | |
| Pro | Gly | His | Val | Tyr | Glu | Ala | Arg | Glu | Ala | Glu | Ile | Glu | Asp | Phe |
| 1445 | | | | | | 1450 | | | | | 1455 | | | |
| Phe | Ser | Glu | Asp | Pro | Asp | Glu | Ile | Pro | Ile | Ile | Asn | Leu | Asn | Val |
| 1460 | | | | | | 1465 | | | | | 1470 | | | |
| Glu | Glu | Phe | Ala | Gln | Asn | Leu | Lys | Ser | Tyr | Ile | His | Ala | Asn | Asn |
| 1475 | | | | | | 1480 | | | | | 1485 | | | |

Ile Glu Ile Glu Asp Ala Asp Met Ser Asn Ala Leu Val Ala Ile
 1490 1495 1500
 Ser Pro Gln Ala Ala Ser Val Pro Thr Ser Lys Leu Lys Asn Val
 1505 1510 1515
 Asn Arg Leu Arg Thr Glu His Gln Val Tyr Glu Leu Pro Asp Ser
 1520 1525 1530
 His Pro Leu Leu Glu Gly Phe Asp Gln Arg Glu Pro Asp Asp Pro
 1535 1540 1545
 Ser Pro Tyr Leu Leu Ser Ile Trp Thr Pro Gly Lys Leu Met Cys
 1550 1555 1560
 Ser His Pro Thr Phe Thr Leu Ile Gln Val Ile Leu Met Ile Lys
 1565 1570 1575
 Ile Ser Thr Gly Glu Thr Ala Gln Ser Thr Asp Ala Pro Lys Thr
 1580 1585 1590
 Phe Cys Asn Ser Lys Glu Thr Gly Lys Leu Cys Glu Ser Ser Thr
 1595 1600 1605
 Cys Phe Ser Cys Asn Ser Thr Arg Glu Met Gln Ser Gln Lys Val
 1610 1615 1620
 Arg Gly Thr Leu Leu Ala Ser Ser Leu Leu Arg Val Pro
 1625 1630 1635
 <210> 4
 <211> 1847
 <212> PRT
 <213> Oryza sativa
 <400> 4
 Met Ala Lys Asp Glu Asn Pro Ser Tyr Leu His Leu Ile Phe Leu Ser
 1 5 10 15
 Ser Arg Ile Arg Val Phe Ile Leu Asp Pro Pro Leu Ser Leu Pro Leu
 20 25 30
 Ser His Gly Gln Cys Glu Leu Gln Val Val Glu Glu Ala Ala Met Asp
 35 40 45
 Pro Ser Gly Leu Asn Leu Gln Gly Asn Pro Ala Glu Asn Gln Glu Ser
 50 55 60
 Trp Thr Ser Gly Val Ser Val Gly Arg Gly Thr Pro Asn Leu Gly Val
 65 70 75 80
 Gly Thr Ala Val Ala Gly Arg Ser Cys Pro Ser Ser Thr Leu Phe Pro
 85 90 95
 Gly Ser Ser Leu Ser Ser Thr Ala Leu Leu Asn Thr Met His Glu Gly
 100 105 110
 Ser Phe Pro Gln Thr Ala Leu Val Ala Gly Ser Val Ser Ser Ala Asp
 115 120 125
 Glu Gln His Gly Ala Pro Pro Val Arg Pro Ser Tyr Asn Leu Pro Ala
 130 135 140

| |
|-----|
| Gly | Cys | Thr | Gln | Val | Pro | Ile | Ser | Ile | Leu | Val | Phe | His | Arg | Arg | Leu | 145 | 150 | 155 | 160 |
| Thr | Gly | Arg | Gly | Ser | Arg | Cys | Arg | Ser | Pro | Gln | Ser | Arg | Ser | Phe | Met | 165 | 170 | 175 | |
| Pro | Ala | Pro | Ala | Leu | Ser | Gly | Val | Ser | Glu | Asp | Gly | Ala | Tyr | Gly | Pro | 180 | 185 | 190 | |
| Ile | Pro | Gln | Ser | Asp | Phe | Leu | Ser | Leu | Arg | Gly | Pro | Ser | Glu | Val | Phe | 195 | 200 | 205 | |
| Pro | Gly | Asp | Met | Ala | Met | Asn | His | Ser | Glu | Pro | Ala | Thr | Ser | Tyr | Gly | 210 | 215 | 220 | |
| Tyr | Asn | Ser | Glu | Tyr | Ala | Pro | Met | His | Leu | Gln | Pro | Asn | Gly | Leu | Tyr | 225 | 230 | 235 | 240 |
| Thr | Glu | Ala | Ser | Asn | Thr | Glu | Ser | Glu | Arg | Glu | Ala | Ser | Gln | Leu | Gln | 245 | 250 | 255 | |
| Gln | Ser | Ala | Glu | Ala | Val | Ile | Cys | Asp | Ser | Leu | Ser | Lys | Leu | Glu | Ser | 260 | 265 | 270 | |
| Ala | Met | Glu | Lys | Ile | Gln | Gly | Gln | Asn | Pro | Gln | Glu | Ser | Ser | Gly | Leu | 275 | 280 | 285 | |
| Val | Ala | Glu | Gly | Ser | Ala | Asp | Asp | Asn | Ile | His | Lys | Tyr | His | Gln | Lys | 290 | 295 | 300 | |
| Ala | Lys | Arg | Ala | Arg | Thr | Gln | Ile | Thr | His | Ser | Asp | Lys | Ile | Asp | Leu | 305 | 310 | 315 | 320 |
| Pro | Thr | Gln | Ala | Val | Ser | Ala | Cys | Lys | Glu | Lys | Thr | Ile | Thr | Gln | Ile | 325 | 330 | 335 | |
| Glu | Met | Gln | Ile | Ala | Asp | Ala | Glu | Arg | Thr | Glu | Ala | Leu | Lys | Gly | Glu | 340 | 345 | 350 | |
| Asp | Ala | Pro | Ala | Gln | Lys | Leu | Lys | Thr | Arg | Arg | Arg | Lys | His | Arg | Pro | 355 | 360 | 365 | |
| Lys | Val | Ile | Arg | Glu | Asp | Arg | Pro | Ala | Lys | Lys | Gln | Met | Ala | Thr | Thr | 370 | 375 | 380 | |
| Ser | Glu | Glu | Lys | Pro | Leu | Asn | Gln | Lys | Pro | Lys | Arg | Lys | Tyr | Val | Arg | 385 | 390 | 395 | 400 |
| Lys | Asn | Arg | Asn | Pro | Ser | Ser | Leu | Glu | Lys | Cys | Ala | Glu | Pro | Phe | Ser | 405 | 410 | 415 | |
| Asp | His | Ser | Ile | Ser | Arg | Glu | Ser | Arg | Thr | Thr | Val | Arg | Ser | Ser | Ile | 420 | 425 | 430 | |
| Ala | Ser | Val | Arg | Arg | Arg | Leu | Gln | Phe | Glu | Phe | Gly | Glu | His | Gly | Val | 435 | 440 | 445 | |
| Gln | Arg | Asp | Gln | Ser | Ser | Met | Thr | Asn | Ser | Trp | Tyr | Gln | Asn | Gln | Glu | 450 | 455 | 460 | |
| Lys | Pro | Val | Asn | Ala | Glu | Ser | Ser | Leu | Cys | Ser | Val | Thr | Lys | Ser | Ser | 465 | 470 | 475 | 480 |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Val | Gln | Val | Glu | His | Gly | Gln | Glu | Leu | His | Met | Glu | Asn | Ser | Pro | Glu | 485 | 490 | 495 |
| Gly | Leu | Phe | Phe | Gly | Ile | Asn | Ser | Lys | Leu | Asn | Lys | Ile | Leu | Asp | Glu | 500 | 505 | 510 |
| Tyr | Ile | His | Leu | Pro | Glu | Ala | Ala | Pro | Lys | Pro | Ser | Glu | Gln | Ile | Pro | 515 | 520 | 525 |
| Leu | Ala | Ala | Ser | Gly | His | Val | Ser | Glu | Glu | Leu | Ala | Arg | Lys | Gln | Tyr | 530 | 535 | 540 |
| Asp | Val | Arg | His | Thr | His | Asp | Pro | Asp | Ser | Thr | Ser | Tyr | Asn | Ile | Glu | 545 | 550 | 555 |
| Arg | Ser | Gly | Leu | Ile | Thr | Thr | Lys | Gly | His | Lys | Lys | Asp | Leu | Asp | Leu | 565 | 570 | 575 |
| Asn | Tyr | Ser | Asn | Thr | Asn | Gly | Phe | Gln | Met | Tyr | Cys | Ser | Ala | Ser | Leu | 580 | 585 | 590 |
| Leu | Pro | Glu | Met | Asp | Ser | Thr | Lys | Gly | Ser | Met | Thr | Lys | Val | Ser | Lys | 595 | 600 | 605 |
| Met | Asp | Lys | Asn | Lys | Lys | Arg | His | Tyr | Gly | Gly | Glu | Ser | Ser | Leu | Ala | 610 | 615 | 620 |
| Gly | Thr | Gln | Ser | Ser | Ile | Ile | Met | Arg | Thr | Ala | Ala | Glu | Met | Leu | Ala | 625 | 630 | 635 |
| Val | Tyr | Gln | Ala | Cys | Gly | Ile | Lys | Lys | Lys | Arg | Ser | Ala | Arg | Val | Arg | 645 | 650 | 655 |
| Arg | Asn | Ser | Phe | Leu | Ser | Val | Met | Asp | Leu | Glu | Lys | Asn | Thr | Ser | Gln | 660 | 665 | 670 |
| Glu | Ser | Thr | Arg | Leu | Pro | Arg | Ser | Cys | Met | Glu | Ala | Leu | Tyr | Glu | Ser | 675 | 680 | 685 |
| Ser | Tyr | Ile | Lys | Phe | Met | Thr | Lys | Lys | Arg | Ser | Gln | Lys | Ala | Arg | Leu | 690 | 695 | 700 |
| Asn | Ser | Pro | Asn | Ser | Ile | Gln | Pro | Asn | Ile | Asp | Gln | Lys | Asn | Arg | Phe | 705 | 710 | 715 |
| Ser | Ser | Glu | Thr | Val | Phe | Ser | Gly | Gly | Phe | Asn | Gly | Leu | Lys | Arg | Ser | 725 | 730 | 735 |
| Glu | Glu | Thr | Phe | Gln | Lys | Thr | Leu | Pro | Gln | Ile | Pro | Asp | Asp | Lys | Arg | 740 | 745 | 750 |
| Ile | Asn | Leu | Asp | Ile | His | Cys | Lys | Val | Pro | Val | Glu | Ser | Ser | Pro | Asn | 755 | 760 | 765 |
| Thr | Ser | Thr | Pro | Pro | Tyr | Met | Asp | Tyr | Leu | Gln | Gly | Val | Thr | Ser | Lys | 770 | 775 | 780 |
| Phe | Arg | Tyr | Phe | Asp | Leu | Asn | Thr | Glu | Gln | Val | His | Lys | Thr | Glu | Met | 785 | 790 | 795 |
| His | Leu | Ser | Gln | Thr | Met | Pro | Ser | Leu | Ser | Ser | Leu | Gly | Ala | Thr | Asn | 805 | 810 | 815 |

Tyr Leu Pro Asn Ala Leu Val Pro Tyr Val Gly Gly Ala Val Val Pro
 820 825 830
 Tyr Gln Thr Gln Phe His Leu Val Lys Lys Gln Arg Pro Arg Ala Lys
 835 840 845
 Val Asp Leu Asp Phe Glu Thr Thr Arg Val Trp Asn Leu Leu Met Gly
 850 855 860
 Lys Ala Ala Asp Pro Val Asp Gly Thr Asp Val Asp Lys Glu Arg Trp
 865 870 875 880
 Trp Lys Gln Glu Arg Glu Val Phe Gln Gly Arg Ala Asn Ser Phe Ile
 885 890 895
 Ala Arg Met Arg Leu Val Gln Gly Asp Arg Arg Phe Ser Pro Trp Lys
 900 905 910
 Gly Ser Val Val Asp Ser Val Val Gly Val Phe Leu Thr Gln Asn Val
 915 920 925
 Ala Asp His Leu Ser Ser Ser Ala Tyr Met Ala Leu Ala Ala Ser Phe
 930 935 940
 Pro Thr Gly Ser His Gly Asn Cys Asn Asp Gly Ile Ala Gly Gln Asp
 945 950 955 960
 Asn Glu Glu Ile Ile Ser Thr Ser Ala Val Gly Asp Arg Gly Thr Phe
 965 970 975
 Glu Phe Phe Tyr Asn Gly Ser Arg Pro Asp Ile Gly Leu Asn Phe Glu
 980 985 990
 Phe Ser Met Ala Cys Glu Lys Ile His Met Glu Pro Lys Asp Asn Thr
 995 1000 1005
 Thr Val Asn Glu Leu Thr Lys Gly Glu Asn Tyr Ser Leu His Cys
 1010 1015 1020
 Lys Glu Ser Ala Gly Ser Leu Cys Asp His Glu Thr Glu Ile Asp
 1025 1030 1035
 His Lys Ala Lys Ser Ile Ser Asp Phe Ser Ala Val Glu Leu Thr
 1040 1045 1050
 Ala Cys Met Lys Asn Leu His Ala Thr Gln Phe Gln Lys Glu Ile
 1055 1060 1065
 Ser Leu Ser Gln Ser Val Val Thr Ser Glu Ser Ile Leu Gln Pro
 1070 1075 1080
 Gly Leu Pro Leu Ser Ser Gly Met Asp His Ala Arg Arg Asn Phe
 1085 1090 1095
 Val Gly Ser Ile Ser Asp Thr Ala Ser Gln Gln Val Gly Ser Asn
 1100 1105 1110
 Phe Asp Asp Gly Lys Ser Leu Thr Gly Asn Asp Val Thr Ala Asn
 1115 1120 1125
 Glu Thr Glu Tyr His Gly Ile Lys Ala Ala Ala Thr Asn Asn Tyr
 1130 1135 1140

| | | | | | | | | | | | | | | |
|------|-----|-----|-----|-----|------|------|-----|-----|-----|------|------|-----|-----|-----|
| Val | Val | Asp | Glu | Pro | Gly | Ile | Pro | Ser | Gly | Ser | Ser | Leu | Tyr | Pro |
| 1145 | | | | | | 1150 | | | | | 1155 | | | |
| Phe | Phe | Ser | Ala | Ile | Asp | Cys | His | Gln | Leu | Asp | Gly | Arg | Asn | Asp |
| 1160 | | | | | | 1165 | | | | | 1170 | | | |
| Thr | His | Val | Ser | Ser | Thr | Ser | Pro | Asn | Cys | Ser | Ile | Cys | Ser | Ala |
| 1175 | | | | | 1180 | | | | | 1185 | | | | |
| Ser | Ser | Asn | Phe | Lys | Ile | Gly | Thr | Ile | Glu | Glu | Asn | Ser | Ser | Leu |
| 1190 | | | | | 1195 | | | | | 1200 | | | | |
| Phe | Met | Pro | Phe | Asp | Ala | His | Leu | Ala | Gln | Arg | Asn | Gly | Asn | Met |
| 1205 | | | | | 1210 | | | | | 1215 | | | | |
| Ile | Val | Asp | Thr | Asn | Leu | Ser | Ser | Ala | Leu | Glu | Ser | Thr | Glu | Leu |
| 1220 | | | | | 1225 | | | | | 1230 | | | | |
| Pro | Val | Lys | Leu | Leu | His | Cys | Gly | Lys | Arg | Ser | Cys | Tyr | Glu | Ala |
| 1235 | | | | | 1240 | | | | | 1245 | | | | |
| Ser | Glu | Phe | Gln | Asp | His | Glu | Ser | Leu | Tyr | Ala | Thr | Gly | Gly | Val |
| 1250 | | | | | 1255 | | | | | 1260 | | | | |
| Ile | Pro | Glu | Thr | Ala | Thr | Lys | Ala | Asp | Asp | Ser | Thr | Leu | Lys | Ser |
| 1265 | | | | | 1270 | | | | | 1275 | | | | |
| Gly | Phe | Ala | Ser | Phe | Asn | Gly | Leu | Pro | Asp | Thr | Ala | Ala | Gln | Ala |
| 1280 | | | | | 1285 | | | | | 1290 | | | | |
| Ser | Lys | Pro | Lys | Lys | Ser | Arg | Thr | Thr | Ser | Lys | Lys | Asn | Ser | Glu |
| 1295 | | | | | 1300 | | | | | 1305 | | | | |
| Asn | Phe | Asp | Trp | Asp | Lys | Leu | Arg | Arg | Gln | Ala | Cys | Gly | Asn | Tyr |
| 1310 | | | | | 1315 | | | | | 1320 | | | | |
| Gln | Met | Lys | Glu | Arg | Ile | Phe | Asp | Arg | Arg | Asp | Ser | Val | Asp | Trp |
| 1325 | | | | | 1330 | | | | | 1335 | | | | |
| Glu | Ala | Val | Arg | Cys | Ala | Asp | Val | Gln | Arg | Ile | Ser | His | Ala | Ile |
| 1340 | | | | | 1345 | | | | | 1350 | | | | |
| Arg | Glu | Arg | Gly | Met | Asn | Asn | Val | Leu | Ala | Glu | Arg | Ile | Gln | Lys |
| 1355 | | | | | 1360 | | | | | 1365 | | | | |
| Phe | Leu | Asn | Arg | Leu | Val | Thr | Asp | His | Gly | Ser | Ile | Asp | Leu | Glu |
| 1370 | | | | | 1375 | | | | | 1380 | | | | |
| Trp | Leu | Arg | Asp | Val | Pro | Pro | Asp | Ser | Ala | Lys | Asp | Tyr | Leu | Leu |
| 1385 | | | | | 1390 | | | | | 1395 | | | | |
| Ser | Ile | Arg | Gly | Leu | Gly | Leu | Lys | Ser | Val | Glu | Cys | Val | Arg | Leu |
| 1400 | | | | | 1405 | | | | | 1410 | | | | |
| Leu | Thr | Leu | His | His | Leu | Ala | Phe | Pro | Val | Asp | Thr | Asn | Val | Gly |
| 1415 | | | | | 1420 | | | | | 1425 | | | | |
| Arg | Ile | Cys | Val | Arg | Leu | Gly | Trp | Val | Pro | Ile | Gln | Pro | Leu | Pro |
| 1430 | | | | | 1435 | | | | | 1440 | | | | |
| Glu | Ser | Leu | Gln | Leu | His | Leu | Leu | Glu | Leu | Tyr | Pro | Val | Leu | Glu |
| 1445 | | | | | 1450 | | | | | 1455 | | | | |

| | | | | | |
|---------|-------------|---------|-------------|-------------|-------------|
| Thr Ile | Gln Lys Tyr | Leu Trp | Pro Arg | Leu Cys Lys | Leu Asp Gln |
| 1460 | | 1465 | | 1470 | |
| Gln Thr | Leu Tyr Glu | Leu His | Tyr Gln Met | Ile Thr | Phe Gly Lys |
| 1475 | | 1480 | | 1485 | |
| Val Phe | Cys Thr Lys | Ser Lys | Pro Asn Cys | Asn Ala | Cys Pro Met |
| 1490 | | 1495 | | 1500 | |
| Arg Ser | Glu Cys Arg | His Phe | Ala Ser Ala | Phe Ala | Ser Ala Arg |
| 1505 | | 1510 | | 1515 | |
| Leu Ala | Leu Pro Ser | Pro Gln | Asp Lys Arg | Leu Val | Asn Leu Ser |
| 1520 | | 1525 | | 1530 | |
| Asn Gln | Phe Ala Phe | His Asn | Gly Thr Met | Pro Thr | Pro Asn Ser |
| 1535 | | 1540 | | 1545 | |
| Thr Pro | Leu Pro Gln | Leu Glu | Gly Ser Ile | His Ala | Arg Asp Val |
| 1550 | | 1555 | | 1560 | |
| His Ala | Asn Asn Thr | Asn Pro | Ile Ile Glu | Glu Pro | Ala Ser Pro |
| 1565 | | 1570 | | 1575 | |
| Arg Glu | Glu Glu Cys | Arg Glu | Leu Leu Glu | Asn Asp | Ile Glu Asp |
| 1580 | | 1585 | | 1590 | |
| Phe Asp | Glu Asp Thr | Asp Glu | Ile Pro Ile | Ile Lys | Leu Asn Met |
| 1595 | | 1600 | | 1605 | |
| Glu Ala | Phe Ser Gln | Asn Leu | Glu Asn Cys | Ile Lys | Glu Ser Asn |
| 1610 | | 1615 | | 1620 | |
| Lys Asp | Phe Gln Ser | Asp Asp | Ile Thr Lys | Ala Leu | Val Ala Ile |
| 1625 | | 1630 | | 1635 | |
| Ser Asn | Glu Ala Ala | Ser Ile | Pro Val Pro | Lys Leu | Lys Asn Val |
| 1640 | | 1645 | | 1650 | |
| His Arg | Leu Arg Thr | Glu His | Tyr Val Tyr | Glu Leu | Pro Asp Ser |
| 1655 | | 1660 | | 1665 | |
| His Pro | Leu Met Gln | Gln Leu | Ala Leu Asp | Gln Arg | Glu Pro Asp |
| 1670 | | 1675 | | 1680 | |
| Asp Pro | Asn Glu Leu | Lys Asp | Thr Arg Glu | Ala Pro | Lys Pro Cys |
| 1685 | | 1690 | | 1695 | |
| Cys Asn | Pro Gln Thr | Glu Gly | Gly Leu Cys | Ser Asn | Glu Met Cys |
| 1700 | | 1705 | | 1710 | |
| His Asn | Cys Val Ser | Glu Arg | Glu Asn Gln | Tyr Arg | Tyr Val Arg |
| 1715 | | 1720 | | 1725 | |
| Gly Thr | Val Leu Val | Pro Cys | Arg Thr Ala | Met Arg | Gly Ser Phe |
| 1730 | | 1735 | | 1740 | |
| Pro Leu | Asn Gly Thr | Tyr Phe | Gln Val Asn | Glu Val | Phe Ala Asp |
| 1745 | | 1750 | | 1755 | |
| His Ser | Ser Ser His | Asn Pro | Ile Asn Ile | Pro Arg | Glu Gln Leu |
| 1760 | | 1765 | | 1770 | |

Trp Asn Leu His Arg Arg Met Val Tyr Phe Gly Thr Ser Val Pro
 1775 1780 1785
 Thr Ile Phe Lys Gly Leu Thr Thr Glu Glu Ile Gln His Cys Phe
 1790 1795 1800
 Trp Arg Gly Phe Val Cys Val Arg Gly Phe Asn Met Glu Thr Arg
 1805 1810 1815
 Ala Pro Arg Pro Leu Cys Pro His Phe His Leu Ala Ala Ser Lys
 1820 1825 1830
 Leu Arg Arg Ser Ser Lys Lys Ala Ala Thr Glu Gln Thr His
 1835 1840 1845
 <210> 5
 <211> 1829
 <212> PRT
 <213> Oryza sativa
 <400> 5
 Met Ala Lys Asp Glu Asn Pro Ser Tyr Leu His Leu Ile Phe Leu Ser
 1 5 10 15
 Ser Arg Ile Arg Val Phe Ile Leu Asp Pro Pro His Ser Leu Ser Leu
 20 25 30
 Ser Asn Gly Gln Cys Glu Leu Gln Val Val Glu Glu Ala Ala Met Asp
 35 40 45
 Pro Ser Gly Leu Asn Leu Gln Gly Asn Pro Ala Glu Asn Gln Glu Ser
 50 55 60
 Trp Thr Ser Gly Val Ser Val Gly Arg Gly Thr Pro Asn Leu Gly Val
 65 70 75 80
 Gly Thr Ala Val Ala Gly Arg Ser Cys Pro Pro Leu Thr Leu Phe Pro
 85 90 95
 Gly Ser Ser Leu Ser Ser Thr Ala Leu Leu Asn Ala Met His Glu Gly
 100 105 110
 Ser Phe Pro Gln Ala Ala Leu Val Ala Gly Ser Gly Ser Ser Ala Asp
 115 120 125
 Glu Gln His Gly Gly Pro Pro Val Arg Pro Ser Tyr Asn Leu Pro Ala
 130 135 140
 Gly Cys Thr Gln Val Pro Ile Ser Ile Leu Val Phe His Arg Arg Leu
 145 150 155 160
 Thr Gly Arg Gly Ser Arg Arg Arg Ser Phe Met Pro Ala Pro Ala Leu
 165 170 175
 Ser Gly Val Ser Glu Asp Gly Ala Ser Gly Pro Ile Pro Gln Ser Asp
 180 185 190
 Phe Leu Ser Leu Gly Gly Pro Ser Glu Val Phe Ala Glu His Ala Pro
 195 200 205
 Met Leu Leu Gln Pro Asn Gly Leu Tyr Thr Glu Ala Ser Asn Thr Glu
 210 215 220
 Ser Glu Arg Glu Ala Ser Gln Leu Gln Gln Ser Ala Glu Ala Val Ile

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|-----|-----|--|--|--|--|--|--|--|--|-----|--|--|--|-----|-----|--|--|--|--|--|--|--|--|-----|
| 225 | | | | | | | | | | | | | | 230 | | | | | | | | | | | | | | 235 | | | | | | | | | | | | | | 240 |
| Cys | Asp | Ser | His | Ser | Lys | Leu | Glu | Ser | Val | Met | Glu | Lys | Ile | Gln | Gly | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | 245 | | | | | | | | | | | | | | 250 | | | | | | | | | | | | | | 255 | | | | | | | | | | |
| Gln | Asn | Pro | Gln | Glu | Ser | Ile | Gly | Leu | Val | Ala | Glu | Gly | Ser | Thr | Asp | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 260 | | | | | 265 | | | | | | | | | | | | | | 270 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Asp | Asn | Ile | His | Lys | Tyr | His | Gln | Lys | Ala | Lys | Arg | Ala | Arg | Thr | Gln | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | 275 | | | | | | | | | | | | | | 280 | | | | | | | | | | | | | | 285 | | | | | | | | | | |
| Ile | Thr | His | Ser | Asp | Lys | Met | Asp | Leu | Pro | Thr | Gln | Ala | Val | Ser | Ala | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | 290 | | | | | | | | | | | | | | 295 | | | | | | | | | | | | | | 300 | | | | | | | | | | |
| Cys | Lys | Glu | Lys | Thr | Leu | Thr | Gln | Ile | Glu | Met | Gln | Ile | Ala | Asp | Ala | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 305 | | | | | 310 | | | | | | | | | | | | | | 315 | | | | | | | | | | | | | | 320 | | | | | | | | | |
| Glu | Arg | Thr | Glu | Ala | Phe | Lys | Ser | Glu | Asp | Ala | Pro | Ala | Gln | Lys | Leu | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | 325 | | | | | | | | | | | | | | 330 | | | | | | | | | | | | | | 335 | | | | | | | | | | |
| Lys | Thr | Arg | Arg | Arg | Lys | His | Arg | Pro | Lys | Val | Ile | Arg | Glu | Asp | Arg | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | 340 | | | | | | | | | | | | | | 345 | | | | | | | | | | | | | | 350 | | | | | | | | | | |
| Pro | Ala | Lys | Lys | Gln | Met | Ser | Thr | Thr | Ser | Lys | Glu | Lys | Pro | Leu | Asn | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | 355 | | | | | | | | | | | | | | 360 | | | | | | | | | | | | | | 365 | | | | | | | | | | |
| Gln | Lys | Pro | Lys | Arg | Lys | Tyr | Val | Trp | Lys | Asn | Arg | Asn | Pro | Ser | Ser | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | 370 | | | | | | | | | | | | | | 375 | | | | | | | | | | | | | | 380 | | | | | | | | | | |
| Leu | Glu | Lys | Cys | Ala | Glu | Pro | Phe | Ser | Asp | His | Ser | Ile | Ser | Arg | Glu | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 385 | | | | | 390 | | | | | | | | | | | | | | 395 | | | | | | | | | | | | | | 400 | | | | | | | | | |
| Ser | Arg | Thr | Thr | Val | Arg | Ser | Ser | Ile | Ala | Ser | Val | Arg | Arg | Arg | Leu | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | 405 | | | | | | | | | | | | | | 410 | | | | | | | | | | | | | | 415 | | | | | | | | | | |
| Gln | Phe | Glu | Phe | Gly | Glu | His | Gly | Val | Gln | Arg | Asp | Gln | Ser | Ser | Arg | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | 420 | | | | | | | | | | | | | | 425 | | | | | | | | | | | | | | 430 | | | | | | | | | | |
| Thr | Asn | Ser | Trp | Tyr | Arg | Asn | Gln | Glu | Lys | Pro | Val | Asn | Ala | Glu | Ser | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | 435 | | | | | | | | | | | | | | 440 | | | | | | | | | | | | | | 445 | | | | | | | | | | |
| Ser | Leu | Cys | Ser | Val | Thr | Lys | Ser | Ser | Val | Gln | Val | Glu | His | Gly | Gln | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | 450 | | | | | | | | | | | | | | 455 | | | | | | | | | | | | | | 460 | | | | | | | | | | |
| Glu | Leu | His | Met | Glu | Asn | Ser | Pro | Glu | Gly | Leu | Phe | Phe | Gly | Ile | Asn | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 465 | | | | | 470 | | | | | | | | | | | | | | 475 | | | | | | | | | | | | | | 480 | | | | | | | | | |
| Ser | Lys | Leu | Asn | Lys | Ile | Leu | Asp | Glu | Tyr | Ile | His | Leu | Pro | Glu | Ala | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 485 | | | | | 490 | | | | | | | | | | | | | | 495 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Ala | Pro | Lys | Pro | Ser | Glu | Glu | Ile | Pro | Leu | Ala | Thr | Ser | Gly | His | Val | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | 500 | | | | | | | | | | | | | | 505 | | | | | | | | | | | | | | 510 | | | | | | | | | | |
| Ser | Glu | Glu | Leu | Ala | Arg | Lys | Gln | Asp | Asp | Val | Arg | His | Ile | His | Asp | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | 515 | | | | | | | | | | | | | | 520 | | | | | | | | | | | | | | 525 | | | | | | | | | | |
| His | Asn | Glu | Arg | Ser | Gly | Leu | Ile | Thr | Thr | Lys | Gln | Asn | Lys | Lys | Asp | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | 530 | | | | | | | | | | | | | | 535 | | | | | | | | | | | | | | 540 | | | | | | | | | | |
| Leu | Asp | Leu | Asn | Tyr | Ser | Asn | Thr | Asn | Gly | Phe | Gln | Met | Tyr | Cys | Ser | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 545 | | | | | 550 | | | | | | | | | | | | | | 555 | | | | | | | | | | | | | | 560 | | | | | | | | | |
| Ala | Ser | Leu | Leu | Pro | Glu | Met | Asp | Ser | Thr | Lys | Gly | Arg | Met | Thr | Lys | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

| 565 | | | | | | | | | | 570 | | | | | 575 | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|--|--|
| Val | Ser | Lys | Met | Asp | Lys | Asn | Gln | Lys | Arg | His | Tyr | Gly | Gly | Glu | Ser | | | | |
| 580 | | | | | 585 | | | | | 590 | | | | | | | | | |
| Ser | Leu | Ala | Gly | Thr | Gln | Ser | Ser | Ile | Ile | Met | Arg | Thr | Ala | Ala | Glu | | | | |
| | | 595 | | | | | 600 | | | | | 605 | | | | | | | |
| Met | Leu | Ala | Val | Tyr | Gln | Ala | Cys | Gly | Ile | Lys | Lys | Lys | Arg | Ser | Ala | | | | |
| | 610 | | | | | 615 | | | | | 620 | | | | | | | | |
| Arg | Val | Arg | Arg | Asn | Ser | Phe | Leu | Ser | Val | Met | Asp | Leu | Glu | Lys | Asn | | | | |
| 625 | | | | | 630 | | | | | 635 | | | | | 640 | | | | |
| Thr | Ser | Gln | Glu | Ser | Thr | Arg | Leu | Pro | Arg | Ser | Cys | Met | Glu | Ala | Leu | | | | |
| | | | | 645 | | | | | 650 | | | | | 655 | | | | | |
| Tyr | Glu | Ser | Ser | Tyr | Ile | Lys | Phe | Met | Thr | Lys | Lys | Arg | Ser | Gln | Lys | | | | |
| | | | 660 | | | | | 665 | | | | | 670 | | | | | | |
| Ala | Arg | Leu | Asn | Ser | Pro | Asn | Ser | Ile | Gln | Pro | Asn | Ile | Asp | Gln | Lys | | | | |
| 675 | | | | | 680 | | | | | 685 | | | | | | | | | |
| Asn | Arg | Phe | Ser | Ser | Glu | Thr | Ile | Phe | Ser | Gly | Gly | Phe | Asn | Gly | Leu | | | | |
| | 690 | | | | | 695 | | | | | 700 | | | | | | | | |
| Lys | Arg | Ser | Glu | Glu | Thr | Phe | Gln | Lys | Thr | Leu | Pro | Gln | Ile | Pro | Asp | | | | |
| 705 | | | | | 710 | | | | | 715 | | | | | 720 | | | | |
| Asp | Lys | Arg | Ile | Asn | Leu | Asp | Ile | His | Cys | Glu | Val | Pro | Val | Glu | Asn | | | | |
| | | | | 725 | | | | | 730 | | | | | 735 | | | | | |
| Ser | Pro | Asn | Thr | Ser | Thr | Pro | Pro | Tyr | Met | Asp | Tyr | Leu | Gln | Gly | Val | | | | |
| | | | 740 | | | | | 745 | | | | | 750 | | | | | | |
| Thr | Ser | Lys | Phe | Arg | Tyr | Phe | Asp | Leu | Asn | Thr | Glu | Gln | Val | His | Lys | | | | |
| | | 755 | | | | | 760 | | | | | 765 | | | | | | | |
| Thr | Glu | Met | His | Leu | Tyr | Gln | Thr | Met | Pro | Ser | Leu | Ser | Ser | Leu | Gly | | | | |
| | 770 | | | | | 775 | | | | | 780 | | | | | | | | |
| Ala | Thr | Asn | Tyr | Leu | Pro | Asn | Ala | Leu | Val | Pro | Tyr | Val | Gly | Gly | Ala | | | | |
| 785 | | | | | 790 | | | | | 795 | | | | | 800 | | | | |
| Val | Val | Pro | Tyr | Gln | Thr | Gln | Phe | His | Leu | Val | Lys | Lys | Gln | Arg | Pro | | | | |
| | | | | 805 | | | | | 810 | | | | | 815 | | | | | |
| Arg | Ala | Lys | Val | Asp | Leu | Asp | Phe | Glu | Thr | Thr | Arg | Val | Trp | Asn | Leu | | | | |
| | | | 820 | | | | | 825 | | | | | 830 | | | | | | |
| Leu | Met | Gly | Lys | Ala | Ala | Asp | Pro | Val | Asp | Gly | Thr | Asp | Val | Asp | Lys | | | | |
| | | 835 | | | | | 840 | | | | | 845 | | | | | | | |
| Glu | Arg | Trp | Trp | Lys | Gln | Glu | Arg | Glu | Val | Phe | Gln | Gly | Arg | Ala | Asn | | | | |
| | | 850 | | | | 855 | | | | | 860 | | | | | | | | |
| Ser | Phe | Ile | Ala | Arg | Met | Arg | Leu | Val | Gln | Gly | Asp | Arg | Arg | Phe | Ser | | | | |
| 865 | | | | | 870 | | | | | 875 | | | | | 880 | | | | |
| Pro | Trp | Lys | Gly | Ser | Val | Val | Asp | Ser | Val | Val | Gly | Val | Phe | Leu | Thr | | | | |
| 885 | | | | | 890 | | | | | 895 | | | | | | | | | |
| Gln | Asn | Val | Ala | Asp | His | Leu | Ser | Ser | Ser | Ala | Tyr | Met | Ala | Leu | Ala | | | | |

| | | |
|---|------|------|
| 900 | 905 | 910 |
| Ala Ser Phe Pro Pro Gly Ser Asp Gly Asn Cys Asn Asp Gly Ile Ala | | |
| 915 | 920 | 925 |
| Gly Gln Asp Asn Glu Glu Ile Ile Ser Thr Ser Ala Val Arg Asp Arg | | |
| 930 | 935 | 940 |
| Gly Thr Phe Glu Phe Phe Tyr Asp Gly Ser Arg Pro Asp Ile Gly Leu | | |
| 945 | 950 | 955 |
| Asn Phe Glu Glu Leu Ser Met Ala Cys Glu Lys Ile His Met Glu Pro | | |
| | 965 | 970 |
| Lys Gly Asn Ala Thr Val Asn Glu Leu Thr Lys Gly Glu Asn Tyr Ser | | |
| 980 | 985 | 990 |
| Leu His Cys Lys Glu Pro Ala Gly Ser Leu Cys Asp His Glu Thr Arg | | |
| 995 | 1000 | 1005 |
| Ile Asp His Lys Ala Lys Ser Ile Ser Asp Ile Ser Leu Val Glu | | |
| 1010 | 1015 | 1020 |
| Leu Thr Ala Arg Met Lys Asn Leu His Ala Thr Gln Phe Gln Thr | | |
| 1025 | 1030 | 1035 |
| Glu Ile Ser Leu Ser Gln Ser Val Val Thr Ser Glu Ser Ile Leu | | |
| 1040 | 1045 | 1050 |
| Gln Pro Gly Leu Pro Leu Ser Ser Gly Met Asp His Ala Pro Arg | | |
| 1055 | 1060 | 1065 |
| Asn Phe Val Gly Gly Ile Ser Asp Thr Ala Ser Gln Gln Val Gly | | |
| 1070 | 1075 | 1080 |
| Ser Asn Phe Asp Asp Gly Lys Ser Leu Thr Gly Asn Asp Val Thr | | |
| 1085 | 1090 | 1095 |
| Ala Asn Glu Thr Glu Tyr His Gly Ile Lys Ala Ala Ala Thr Asn | | |
| 1100 | 1105 | 1110 |
| Asn Tyr Val Val Asp Glu Pro Arg Ile Pro Ser Gly Ser Asn Met | | |
| 1115 | 1120 | 1125 |
| Tyr Pro Phe Phe Ser Ala Thr Asp Cys His Gln Leu Asp Glu Arg | | |
| 1130 | 1135 | 1140 |
| Asn Asp Ile His Val Ser Ser Thr Ser Pro Asn Ser Ser Ile Gly | | |
| 1145 | 1150 | 1155 |
| Ser Ala Ser Ser Asn Phe Lys Ile Gly Thr Ile Glu Glu Asn Ser | | |
| 1160 | 1165 | 1170 |
| Ser Phe Phe Met Pro Phe Asp Ala His Leu Ala Gln Met Asn Gly | | |
| 1175 | 1180 | 1185 |
| Asn Met Ile Ala Gly Thr Asn Val Ser Ser Ala Leu Ala Ser Thr | | |
| 1190 | 1195 | 1200 |
| Glu Leu Pro Val Lys Leu Leu His Cys Cys Lys Arg Ser Cys Tyr | | |
| 1205 | 1210 | 1215 |
| Glu Ala Ser Glu Phe Gln Asp His Glu Ser Leu Tyr Ala Thr Gly | | |

| | | | | |
|-------------------------|---------------------|-----------------|--|------|
| 1220 | | 1225 | | 1230 |
| Gly Ala Ile Pro Glu Thr | Ala Thr Lys Ala Asp | Asp Ser Thr Leu | | |
| 1235 | 1240 | 1245 | | |
| Lys Ser Gly Phe Ala Ser | Phe Asn Gly Leu Pro | Asp Thr Ala Ala | | |
| 1250 | 1255 | 1260 | | |
| Gln Ala Ser Lys Pro Lys | Lys Pro Arg Thr Thr | Ser Lys Lys Asn | | |
| 1265 | 1270 | 1275 | | |
| Ser Glu Asn Phe Asp Trp | Asp Lys Leu Arg Arg | Gln Ala Cys Gly | | |
| 1280 | 1285 | 1290 | | |
| Asn Tyr Gln Met Lys Glu | Arg Ile Phe Asp Arg | Arg Asp Ser Val | | |
| 1295 | 1300 | 1305 | | |
| Asp Trp Glu Ala Val Arg | Cys Ala Asp Val Gln | Arg Ile Ser His | | |
| 1310 | 1315 | 1320 | | |
| Ala Ile Arg Glu Arg Gly | Met Asn Asn Val Leu | Ala Glu Arg Ile | | |
| 1325 | 1330 | 1335 | | |
| Gln Lys Phe Leu Asn Arg | Leu Val Thr Asp His | Gly Ser Ile Asp | | |
| 1340 | 1345 | 1350 | | |
| Leu Glu Trp Leu Arg Asp | Val Pro Pro Asp Ser | Ala Lys Asp Tyr | | |
| 1355 | 1360 | 1365 | | |
| Leu Leu Ser Ile Arg Gly | Leu Gly Leu Lys Ser | Val Glu Cys Val | | |
| 1370 | 1375 | 1380 | | |
| Arg Leu Leu Thr Leu His | His Leu Ala Phe Pro | Val Asp Thr Asn | | |
| 1385 | 1390 | 1395 | | |
| Val Gly Arg Ile Cys Val | Arg Leu Gly Trp Val | Pro Ile Gln Pro | | |
| 1400 | 1405 | 1410 | | |
| Leu Pro Glu Ser Leu Gln | Leu His Leu Leu Glu | Leu Tyr Pro Val | | |
| 1415 | 1420 | 1425 | | |
| Leu Glu Thr Ile Gln Lys | Tyr Leu Trp Pro Arg | Leu Cys Lys Leu | | |
| 1430 | 1435 | 1440 | | |
| Asp Gln Gln Thr Leu Tyr | Glu Leu His Tyr Gln | Met Ile Thr Phe | | |
| 1445 | 1450 | 1455 | | |
| Gly Lys Val Phe Cys Thr | Lys Ser Lys Pro Asn | Cys Asn Ala Cys | | |
| 1460 | 1465 | 1470 | | |
| Pro Met Arg Ser Glu Cys | Lys His Phe Ala Ser | Ala Phe Ala Ser | | |
| 1475 | 1480 | 1485 | | |
| Ala Arg Leu Ala Leu Pro | Ser Pro Gln Asp Lys | Arg Leu Val Asn | | |
| 1490 | 1495 | 1500 | | |
| Met Ser Asn Gln Phe Asp | Phe Gln Asn Gly Thr | Met Pro Thr Pro | | |
| 1505 | 1510 | 1515 | | |
| His Ser Thr Pro Leu Leu | Gln Leu Glu Gly Ser | Ile His Ala Arg | | |
| 1520 | 1525 | 1530 | | |
| Asp Val His Ala Asn Asn | Thr Asn Pro Ile Ile | Glu Glu Pro Ala | | |

| 1535 | 1540 | 1545 |
|-----------------------------|---------------------|-------------|
| Ser Pro Arg Glu Glu Glu Cys | Arg Glu Leu Leu Glu | Asn Asp Ile |
| 1550 | 1555 | 1560 |
| Glu Asp Phe Asp Glu Asp Thr | Asp Glu Ile Pro Thr | Ile Lys Leu |
| 1565 | 1570 | 1575 |
| Asn Met Glu Ala Phe Ala Gln | Asn Leu Glu Asn Cys | Ile Lys Glu |
| 1580 | 1585 | 1590 |
| Ser Asn Lys Asp Phe Gln Ser | Asp Asp Ile Thr Lys | Ala Leu Val |
| 1595 | 1600 | 1605 |
| Ala Ile Ser Asn Glu Ala Ala | Ser Ile Pro Val Pro | Lys Leu Lys |
| 1610 | 1615 | 1620 |
| Asn Val His Arg Leu Arg Thr | Glu His Tyr Val Tyr | Glu Leu Pro |
| 1625 | 1630 | 1635 |
| Asp Ser His Pro Leu Met Gln | Gln Leu Ala Leu Asp | Gln Arg Glu |
| 1640 | 1645 | 1650 |
| Pro Asp Asp Pro Ser Pro Tyr | Leu Leu Ala Ile Trp | Thr Pro Asp |
| 1655 | 1660 | 1665 |
| Glu Leu Lys Asp Thr Arg Glu | Ala Pro Lys Pro Cys | Cys Asn Pro |
| 1670 | 1675 | 1680 |
| Gln Thr Glu Gly Gly Leu Cys | Ser Asn Glu Met Cys | His Asn Cys |
| 1685 | 1690 | 1695 |
| Val Ser Glu Arg Glu Asn Gln | Tyr Arg Tyr Val Arg | Gly Thr Val |
| 1700 | 1705 | 1710 |
| Leu Val Pro Cys Arg Thr Ala | Met Arg Gly Ser Phe | Pro Leu Asn |
| 1715 | 1720 | 1725 |
| Gly Thr Tyr Phe Gln Val Asn | Glu Val Phe Ala Asp | His Ser Ser |
| 1730 | 1735 | 1740 |
| Ser His Asn Pro Ile Asn Ile | Pro Arg Glu Gln Leu | Trp Asn Leu |
| 1745 | 1750 | 1755 |
| His Arg Arg Met Val Tyr Phe | Gly Thr Ser Val Pro | Thr Ile Phe |
| 1760 | 1765 | 1770 |
| Lys Gly Leu Thr Thr Glu Glu | Ile Gln His Cys Phe | Trp Arg Gly |
| 1775 | 1780 | 1785 |
| Phe Val Cys Val Arg Gly Phe | Asp Met Glu Thr Arg | Ala Pro Arg |
| 1790 | 1795 | 1800 |
| Pro Leu Cys Pro His Phe His | Leu Ala Ala Ser Lys | Leu Arg Arg |
| 1805 | 1810 | 1815 |
| Ser Ser Lys Thr Ala Ala Thr | Glu Gln Thr His | |
| 1820 | 1825 | |

<210> 6

<211> 1987

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 6

```

Met Asn Ser Arg Ala Asp Pro Gly Asp Arg Tyr Phe Arg Val Pro Leu
1      5      10      15

Glu Asn Gln Thr Gln Gln Glu Phe Met Gly Ser Trp Ile Pro Phe Thr
      20      25      30

Pro Lys Lys Pro Arg Ser Ser Leu Met Val Asp Glu Arg Val Ile Asn
      35      40      45

Gln Asp Leu Asn Gly Phe Pro Gly Gly Glu Phe Val Asp Arg Gly Phe
      50      55      60

Cys Asn Thr Gly Val Asp His Asn Gly Val Phe Asp His Gly Ala His
65      70      75      80

Gln Gly Val Thr Asn Leu Ser Met Met Ile Asn Ser Leu Ala Gly Ser
85      90      95

His Ala Gln Ala Trp Ser Asn Ser Glu Arg Asp Leu Leu Gly Arg Ser
      100      105      110

Glu Val Thr Ser Pro Leu Ala Pro Val Ile Arg Asn Thr Thr Gly Asn
      115      120      125

Val Glu Pro Val Asn Gly Asn Phe Thr Ser Asp Val Gly Met Val Asn
      130      135      140

Gly Pro Phe Thr Gln Ser Gly Thr Ser Gln Ala Gly Tyr Asn Glu Phe
145      150      155      160

Glu Leu Asp Asp Leu Leu Asn Pro Asp Gln Met Pro Phe Ser Phe Thr
      165      170      175

Ser Leu Leu Ser Gly Gly Asp Ser Leu Phe Lys Val Arg Gln Tyr Gly
      180      185      190

Pro Pro Ala Cys Asn Lys Pro Leu Tyr Asn Leu Asn Ser Pro Ile Arg
      195      200      205

Arg Glu Ala Val Gly Ser Val Cys Glu Ser Ser Phe Gln Tyr Val Pro
      210      215      220

Ser Thr Pro Ser Leu Phe Arg Thr Gly Glu Lys Thr Gly Phe Leu Glu
225      230      235      240

Gln Ile Val Thr Thr Thr Gly His Glu Ile Pro Glu Pro Lys Ser Asp
245      250      255

Lys Ser Met Gln Ser Ile Met Asp Ser Ser Ala Val Asn Ala Thr Glu
      260      265      270

Ala Thr Glu Gln Asn Asp Gly Ser Arg Gln Asp Val Leu Glu Phe Asp
      275      280      285

Leu Asn Lys Thr Pro Gln Gln Lys Pro Ser Lys Arg Lys Arg Lys Phe
290      295      300

Met Pro Lys Val Val Val Glu Gly Lys Pro Lys Arg Lys Pro Arg Lys
305      310      315      320

Pro Ala Glu Leu Pro Lys Val Val Val Glu Gly Lys Pro Lys Arg Lys
      325      330      335

```

Pro Arg Lys Ala Ala Thr Gln Glu Lys Val Lys Ser Lys Glu Thr Gly
 340 345 350
 Ser Ala Lys Lys Lys Asn Leu Lys Glu Ser Ala Thr Lys Lys Pro Ala
 355 360 365
 Asn Val Gly Asp Met Ser Asn Lys Ser Pro Glu Val Thr Leu Lys Ser
 370 375 380
 Cys Arg Lys Ala Leu Asn Phe Asp Leu Glu Asn Pro Gly Asp Ala Arg
 385 390 395 400
 Gln Gly Asp Ser Glu Ser Glu Ile Val Gln Asn Ser Ser Gly Ala Asn
 405 410 415
 Ser Phe Ser Glu Ile Arg Asp Ala Ile Gly Gly Thr Asn Gly Ser Phe
 420 425 430
 Leu Asp Ser Val Ser Gln Ile Asp Lys Thr Asn Gly Leu Gly Ala Met
 435 440 445
 Asn Gln Pro Leu Glu Val Ser Met Gly Asn Gln Pro Asp Lys Leu Ser
 450 455 460
 Thr Gly Ala Lys Leu Ala Arg Asp Gln Gln Pro Asp Leu Leu Thr Arg
 465 470 475 480
 Asn Gln Gln Cys Gln Phe Pro Val Ala Thr Gln Asn Thr Gln Phe Pro
 485 490 495
 Met Glu Asn Gln Gln Ala Trp Leu Gln Met Lys Asn Gln Leu Ile Gly
 500 505 510
 Phe Pro Phe Gly Asn Gln Gln Pro Arg Met Thr Ile Arg Asn Gln Gln
 515 520 525
 Pro Cys Leu Ala Met Gly Asn Gln Gln Pro Met Tyr Leu Ile Gly Thr
 530 535 540
 Pro Arg Pro Ala Leu Val Ser Gly Asn Gln Gln Leu Gly Gly Pro Gln
 545 550 555 560
 Gly Asn Lys Arg Pro Ile Phe Leu Asn His Gln Thr Cys Leu Pro Ala
 565 570 575
 Gly Asn Gln Leu Tyr Gly Ser Pro Thr Asp Met His Gln Leu Val Met
 580 585 590
 Ser Thr Gly Gly Gln Gln His Gly Leu Leu Ile Lys Asn Gln Gln Pro
 595 600 605
 Gly Ser Leu Ile Arg Gly Gln Gln Pro Cys Val Pro Leu Ile Asp Gln
 610 615 620
 Gln Pro Ala Thr Pro Lys Gly Phe Thr His Leu Asn Gln Met Val Ala
 625 630 635 640
 Thr Ser Met Ser Ser Pro Gly Leu Arg Pro His Ser Gln Ser Gln Val
 645 650 655
 Pro Thr Thr Tyr Leu His Val Glu Ser Val Ser Arg Ile Leu Asn Gly
 660 665 670

Thr Thr Gly Thr Cys Gln Arg Ser Arg Ala Pro Ala Tyr Asp Ser Leu
 675 680 685
 Gln Gln Asp Ile His Gln Gly Asn Lys Tyr Ile Leu Ser His Glu Ile
 690 695 700
 Ser Asn Gly Asn Gly Cys Lys Lys Ala Leu Pro Gln Asn Ser Ser Leu
 705 710 715 720
 Pro Thr Pro Ile Met Ala Lys Leu Glu Glu Ala Arg Gly Ser Lys Arg
 725 730 735
 Gln Tyr His Arg Ala Met Gly Gln Thr Glu Lys His Asp Leu Asn Leu
 740 745 750
 Ala Gln Gln Ile Ala Gln Ser Gln Asp Val Glu Arg His Asn Ser Ser
 755 760 765
 Thr Cys Val Glu Tyr Leu Asp Ala Ala Lys Lys Thr Lys Ile Gln Lys
 770 775 780
 Val Val Gln Glu Asn Leu His Gly Met Pro Pro Glu Val Ile Glu Ile
 785 790 795 800
 Glu Asp Asp Pro Thr Asp Gly Ala Arg Lys Gly Lys Asn Thr Ala Ser
 805 810 815
 Ile Ser Lys Gly Ala Ser Lys Gly Asn Ser Ser Pro Val Lys Lys Thr
 820 825 830
 Ala Glu Lys Glu Lys Cys Ile Val Pro Lys Thr Pro Ala Lys Lys Gly
 835 840 845
 Arg Ala Gly Arg Lys Lys Ser Val Pro Pro Pro Ala His Ala Ser Glu
 850 855 860
 Ile Gln Leu Trp Gln Pro Thr Pro Pro Lys Thr Pro Leu Ser Arg Ser
 865 870 875 880
 Lys Pro Lys Gly Lys Gly Arg Lys Ser Ile Gln Asp Ser Gly Lys Ala
 885 890 895
 Arg Gly Pro Ser Gly Glu Leu Leu Cys Gln Asp Ser Ile Ala Glu Ile
 900 905 910
 Ile Tyr Arg Met Gln Asn Leu Tyr Leu Gly Asp Lys Glu Arg Glu Gln
 915 920 925
 Glu Gln Asn Ala Met Val Leu Tyr Lys Gly Asp Gly Ala Leu Val Pro
 930 935 940
 Tyr Glu Ser Lys Lys Arg Lys Pro Arg Pro Lys Val Asp Ile Asp Asp
 945 950 955 960
 Glu Thr Thr Arg Ile Trp Asn Leu Leu Met Gly Lys Gly Asp Glu Lys
 965 970 975
 Glu Gly Asp Glu Glu Lys Asp Lys Lys Lys Glu Lys Trp Trp Glu Glu
 980 985 990
 Glu Arg Arg Val Phe Arg Gly Arg Ala Asp Ser Phe Ile Ala Arg Met
 995 1000 1005

| | | | | | |
|---------|---------------------|---------------------|-----------------|-------------|-------------|
| His Leu | Val Gln Gly | Asp Arg | Arg Phe Ser | Pro Trp | Lys Gly Ser |
| 1010 | | 1015 | | 1020 | |
| Val Val | Asp Ser Val | Ile Gly | Val Phe Leu Thr | Gln | Asn Val Ser |
| 1025 | | 1030 | | 1035 | |
| Asp His | Leu Ser Ser Ser | Ala | Phe Met Ser Leu | Ala | Ala Arg Phe |
| 1040 | | 1045 | | 1050 | |
| Pro Pro | Lys Leu Ser Ser Ser | Arg Glu Asp Glu | Arg | Asn Val Arg | |
| 1055 | | 1060 | | 1065 | |
| Ser Val | Val Val Glu Asp Pro | Glu Gly Cys | Ile Leu | Asn Leu Asn | |
| 1070 | | 1075 | | 1080 | |
| Glu Ile | Pro Ser Trp Gln Glu | Lys Val Gln His | Pro | Ser Asp Met | |
| 1085 | | 1090 | | 1095 | |
| Glu Val | Ser Gly Val Asp Ser | Gly Ser Lys Glu | Gln | Leu Arg Asp | |
| 1100 | | 1105 | | 1110 | |
| Cys Ser | Asn Ser Gly Ile Glu | Arg Phe Asn Phe Leu | Glu Lys Ser | | |
| 1115 | | 1120 | | 1125 | |
| Ile Gln | Asn Leu Glu Glu Glu | Val Leu Ser Ser Gln | Asp Ser Phe | | |
| 1130 | | 1135 | | 1140 | |
| Asp Pro | Ala Ile Phe Gln Ser | Cys Gly Arg Val Gly | Ser Cys Ser | | |
| 1145 | | 1150 | | 1155 | |
| Cys Ser | Lys Ser Asp Ala Glu | Phe Pro Thr Thr Arg | Cys Glu Thr | | |
| 1160 | | 1165 | | 1170 | |
| Lys Thr | Val Ser Gly Thr Ser | Gln Ser Val Gln Thr | Gly Ser Pro | | |
| 1175 | | 1180 | | 1185 | |
| Asn Leu | Ser Asp Glu Ile Cys | Leu Gln Gly Asn Glu | Arg Pro His | | |
| 1190 | | 1195 | | 1200 | |
| Leu Tyr | Glu Gly Ser Gly Asp | Val Gln Lys Gln Glu | Thr Thr Asn | | |
| 1205 | | 1210 | | 1215 | |
| Val Ala | Gln Lys Lys Pro Asp | Leu Glu Lys Thr Met | Asn Trp Lys | | |
| 1220 | | 1225 | | 1230 | |
| Asp Ser | Val Cys Phe Gly Gln | Pro Arg Asn Asp Thr | Asn Trp Gln | | |
| 1235 | | 1240 | | 1245 | |
| Thr Thr | Pro Ser Ser Ser Tyr | Glu Gln Cys Ala Thr | Arg Gln Pro | | |
| 1250 | | 1255 | | 1260 | |
| His Val | Leu Asp Ile Glu Asp | Phe Gly Met Gln Gly | Glu Gly Leu | | |
| 1265 | | 1270 | | 1275 | |
| Gly Tyr | Ser Trp Met Ser Ile | Ser Pro Arg Val Asp | Arg Val Lys | | |
| 1280 | | 1285 | | 1290 | |
| Asn Lys | Asn Val Pro Arg Arg | Phe Phe Arg Gln Gly | Gly Ser Val | | |
| 1295 | | 1300 | | 1305 | |
| Pro Arg | Glu Phe Thr Gly Gln | Ile Ile Pro Ser Thr | Pro His Glu | | |
| 1310 | | 1315 | | 1320 | |

| | | | |
|---------|---------------------|---------------------|-------------|
| Leu Pro | Gly Met Gly Leu Ser | Gly Ser Ser Ser Ala | Val Gln Glu |
| 1325 | 1330 | 1335 | |
| His Gln | Asp Asp Thr Gln His | Asn Gln Gln Asp Glu | Met Asn Lys |
| 1340 | 1345 | 1350 | |
| Ala Ser | His Leu Gln Lys Thr | Phe Leu Asp Leu Leu | Asn Ser Ser |
| 1355 | 1360 | 1365 | |
| Glu Glu | Cys Leu Thr Arg Gln | Ser Ser Thr Lys Gln | Asn Ile Thr |
| 1370 | 1375 | 1380 | |
| Asp Gly | Cys Leu Pro Arg Asp | Arg Thr Ala Glu Asp | Val Val Asp |
| 1385 | 1390 | 1395 | |
| Pro Leu | Ser Asn Asn Ser Ser | Leu Gln Asn Ile Leu | Val Glu Ser |
| 1400 | 1405 | 1410 | |
| Asn Ser | Ser Asn Lys Glu Gln | Thr Ala Val Glu Tyr | Lys Glu Thr |
| 1415 | 1420 | 1425 | |
| Asn Ala | Thr Ile Leu Arg Glu | Met Lys Gly Thr Leu | Ala Asp Gly |
| 1430 | 1435 | 1440 | |
| Lys Lys | Pro Thr Ser Gln Trp | Asp Ser Leu Arg Lys | Asp Val Glu |
| 1445 | 1450 | 1455 | |
| Gly Asn | Glu Gly Arg Gln Glu | Arg Asn Lys Asn Asn | Met Asp Ser |
| 1460 | 1465 | 1470 | |
| Ile Asp | Tyr Glu Ala Ile Arg | Arg Ala Ser Ile Ser | Glu Ile Ser |
| 1475 | 1480 | 1485 | |
| Glu Ala | Ile Lys Glu Arg Gly | Met Asn Asn Met Leu | Ala Val Arg |
| 1490 | 1495 | 1500 | |
| Ile Lys | Asp Phe Leu Glu Arg | Ile Val Lys Asp His | Gly Gly Ile |
| 1505 | 1510 | 1515 | |
| Asp Leu | Glu Trp Leu Arg Glu | Ser Pro Pro Asp Lys | Ala Lys Asp |
| 1520 | 1525 | 1530 | |
| Tyr Leu | Leu Ser Ile Arg Gly | Leu Gly Leu Lys Ser | Val Glu Cys |
| 1535 | 1540 | 1545 | |
| Val Arg | Leu Leu Thr Leu His | Asn Leu Ala Phe Pro | Val Asp Thr |
| 1550 | 1555 | 1560 | |
| Asn Val | Gly Arg Ile Ala Val | Arg Met Gly Trp Val | Pro Leu Gln |
| 1565 | 1570 | 1575 | |
| Pro Leu | Pro Glu Ser Leu Gln | Leu His Leu Leu Glu | Leu Tyr Pro |
| 1580 | 1585 | 1590 | |
| Val Leu | Glu Ser Ile Gln Lys | Phe Leu Trp Pro Arg | Leu Cys Lys |
| 1595 | 1600 | 1605 | |
| Leu Asp | Gln Arg Thr Leu Tyr | Glu Leu His Tyr Gln | Leu Ile Thr |
| 1610 | 1615 | 1620 | |
| Phe Gly | Lys Val Phe Cys Thr | Lys Ser Arg Pro Asn | Cys Asn Ala |
| 1625 | 1630 | 1635 | |

| | | | | | |
|-----------------|---------------------|-----------------|---------------------|-----------------|-------------|
| Cys Pro
1640 | Met Arg Gly
1645 | Glu Cys
1645 | Arg His Phe
1650 | Ala Ser
1650 | Ala Tyr Ala |
| Ser Ala
1655 | Arg Leu Ala
1660 | Leu Pro
1660 | Ala Pro Glu
1665 | Glu Arg
1665 | Ser Leu Thr |
| Ser Ala
1670 | Thr Ile Pro
1675 | Val Pro
1675 | Pro Glu Ser
1680 | Tyr Pro
1680 | Pro Val Ala |
| Ile Pro
1685 | Met Ile Glu
1690 | Leu Pro
1690 | Leu Pro Leu
1695 | Glu Lys
1695 | Ser Leu Ala |
| Ser Gly
1700 | Ala Pro Ser
1705 | Asn Arg
1705 | Glu Asn Cys
1710 | Glu Pro
1710 | Ile Ile Glu |
| Glu Pro
1715 | Ala Ser Pro
1720 | Gly Gln
1720 | Glu Cys Thr
1725 | Glu Ile
1725 | Thr Glu Ser |
| Asp Ile
1730 | Glu Asp Ala
1735 | Tyr Tyr
1735 | Asn Glu Asp
1740 | Pro Asp
1740 | Glu Ile Pro |
| Thr Ile
1745 | Lys Leu Asn
1750 | Ile Glu
1750 | Gln Phe Gly
1755 | Met Thr
1755 | Leu Arg Glu |
| His Met
1760 | Glu Arg Asn
1765 | Met Glu
1765 | Leu Gln Glu
1770 | Gly Asp
1770 | Met Ser Lys |
| Ala Leu
1775 | Val Ala Leu
1780 | His Pro
1780 | Thr Thr Thr
1785 | Ser Ile
1785 | Pro Thr Pro |
| Lys Leu
1790 | Lys Asn Ile
1795 | Ser Arg
1795 | Leu Arg Thr
1800 | Glu His
1800 | Gln Val Tyr |
| Glu Leu
1805 | Pro Asp Ser
1810 | His Arg
1810 | Leu Leu Asp
1815 | Gly Met
1815 | Asp Lys Arg |
| Glu Pro
1820 | Asp Asp Pro
1825 | Ser Pro
1825 | Tyr Leu Leu
1830 | Ala Ile
1830 | Trp Thr Pro |
| Gly Glu
1835 | Thr Ala Asn
1840 | Ser Ala
1840 | Gln Pro Pro
1845 | Glu Gln
1845 | Lys Cys Gly |
| Gly Lys
1850 | Ala Ser Gly
1855 | Lys Met
1855 | Cys Phe Asp
1860 | Glu Thr
1860 | Cys Ser Glu |
| Cys Asn
1865 | Ser Leu Arg
1870 | Glu Ala
1870 | Asn Ser Gln
1875 | Thr Val
1875 | Arg Gly Thr |
| Leu Leu
1880 | Ile Pro Cys
1885 | Arg Thr
1885 | Ala Met Arg
1890 | Gly Ser
1890 | Phe Pro Leu |
| Asn Gly
1895 | Thr Tyr Phe
1900 | Gln Val
1900 | Asn Glu Leu
1905 | Phe Ala
1905 | Asp His Glu |
| Ser Ser
1910 | Leu Lys Pro
1915 | Ile Asp
1915 | Val Pro Arg
1920 | Asp Trp
1920 | Ile Trp Asp |
| Leu Pro
1925 | Arg Arg Thr
1930 | Val Tyr
1930 | Phe Gly Thr
1935 | Ser Val
1935 | Thr Ser Ile |
| Phe Arg
1940 | Gly Leu Ser
1945 | Thr Glu
1945 | Gln Ile Gln
1950 | Phe Cys
1950 | Phe Trp Lys |

Gly Phe Val Cys Val Arg Gly Phe Glu Gln Lys Thr Arg Ala Pro
1955 1960 1965

Arg Pro Leu Met Ala Arg Leu His Phe Pro Ala Ser Lys Leu Lys
1970 1975 1980

Asn Asn Lys Thr
1985

<210> 7

<211> 6835

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> ADN bổ trợ dài đầy đủ ghi mã polypeptit ROSla của lúa đột biến (Ta2)

<400> 7

| | | | | | | |
|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|------|
| atgatatgtgc | atatgtatcc | tttctttttc | ttttcttttg | ttttcataac | tgtcttacag | 60 |
| aatttcatgt | tggctgggtga | cacttgtctc | actcattatt | tgggtatattt | tgactaaatg | 120 |
| caacgtgttg | gtgctcggta | gtttatattt | gtttttacgc | attcttcatt | gactgtatgt | 180 |
| atttgatgtt | gataccctgg | gctgtcttat | tttatagggtg | gatgctggga | ggccacatag | 240 |
| gaggcctgtg | tgatccaagt | gtgctgctcc | tgagttgaaa | ttgcatagcc | atatagcaac | 300 |
| tactggtgta | aacttgagag | atgaagtagt | gaaaggaaat | atgcaggatt | ttggacaatg | 360 |
| gctgcctcaa | tctcagacca | ctgccgatct | atatttctcc | agtattccaa | taccatcaca | 420 |
| gttcgatact | tccatagaga | cgcagactag | aacttctgca | gttgtatcgt | cagagaaaga | 480 |
| atctgctaata | tcgttcgtcc | ctcataatgg | tactgggctt | gttgaacgca | ttagcaatga | 540 |
| tgctgggcta | actgaagtag | ttggaagtag | tgctggacca | actgaatgta | ttgacttgaa | 600 |
| caagacacca | gcacggaaac | ccaagaagaa | aaagcacagg | ccaaagggtgc | taaaggacga | 660 |
| ttaaaccatcg | aagacaccta | aatctgctac | tccaatacct | tcaacagaaa | aggtagaaaa | 720 |
| accatctgga | aagagaaaat | atgtccgcaa | gaagacatct | ccaggccaac | ctcctgcaga | 780 |
| acaggcagct | agctcacact | gcagatctga | gctgaagtca | gttaaacgaa | gtttggactt | 840 |
| tggtgagaaa | gtactgcaag | agagtacaca | atctggatct | caagttccgg | tggcagaaat | 900 |
| atgtactggt | cccaagcgtc | aatcaatacc | ttctaccatc | caaagagatt | cgcaaagcca | 960 |
| gttggtcttg | cacgtgggtt | ctagcaccag | ctcaattcac | acttcagcta | gtcagatggt | 1020 |
| taatgcacat | ttgtttcctc | ctgataacat | gccaaatgga | gtattgcttg | acctcaataa | 1080 |
| ttctactagt | cagttacaaa | acgaacatgc | taaatttggtg | gacagtccgg | cacgtctttt | 1140 |
| tggttccaga | ataagacaga | catcaggtaa | aaattctttg | ctagaaatct | atgctggcat | 1200 |
| gtcagataga | aatgtacctg | atctcaacag | ttcaatcagt | cagaacgcata | gcatgtctac | 1260 |
| tgatttttgt | caatacttgc | tttcatcctc | acaagcttct | gtaagggaaa | cacaaatggc | 1320 |
| caatcagatg | cttaatggtc | ataggatgcc | agaaaatcca | attacaccta | gtcattgtat | 1380 |
| tgaaggggct | gcattgaagg | aacatttgaa | tcatgttctc | cacgcaaaag | ccgcagtgat | 1440 |
| gaatggccaa | atgccccata | gttacagggt | ggcgcaaaat | cccatcctac | ctccaaatca | 1500 |
| tattgaaggg | tatcaagtga | tggaaaattt | gagtgaactt | gtcacgacaa | atgactatct | 1560 |
| aactgctagt | cctttcagtc | aaactggagc | tgcaaatagg | cagcataata | ttgggtgactc | 1620 |
| catgcataata | catgcattgg | atcctagaag | agagagtaat | gtttcaagtg | gttcttggat | 1680 |
| atcattaggt | gtgaacttta | accaacaaaa | taatggatgg | gcatctgcag | gtgcgtccga | 1740 |
| tgtctgcgagc | tcaatgccc | catatttttc | agaacctcac | aaaagaatga | ggacagctta | 1800 |
| tcttaacaat | tatccaaatg | gagtcgtggg | acatttttct | acctcatcta | cggtattgtc | 1860 |
| aaataatgag | aatgaaaatg | tggcctcagc | aatcaactca | aacgttttta | cccttgctga | 1920 |
| tgcacaaga | ttgatagccc | gtgagaaatc | acgagcttcc | caaagaatga | tcagttttag | 1980 |
| atcatctaaa | aatgatatgg | ttaacagatc | agaaatggtc | catcaacatg | gcagacctgc | 2040 |
| tccgcattggc | tctgcatgca | gggagtttat | tgaagtacct | gacaaacagt | tcgggctcat | 2100 |
| gacagaagaa | ctcacacaat | tacctagtat | gccaaataac | ccacaaaggg | aaaaatatat | 2160 |
| tccgcaaaact | ggaagttgcc | aacttcagtc | tttggaaat | gacatggtta | aagggcataa | 2220 |
| cttggcaggt | gaattgcata | agcaagtaac | ttcacctcaa | gttggttatc | agagcaattt | 2280 |
| ctgtgttacc | cctcctgatg | tgctcggcag | aagaaccagt | ggggagcatt | taagaacctt | 2340 |
| tatagctcca | acacatgcat | cgacatgtaa | ggacactctg | aaagctttta | gttgtcaact | 2400 |
| ggagagttct | agagacatta | ttaggcctcc | tgtcaatcct | atagggccat | cctctgccga | 2460 |
| tgttccaaga | actgataacc | atcaagtcaa | ggtttctgaa | gaaaccgtta | cagccaaact | 2520 |
| ccctgagaag | cgaaaagtag | gacgtcccag | aaaagagtta | aaacctggtg | agaaacccaa | 2580 |
| acctagaggc | cgtccaagga | agggaaaagt | tgttgggtgga | gaacttgcat | caaaggatag | 2640 |
| tcacactaat | ccattgcaaa | atgagagtac | ttcatgttct | tatggtcctt | atgcagggga | 2700 |
| ggcttctgtt | ggaagagcag | ttaaagcaaa | tagagttgga | gaaaacattt | ctggagctat | 2760 |

| | | | | | | |
|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------|
| ggtatcccta | ctggattcct | tagatattgt | tattcaaaaag | ataaagggtct | tggacataaa | 2820 |
| caaatcagaa | gaccctgtga | cagctgaacc | tcatggtgct | cttgtccctt | acaatggaga | 2880 |
| atttggctct | attgttcctt | ttgaggggaa | agtgaaga | aaacgctctc | gagccaaagt | 2940 |
| ggatcttgac | cctgtaactg | ctttaatgtg | gaagttacta | atgggaccag | atatgagtga | 3000 |
| tttgtctgaa | ggtatggata | aggataaaga | gaaatggcta | aatgaagaaa | gaaaaatatt | 3060 |
| ccaagggcgt | gttgattcat | ttattgctcg | aatgcattct | gttcaaggag | atcggcggtt | 3120 |
| ttctccttgg | aaaggatcag | ttgtagattc | tgtagtggga | gtattttctta | cacagaatgt | 3180 |
| ttcggaccat | ctttccagct | ctgcatttat | ggctcttgc | gcaaaatttc | ctgtaaagcc | 3240 |
| agaagcctct | gaaaaacccg | caaagtgtat | gtttcataca | atttcagaaa | atggtgattg | 3300 |
| ttctgggttg | tttggttaatt | ctgtcaagct | acaggggtgag | atccttggtc | aggaggccag | 3360 |
| caacacagca | gcctctttta | tcacaaccga | ggataaggaa | ggaagtaaca | gtgtggaatt | 3420 |
| gcttggaagt | tcttttgggg | atggagtggg | tgggtgcagca | ggagtttatt | ctaataattta | 3480 |
| tgagaatctg | ccagctagac | tgcattgctac | taggcgtcca | gtcgttcaaa | ctggaaacgc | 3540 |
| tgctgaagcg | gaagatgggt | cactggaggg | tgttgtttca | tcagaaaact | ccactatttc | 3600 |
| atctcaaaat | tcatcagatt | atctattttca | catgtctgat | catatgtttt | cgagcatggt | 3660 |
| actaaatttc | actgccgaag | acattggcag | cagaaatatg | cccaaagcaa | caagaaccac | 3720 |
| atatacagaa | cttctacgaa | tgcaggagct | gaagaacaag | tctaataaaa | ccattgaatc | 3780 |
| atcagagtat | catgggggttc | cagtctcatg | tagtaacaac | attcaagtgc | tcaatggaat | 3840 |
| acaaaatata | ggcagtaaac | atcagccttt | acattcctct | atttcataatc | accagactgg | 3900 |
| ccaagttcac | ctcccagaca | tagtacatgc | gagtgtattg | gagcaatcag | tatacactgg | 3960 |
| ccttaataga | gtgcttgatt | ctaattgttac | acaaaccagt | tattatcctt | cacctcatcc | 4020 |
| tggaattgcc | tgtacaatg | aaacacaaaa | ggctgactct | ttaagcaaca | tgttatatgg | 4080 |
| tatagataga | tcagataaga | ctacttccct | gtctgagcct | acaccaagaa | tcgataactg | 4140 |
| ttttcaacca | ttaagttcag | agaaaatgtc | atttgctagg | gaacagtcct | cttctgaaaa | 4200 |
| ttatctttca | aggaatgaag | ctgaagctgc | atttggttaa | cagcatggaa | catcaaattgt | 4260 |
| gcaaggtgat | aatactgtca | ggacagagca | aaatggagggt | gaaaattctc | aatcaggata | 4320 |
| cagccaacag | gatgataatg | ttggattttca | aacagcgaca | accagtaatc | tttattcttc | 4380 |
| aaacttatgc | caaaaccaga | aagcaaattc | tgaagtacta | cacggagttt | cttccaactt | 4440 |
| gatagagaat | tctaaagatg | acaaaaagac | ttcccccaaa | gttccagtcg | atggatcaaa | 4500 |
| agcaaagagg | ccaagagttg | gggctggtaa | aaagaaaaaca | tatgattggg | atatgttgag | 4560 |
| aaaagaagt | ctttacagtc | atggtaataa | agaaagatcc | cagaatgcta | aggactcaat | 4620 |
| tgattgggaa | acaataagac | aagcagaggt | gaaggaaata | tctgacacaa | ttagagagcg | 4680 |
| aggaatgaat | aacatgctgg | cagaacggat | aaaagacttc | ctaaaccgat | tggtgagaga | 4740 |
| ccatgggagc | atcgatcttg | agtggttgcg | ctatgtcgat | tcagataaa | cgaaggacta | 4800 |
| tctcttaagc | attagaggac | ttggacttaa | aagtgttgag | tgtgtgcgtc | ttttgacact | 4860 |
| ccatcacatg | gcttttcttg | tggatacaaa | tgttggtaga | atatgtgtga | ggcttgatg | 4920 |
| ggtgccactt | cagcccctac | ccgagtctct | tcagttgcac | ctgttgagga | tgtatccaat | 4980 |
| gctggagaac | atacagaaat | acctctggcc | gaggttatgc | aagcttgatc | aacggacatt | 5040 |
| gtatgagctt | cactatcaaa | tgataacttt | tggaaaggta | ttttgtacaa | aaagtaagcc | 5100 |
| caattgcaac | gcatgcccac | tgagagctga | gtgcaagcac | tttgcaagtg | catttgccag | 5160 |
| tgcaaggctc | gctcttccctg | gacctgaaga | gaagagttta | gttacatctg | gaaccccaat | 5220 |
| agctgcagaa | accttccacc | agacatatat | aagttctagg | cctgtagtaa | gtcagcttga | 5280 |
| gtggaattca | aacacctgtc | accatgggtat | gaacaatcgc | cagccaatca | ttgaggagcc | 5340 |
| agcaagccca | gaacctgaac | atgagacaga | agagatgaaa | gagtgtgcaa | tagaggatag | 5400 |
| ttttgtcgat | gatccagaag | aaatccctac | tatcaagctt | aattttgagg | agtttacaca | 5460 |
| gaacctgaag | agttatatgc | aagcaataaa | cattgagatt | gaagatgctg | atatgtcaaa | 5520 |
| ggctttgggtc | gctataactc | ctgaagttgc | ttctatccca | actcctaagc | tcaagaattgt | 5580 |
| cagtcgccta | aggacagagc | accaagtcta | tgaactgcc | gattcacatc | cacttcttga | 5640 |
| aggattcaac | caaagagaac | cagatgatcc | ttgcccatac | ctactctcta | tatggacccc | 5700 |
| aggtgaaaca | gctcaatcaa | ctgatgcacc | taagtcggtc | tgcaattcac | aagagaatgg | 5760 |
| tgaactatgt | gcaagcaata | catgcttttag | ttgcaacagt | ataagagaag | cgcaggccca | 5820 |
| aaaagttcga | gggacactgc | tgataccatg | ccgaacagca | atgagaggaa | gctttccact | 5880 |
| taattgggaca | tattttcaag | tcaatgagtg | ttcaaatgtt | atgcggcagg | tattttgctga | 5940 |
| tcattgactca | agccggaacc | cgattgatgt | tccaaggagt | tggatatgga | atctccctag | 6000 |
| gagaactgtt | tacttttgaa | cttcaattcc | gacaatattt | aaaggtttga | caactgaaga | 6060 |
| aatacaacat | tgtttttgga | gaggatttgt | gtgcgtgaga | ggcttttgata | ggacatcaag | 6120 |
| agcaccacga | ccactgtatg | caagactcca | ctttccagca | agcaaaatta | ccaggaataa | 6180 |
| aaaatctgca | ggttctgtct | caggaagaga | tgatgaatag | gccatctgga | aaaccagaaa | 6240 |
| ggaaataaag | aggaggtaca | tatgatctgc | cagaagatca | ctgacctgaa | atggatcgct | 6300 |
| gaccaataag | ttgccgtagg | caattcaatt | atttctggcc | atatacatct | gctgaaagtt | 6360 |
| atgaactcca | gccactgacg | aattcggtgt | gctgggtatc | ttcggcaaca | tgatccatca | 6420 |
| tacagattct | atgcttggtt | gttgcaagca | attcttatgc | ggtgacagtt | gctgctgata | 6480 |
| gggagaaaag | gcatgtccgg | cggctcagcg | gctctaactg | tactttcata | tgagtggaac | 6540 |

| | | | | | | |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------|
| cgattgttgt | acatgtgaaa | agtttgccat | tcaaaatggt | cattcatggt | gttaggtcat | 6600 |
| tcatgtagtc | gatgtcaaat | taatcatcaa | ttatttgatt | tgattcattc | acaagttaa | 6660 |
| ttggctctag | atacttgtga | gctgcaggcc | agcaatgtca | taatgtatgt | cgggaaaagg | 6720 |
| tagatataaa | tcgtcagcat | ttacctgaaa | tacctttcct | ctgtccataa | atacaaggga | 6780 |
| ttttgggttg | ttaagcgtat | tttaagttcg | atatgaaaat | tactttgatg | ttccg | 6835 |

<210> 8

<211> 6814

<212> ADN

<213> *Oryza sativa*

<400> 8

| | | | | | | |
|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|------|
| atgatatgtgc | atatgtatcc | tttctttttc | ttttcttttg | ttttcataac | tgtctttacag | 60 |
| aatttcatgt | tggctgggtga | cacttgtctc | actcattatt | tgggtataatt | tgactaaatg | 120 |
| caacgtgttg | gtgctcggta | gtttatattt | gtttttacgc | attcttcatt | gactgtatgt | 180 |
| atttgatggt | gataccctgg | gctgtcttat | tttataggtg | gatgctggga | ggccacatag | 240 |
| gaggcctgtg | tgatccaagt | gtgctgctcc | tgagttgaaa | ttgcatagcc | atatagcaac | 300 |
| tactgggtga | aacttgagag | atgaagtagt | gaaaggaaat | atgcaggatt | ttggacaatg | 360 |
| gctgcctcaa | tctcagacca | ctgccgatct | atattttctcc | agtattccaa | taccatcaca | 420 |
| gttcgatact | tccatagaga | cgcagactag | aacttctgca | gttgatcgt | cagagaaaga | 480 |
| atctgctaat | tcgttcgtcc | ctcataatgg | tactgggctt | gttgaacgca | ttagcaatga | 540 |
| tgctgggcta | actgaagtag | ttggaagtag | tgctggacca | actgaatgta | ttgacttgaa | 600 |
| caagacacca | gcacggaaac | ccaagaagaa | aaagcacagg | ccaaagggtg | taaaggacga | 660 |
| taaaccatcg | aagacaccta | aatctgctac | tccaatacct | tcaacagaaa | aggtagaaaa | 720 |
| accatctgga | aagagaaaa | atgtccgcaa | gaagacatct | ccaggccaac | ctcctgcaga | 780 |
| acaggcagct | agctcacact | gcagatctga | gctgaagtca | gttaaaccgaa | gtttggactt | 840 |
| tggtggagaa | gtactgcaag | agagtacaca | atctggatct | caagttccgg | tggcagaaat | 900 |
| atgtactggt | cccaagcgtc | aatcaatacc | ttctaccatc | caaagagatt | cgcaaagcca | 960 |
| gttggtcttg | cacgtgggtt | ctagcaccag | ctcaattcac | acttcagcta | gtcagatggg | 1020 |
| taatgcacat | ttgtttcctc | ctgataacat | gccaaatgga | gtattgcttg | acctcaataa | 1080 |
| ttctactagt | cagttacaaa | acgaacatgc | taaatttggtg | gacagtccgg | cacgtctttt | 1140 |
| tggttccaga | ataagacaga | catcaggtaa | aaattctttg | ctagaaatct | atgctggcat | 1200 |
| gtcagataga | aatgtacctg | atctcaacag | ttcaatcagt | cagacgcata | gcattgtctac | 1260 |
| tgatttttgct | caatacttgc | tttcatectc | acaagcttct | gtaagggaaa | cacaaatggc | 1320 |
| caatcagatg | cttaatggtc | ataggatgcc | agaaaatcca | attacaccta | gtcattgtat | 1380 |
| tgaaagggtc | gcattgaagg | aacatttgaa | tcatgttctc | cacgcaaaag | ccgcagtgat | 1440 |
| gaatggccaa | atgccccata | gttacagggt | ggcgcaaaat | cccatacctac | ctccaaatca | 1500 |
| tattgaaggg | tatcaagtga | tggaaaattt | gagtgaactt | gtcacgacaa | atgactatct | 1560 |
| aactgctagt | cctttcagtc | aaactggagc | tgcaaatagg | cagcataata | ttgggtgactc | 1620 |
| catgcatata | catgcattgg | atcctagaag | agagagtaat | gcttcaagtg | gttcttggat | 1680 |
| atcattaggt | gtgaacttta | accaacaaaa | taatggatgg | gcactctgcag | gtgctgccga | 1740 |
| tgtctgcgagc | tcacatgccc | catatttttc | agaacctcac | aaaagaatga | ggacagctta | 1800 |
| tcttaacaat | tatccaaatg | gagtcgtggg | acatttttct | acctcatcta | cggatttgte | 1860 |
| aaataatgag | aatgaaaatg | tggcctcagc | aatcaactca | aacgttttta | cccttgctga | 1920 |
| tgacacaaaga | ttgatagccc | gtgagaaatc | acgagcttcc | caaagaatga | tcagttttag | 1980 |
| atcatctaaa | aatgatattg | ttaacagatc | agaaatggtc | catcaacatg | gcagacctgc | 2040 |
| tccgcatggc | tctgcatgca | gggagtctat | tgaagtacct | gacaaaacagt | tcgggctcat | 2100 |
| gacagaagaa | ctcacacaat | tacctagtat | gccaaataac | ccacaaaggg | aaaaatatat | 2160 |
| tccgcaaact | ggaagttgcc | aacttcagtc | tttggaacat | gacatggtta | aagggcataa | 2220 |
| cttggcaggt | gaattgcata | agcaagtaac | ttcacctcaa | gttgttattc | agagcaattt | 2280 |
| ctgtgttacc | cctcctgatg | tgctcggcag | aagaaccagt | ggggagcatt | taagaaccct | 2340 |
| tatagctcca | acacatgcat | cgacatgtaa | ggacactctg | aaagctttta | gttgtcaact | 2400 |
| ggagagttct | agagacatta | ttaggcctcc | tgtcaatcct | atagggccat | cctctgcoga | 2460 |
| gtttccaaga | actgataacc | atcaagtcaa | ggtttctgaa | gaaaccgtta | cagccaaact | 2520 |
| ccctgagaag | cgaaaagtag | gacgtcccag | aaaagagtta | aaacctgggtg | agaaacccaa | 2580 |
| acctagaggc | cgtccaagga | agggaaaagt | tggttggtgga | gaacttgcat | caaaggatag | 2640 |
| tcacactaat | ccattgcaaa | atgagagtac | ttcatgttct | tatggctcct | atgcagggga | 2700 |
| ggcttctgtt | ggaagagcag | ttaaagcaaa | tagagttgga | gaaaacattt | ctggagctat | 2760 |
| ggtatcccta | ctggattcct | tagatatatt | tattcaaaaag | ataaaggctc | tggacataaa | 2820 |
| caaatacagaa | gacctgtgta | cagctgaacc | tcatggtgct | cttgtccctt | acaatggaga | 2880 |
| atttggtcct | attgttcctt | ttgaggggaa | agtgaaaaga | aaacgctctc | gagccaaagt | 2940 |
| ggatcttgac | cctgtaactg | ctttaatgtg | gaagtacta | atgggaccag | atatgagtga | 3000 |
| ttgtgctgaa | ggtatggata | aggataaaga | gaaatggcta | aatgaagaaa | gaaaaatatt | 3060 |
| ccaagggcgt | gttgattcat | ttattgctcg | aatgcatcta | gttcaaggag | atcggcggtt | 3120 |

| | | | | | | |
|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------|
| ttctccttgg | aaaggatcag | ttgtagattc | tgtagtggga | gtattttctta | cacagaatgt | 3180 |
| ttcggaccat | ctttccagct | ctgcatttat | ggctcttgct | gcaaaatttc | ctgtaaagcc | 3240 |
| agaagcctct | gaaaaaaccg | caaagtgtat | gtttcataca | atttcagaaa | atggtgattg | 3300 |
| ttctgggttg | tttggttaatt | ctgtcaagct | acaggggtgag | atccttggtc | aggaggccag | 3360 |
| caacacagca | gcctctttta | tcacaaccga | ggataaggaa | ggaagtaaca | gtgtggaatt | 3420 |
| gcttggaagt | tcttttgggg | atggagtggg | tgggtgcagca | ggagtttatt | ctaataattta | 3480 |
| tgagaatctg | ccagctagac | tgcattgctac | taggcgtcca | gtcgttcaaa | ctggaaaacgc | 3540 |
| tgtcgaagcg | gaagatgggt | cactggaggg | tgttgtttca | tcagaaaact | ccactatttc | 3600 |
| atctcaaaat | tcattcagatt | atctattttca | catgtctgat | catatgtttt | cgagcatggt | 3660 |
| actaaatttc | actgccgaag | acattggcag | cagaaatatg | cccaaagcaa | caagaaccac | 3720 |
| atatacagaa | cttctacgaa | tgcaggagct | gaagaacaag | tctaatagaa | ccattgaaac | 3780 |
| atcagagtat | catgggggttc | cagtctcatg | tagtaacaac | attcaagtgc | tcaatggaat | 3840 |
| acaaaatata | ggcagtaaac | atcagccttt | acattcctct | atttcatatc | accagactgg | 3900 |
| ccaagtccac | ctcccagaca | tagtacatgc | gagtgttttg | gagcaatcag | tatacactgg | 3960 |
| ccttaataga | gtgcttgatt | ctaattgttac | acaaaccagt | tattatcctt | cacctcatcc | 4020 |
| tgggaattgcc | tgttaacaatg | aaacacaaaa | ggctgactct | ttaagcaaca | tggtatatgg | 4080 |
| tatagataga | tcagataaga | ctacttccct | gtctgagcct | acaccaagaa | tcgataactg | 4140 |
| ttttcaacca | ttaagtccag | agaaaatgtc | atlttgctagg | gaacagtcct | cttctgaaaa | 4200 |
| ttatctttca | aggaatgaag | ctgaagctgc | atltgtttaa | cagcatggaa | catcaaagt | 4260 |
| gcaaggtgat | aatactgtca | ggacagagca | aaatggaggt | gaaaattctc | aatcaggata | 4320 |
| cagccaacag | gatgataatg | ttggatttca | aacagcgaca | accagtaatc | tttattcttc | 4380 |
| aaacttatgc | caaaaccaga | aagcaaatlc | tgaagtacta | cacggagttt | cttccaactt | 4440 |
| gatagagaat | tctaagatg | acaaaaagac | ttccccaaaa | gttccagtcg | atggatcaaa | 4500 |
| agcaaaagag | ccaagagttg | gggctggtaa | aaagaaaaca | tatgattggg | atatgttgag | 4560 |
| aaaagaagtt | ctttacagtc | atggtaataa | agaaagatcc | cagaatgcta | aggactcaat | 4620 |
| tgattgggaa | acaataagac | aagcagaggt | gaaggaaata | tctgacacaa | ttagagagcg | 4680 |
| aggaatgaat | aacatgctgg | cagaacggat | aaaagacttc | ctaaaccgat | tggtgagaga | 4740 |
| ccatgggagc | atcgatcttg | agtgggttgc | ctatgtcgat | tcagataaag | cgaaggacta | 4800 |
| tctcttaagc | attagaggac | ttggaactta | aagtgttgag | tgtgtgcgtc | ttttgacact | 4860 |
| ccatcacatg | gcttttctct | tggatacaaa | tggttgtaga | atatgtgtga | ggcttggaatg | 4920 |
| gggtgccactt | cagcccctac | ccgagtctct | tcagttgcac | ctggttgaga | tgtatccaat | 4980 |
| gctggagAAC | atacagaaat | acctctggcc | gaggttatgc | aagcttgatc | aacggacatt | 5040 |
| gtatgagctt | cactatcaaa | tgataacttt | tggaaaggta | ttttgtacaa | aaagtaagcc | 5100 |
| caattgcaac | gcatgcccaa | tgagagctga | gtgcaagcac | tttgcaagtg | catttgccag | 5160 |
| tgcaaggctc | gctcttctct | gacctgaaga | gaagagttta | gttacatctg | gaaccccaat | 5220 |
| agctgcagaa | accttccacc | agacatatat | aagttctagg | cctgtagtaa | gtcagcttga | 5280 |
| gtggaattca | aacacctgtc | accatgggtat | gaacaatcgc | cagccaatca | ttgaggagcc | 5340 |
| agcaagccca | gaacctgaac | atgagacaga | agagatgaaa | gagtgtgcaa | tagaggatag | 5400 |
| ttttgtcgat | gatccagaag | aaatccctac | tatcaagctt | aattttgagg | agtttacaca | 5460 |
| gaacctgaag | agttatatgc | aagcaaataa | cattgagatt | gaagatgctg | atatgtcaaa | 5520 |
| ggctttgggtc | gctataactc | ctgaagttgc | ttctatccca | actcctaagc | tcaagaatgt | 5580 |
| cagtcgccta | aggacagagc | accaagtcta | tgaactgcca | gattcacatc | cacttcttga | 5640 |
| aggattcaac | caaagagaac | cagatgatcc | ttgcccatac | ctactctcta | tatggacccc | 5700 |
| aggtgaaaca | gctcaatcaa | ctgatgcacc | taagtcgggtc | tgcaattcac | aagagaatgg | 5760 |
| tgaactatgt | gcaagcaata | catgcttttag | ttgcaacagt | ataagagaag | cgcaggccca | 5820 |
| aaaagttcga | gggacactgc | tgataccatg | ccgaacagca | atgagaggaa | gctttccact | 5880 |
| taatgggaca | tattttcaag | tcaatgaggt | atltgtctgat | catgactcaa | gccggaaccc | 5940 |
| gattgatgtt | ccaaggagtt | ggatatggaa | tctccctagg | agaactgttt | actttggaac | 6000 |
| ttcaattccg | acaatattta | aaggtttgac | aactgaagaa | atacaacatt | gcttttgagg | 6060 |
| aggattttgtg | tgctgtagag | gctttgatag | gacatcaaga | gcaccagac | cactgtatgc | 6120 |
| aagactccac | tttccagcaa | gcaaaattac | caggaataaa | aaatctgcag | gttctgctcc | 6180 |
| aggaagagat | gatgaatagg | ccatctggaa | aaccagaaaag | gaaataaaga | ggaggtacat | 6240 |
| atgatctgcc | agaagatcac | tgacctgaaa | tggatcgctg | accaataagt | tgccgtaggc | 6300 |
| aattcaatta | tttctggcca | tatacatctg | ctgaaagtta | tgaactccag | ccactgacga | 6360 |
| attcgtgggtg | ctgggtattct | tgggcaacat | gatccatcat | acagattcta | tgcttggttg | 6420 |
| ttgcaagcaa | ttcttatgcg | gtgacagttg | ctgctgatag | ggagaaaagg | catgtccggc | 6480 |
| ggctcagcgg | ctctaactgt | actttcataat | gagtggaaac | gattgttgta | catgtgaaaa | 6540 |
| gtttgccatt | caaaatgggtc | attcatgttg | ttaggtcatt | catgtagtcg | atgtcaaat | 6600 |
| aatcatcaat | tatttgattt | gattcattca | caagtttaaat | tggctctaga | tacttgtgag | 6660 |
| ctgcaggcca | gcaatgtcat | aatgtatgtc | gggaaaagggt | agatataaat | cgtcagcatt | 6720 |
| tacctgaaat | accttctctc | tgtccataaa | tacaagggtat | tttgggttgt | taagcgtatt | 6780 |
| ttaagttcga | tatgaaaatt | actttgatgt | tccg | | | 6814 |

<210> 9
 <211> 16885
 <212> ADN
 <213> Oryza sativa
 <400> 9

| | | | | | | |
|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------|
| agggcattgt | agacattagc | atttcaaacc | cagtaatcca | tgcctccaat | aataataagc | 60 |
| taaaataaac | aaggcctaag | ttaatcatgc | taactcgtgc | tggctcaggc | atgcgagtc | 120 |
| tctagtcgga | ctaggcacag | ttcgagcaac | atggttggtc | atggggcacc | ctatgcttgg | 180 |
| gocgtacca | cggcacgtca | caaccgggtt | gttatagcgg | gcctgacaca | aagcatgcaa | 240 |
| gcattgcattg | cccagtcaca | cttccttttt | tttccatatt | tttcatgtgg | gaatcaattt | 300 |
| tcttatgggtt | tccctatatt | tttatgattt | ttctattttt | tttatggacc | agtcaggccg | 360 |
| atagatcgtc | cttggtgcat | gggcctactt | atgcctgggc | tatcacgaca | tgcctgttag | 420 |
| cctccttggtg | tctgcttag | gttgaggcct | cggcatgtgg | gcccgcacat | gtcatgcaac | 480 |
| tgtggtgctc | atgccatgct | gggctggg | acccgtttcg | acacaaatga | acgaagcgta | 540 |
| acgttaattgc | atgcacttct | tacactcact | ggagaggctc | ctagtttgc | tagctgcta | 600 |
| gcagcaaaaag | tgcgttgctc | ctccatgtcc | ggatcgaaagc | ccatcatcaa | tgtatttaga | 660 |
| tcagagccac | acgttgagct | gcgcttcacg | acgggaccac | cgccaaaaca | cttgtttttc | 720 |
| ttccgttttaa | tattctagtt | tacaactttc | tataataaaa | tattaattca | aggttttaac | 780 |
| atttttagttg | aaagttttaa | aaattgtgtt | gaaactttta | aattttatac | tggagtttc | 840 |
| aaattttctg | ttgtaagttt | caaacttttg | attgactttt | tttttagcaa | tgttttaaat | 900 |
| ttgagttaaa | agtttcaaat | atgggtagtg | tttttagatt | ttgtactgaa | tgttttagaa | 960 |
| cttgagttga | aacttttaga | attlaagttg | agaattttta | attttgagtt | gaattgtttg | 1020 |
| aaattttggg | ttgagttttt | taaactgtcg | ataaaaaaat | aaatttgagc | taaaagtttc | 1080 |
| aaattttgag | tagagttttt | caaatttgag | ttgattgttt | taaaccattg | aaaaagctgg | 1140 |
| agcatgggaa | ctcaagagtt | acgattcttt | tttttttcag | ggaagggttg | aattctattg | 1200 |
| attaaacaga | gtgattacaa | tcccgtagga | caatatcatg | aatactagga | ggagcatcaa | 1260 |
| gtctccacac | tgcattattg | ctagtccttt | tggtttaattg | agctagttca | tgagacactc | 1320 |
| tattacaccc | tcttccaaca | tgatttagat | ggacttcagg | aagtaaacca | acaaaactcc | 1380 |
| tcgcttccac | caacaaggca | caccatcttg | atttaggtcc | tctttgttta | ggcttaggtt | 1440 |
| tattggccta | gacttttaag | tcagcttatt | agcttatatg | atttataagc | cgggtgattt | 1500 |
| aatgtccta | gttttagtgt | tgagtcatac | atctacctca | cataagccaa | aaaagcttct | 1560 |
| ccaacctagc | ttttggctta | atagtgttag | agtggcttat | ggcttcaaaa | aagccaaacg | 1620 |
| gaaaagctgc | ttgtttgttt | aggcttagac | ttttcgactt | ataagttggc | ttataagcct | 1680 |
| aaacaaagaa | agccttattt | tgcccaaggg | ccatgagctt | aatcacttct | gagcaatcag | 1740 |
| tttcgaggat | aatagacata | ttgatccatt | tagccgataa | tgccaatcct | tctttgcacg | 1800 |
| ccatgacttc | aacttcttcg | ggctgagggtg | ctgtgaaaat | gggtccgccc | tgaggaaaga | 1860 |
| agtacttccc | ctctacaatt | cttgataaoc | actcccactc | cgacgtctct | tgttttaaat | 1920 |
| tattcaaaat | cacttcaaat | atcgaattgc | taaaaatgaa | cttattgtgc | tcataatttca | 1980 |
| ggtaggccca | tccaaaccca | tcaagcgagc | tatagttatc | gatgccacgc | gtcaagcact | 2040 |
| cagctggcgt | atgtgtgagg | gagatatttg | aaagttggca | aaattacata | aacctccca | 2100 |
| tacccccatt | ttgttataga | agcccaccca | ccgaacacta | ccagaccgag | attgctctct | 2160 |
| tcattggatag | ttggttatgc | ccatattctt | caaatatgac | accaaattta | gtgttagggg | 2220 |
| caaaattgca | taaacaaagt | tgatatggta | ctatgcgaat | ctacgttgaa | aaaaatggac | 2280 |
| cgaatcagct | actcactttg | tgttgggttg | gtagggtttt | tattttaaca | aaatggatta | 2340 |
| tcaagtggaa | tttcaaaaaca | aaatgactat | gcaactccat | tccaatttat | catattgttc | 2400 |
| atgtgcgcaa | catcgatggt | gggagtggag | tcaactcagtc | tggactctgt | agtggagtta | 2460 |
| cttggtcacg | tactcacatg | acatatcttc | aaatggatag | ctgattcggc | ctgtttcttt | 2520 |
| aaatgtgata | acaaataaag | tgtcaaggca | aaatagccta | tgccaattca | ctgtgaatcc | 2580 |
| acgtcgaaaag | aaataagcca | aattagccac | tcacatgtat | tggttgggtg | ggcttttaac | 2640 |
| aaaacaaacc | tcaaaacaaa | atgattgagt | gactccactc | catttttatca | tattattcac | 2700 |
| gtgcaaggca | gcggtggtga | gagtgggggc | cactcaatct | ggactctaga | gtagagttac | 2760 |
| tcagtcacat | gagttattgt | taaatgggta | gttaattttg | cctatttctt | caaatgcgac | 2820 |
| aaacaaataaa | gtgtcaaggc | aaaaaaaac | ataaagcata | tcttgctgca | aatccacgtc | 2880 |
| aaaagaaaat | aagccaaatt | agctacgtat | gcgcattgtt | tgtgtggggg | ttttcaacaa | 2940 |
| aatgggttat | cgtgtggatc | tcaaaacaaa | atgactcaga | gtaactccgc | tctattttat | 3000 |
| cacattattc | acgtgtaagg | cagcgatgga | gagagtgaac | tatagtaaa | ttactcagtc | 3060 |
| gcacactctt | aaatgaatag | ttgattccac | ccatttctta | aaatgtaaca | acaaacaaag | 3120 |
| tgccaggca | aaaatacaca | aacccaaatt | agctacttat | gtttattagt | taggtgagtt | 3180 |
| ttacaacaaa | ataatatatc | atacgaaatc | ccaaaacaaa | atggctgagc | gactccgttc | 3240 |
| tatttttatca | cattattcac | gtgtcggaca | gcgacggcgg | ggcagtgaag | tcaactcagtc | 3300 |
| tggactctct | gaagtggagt | tactactcac | gtgacgttac | tttttttggg | aagtgtgtgc | 3360 |
| gctgcgatca | gaagttagca | agcgtgcgcg | aaatagcatt | cccgcgcctc | acctccctc | 3420 |

| | | | | | | |
|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------|
| ccccctccc | cccgcatcgt | ttctctcac | tctcctttcc | tcactttttcc | tctctctgac | 3480 |
| cgaatctctc | ccactcctct | ctactcctct | caaccctage | tgcctctctc | cctctctgct | 3540 |
| catcgggcgg | cgcaggggaa | ggaaggcggc | gtccggctgc | gcgagagccg | gcgagggagg | 3600 |
| aggcggcgtc | aggggggacc | ggcgcgggag | ggcgggcttc | ggcggttcggc | gcggggggcg | 3660 |
| gcggcgctcc | gccgactgcg | gcggcgggcta | gatccggcga | aagaggctgc | atcagcgccg | 3720 |
| attccccgac | tccccaaacc | tcaaacggta | gcgaggtata | ctcggttggt | ttccccctcag | 3780 |
| gtctcaggct | gatcagacgc | cgcactgccg | atttccccct | cgggcgagcc | atcggagcgg | 3840 |
| gggcggttgg | ctcccaaagc | agacgcgaga | attcactgaa | attaccgcgc | catcttatct | 3900 |
| ccgcaagttg | aagaatataa | ttcgggcgca | gtaattttta | gtgaattcat | gtgtctacta | 3960 |
| ctacatatgt | ctgcttgagg | gccaaccgcg | tttcgatggc | tgccttgagg | ggaaatcggc | 4020 |
| gggaggcggt | tggtcagctt | tgctggtagt | gggggggaatt | tcacctaatg | attgaatgat | 4080 |
| gggatatgct | gggtaaagga | aggtatggtt | attttatatt | atctagaaga | gggtaaaaaa | 4140 |
| gggagatggt | cctttggggg | ctgtttgtct | tgttttacatg | ggtttaggaa | atattgctta | 4200 |
| aatggatata | aagttgaaaa | atgtacttga | gggaagttgt | aggtgcacgt | gggtcccac | 4260 |
| aattttttctt | cactagtgc | ccttttagtta | tatatTTTTT | gcgcaagagg | acaaaggcgc | 4320 |
| tccgtgtaat | tttgagtaag | ggccggcggg | atattttattt | gtgtaaagga | cctagccaag | 4380 |
| aaaagcatga | tagtgcatat | gtatcctttc | tttttctttt | cttttgtttt | cataactgtc | 4440 |
| ttacagaatt | tcatgttggc | tggtgacact | tgtctcactc | attatttggt | atattttgac | 4500 |
| taaatgcaac | gtgttggtgc | tggtagtttt | atatttggtt | ttacgcattc | ttcattgact | 4560 |
| gtatgtattt | gatgttgata | ccctgggctg | tcttattttta | taggtggatg | ctgggagggc | 4620 |
| acataggagg | cctgtgtgat | ccaagtgtgc | tgtccttgag | ttgaaattgc | atagccatat | 4680 |
| agcaactact | ggtgtaaaact | tgagagatga | agtagtgaaa | ggaaatatgc | aggatttttg | 4740 |
| acaatggctg | cctcaatctc | agaccactgc | cgatctatat | ttctccagta | ttccaatacc | 4800 |
| atcacagttc | gatacttcca | tagagacgca | gactagaact | tctgcagtgt | tatcgtcaga | 4860 |
| gaaagaatct | gctaattcgt | tcgctccctca | taatgggtact | gggcttggtg | aacgcattag | 4920 |
| caatgatgct | gggctaactg | aagtagtttg | aagtagtgct | ggaccaactg | aatgtattga | 4980 |
| cltgaacaag | acaccagcac | ggaaacccaa | gaagaaaaag | cacaggccaa | aggtgctaaa | 5040 |
| ggacgataaa | ccatcgaaga | cacctaaatc | tgtactcca | ataccttcaa | cagaaaaggt | 5100 |
| agaaaaacca | tctggaaaga | gaaaatatgt | ccgcaagaag | acatctccag | gccaacctcc | 5160 |
| tgcagaacag | gcagctagct | cacaactgcag | atctgagctg | aagtcagtta | aacgaagttt | 5220 |
| ggactttggt | ggagaagtac | tgcaagagag | tacacaatct | ggatctcaag | ttccgggtggc | 5280 |
| agaaatatgt | actggtccca | agcgtcaatc | aataccttct | accatccaaa | gagattcgca | 5340 |
| aagccagttg | gcttgccacg | tggtttctag | caccagctca | attcacactt | cagctagtca | 5400 |
| gatggttaat | gcacatttgt | ttctctctga | taacatgcca | aatggagtat | tgcttgacct | 5460 |
| caataattct | actagtcagt | tacaaaacga | acatgctaaa | tttgtggaca | gtccggcacg | 5520 |
| tctttttggt | tccagaataa | gacagacatc | aggtaaaaat | tctttgctag | aaatctatgc | 5580 |
| tggcatgtca | gatagaaatg | tacctgatct | caacagttca | atcagtcaga | cgcatagcac | 5640 |
| gtctactgat | tttgctcaat | acttgctttc | atcctcacaa | gcttctgtaa | gggaaacaca | 5700 |
| aatggccaat | cagatgctta | atggtcatag | gatgccagaa | aatccaatta | cacctagtea | 5760 |
| ttgtattgaa | agggtgcat | tgaaggaaac | tttgaatcat | gttctctacg | caaaagccgc | 5820 |
| agtgatgaat | ggccaaatgc | cccatagtta | caggttggcg | caaaatccca | tcctacctcc | 5880 |
| aaatcatatt | gaagggtatc | aagtgatgga | aaatttgagt | gaacttgtea | cgacaaatga | 5940 |
| ctatctaact | gctagtccct | tcagtcaaac | tggagctgca | aataggcagc | ataatatgtg | 6000 |
| tgactccatg | catatacatg | cattggatcc | tagaagagag | agtaatgctt | caagtggttc | 6060 |
| ttggatatca | ttaggtgtga | actttaacca | acaaaataat | ggatgggcat | ctgcaggtgc | 6120 |
| tgccgatgct | gcgagctcac | atgccccata | tttttcagaa | cctcacaaaa | gaatgaggac | 6180 |
| agcttatctt | aacaattatc | caaattggagt | cgtgggacat | ttttctacct | catctacgga | 6240 |
| tttgtcaaat | aatgagaatg | aaaatgtggc | ctcagcaatc | aactcaaacg | tttttaccct | 6300 |
| tgctgatgca | caagagattga | tagcccgtag | gaaatcacga | gcttcccaaa | gaatgatcag | 6360 |
| ttttagatca | tctaaaaatg | atatgggttaa | cagatcacgaa | atgggtccatc | aacatggcag | 6420 |
| acctgctccg | catggctctg | catgcaggga | gtctattgaa | gtacctgaca | aacagttcgg | 6480 |
| gtcatgaca | gaagaactca | cacaattacc | tagtatgcc | aataaccac | aaagggaata | 6540 |
| atatattccg | caaactggaa | gttgccaaact | tcagtctttg | gaacatgaca | tggttaaagg | 6600 |
| gcataaacttg | gcagggtgaat | tgcataagca | agtaacttca | cctcaagttg | ttattcagag | 6660 |
| caattttctgt | gttacccttc | ctgatgtgct | cggcagaaga | accagtgggg | agcattttaag | 6720 |
| aacccttata | gctccaaac | atgcacgcac | atgtaaggac | actctgaaag | ctttaagttg | 6780 |
| tcaactggag | agttctagag | acattatttag | gcctcctgtc | aatcctatag | ggccatcctc | 6840 |
| tgccgatgtt | ccaagaactg | ataaccatca | agtcaagggt | tctgaagaaa | ccgttacagc | 6900 |
| caaactccct | gagaagcgaa | aagtaggacg | tcccagaaaa | gagttaaaaac | ctggtgagaa | 6960 |
| acaaaaacct | agaggccgct | caaggaaggg | aaaagttggt | ggtggagaaac | ttgcatcaaa | 7020 |
| ggatagtcac | actaatccat | tgcaaaatga | gagtacttca | tgttcttatg | gtccttatgc | 7080 |
| aggggaggct | tctgttgga | gagcagttaa | agcaaataga | gttgagagaaa | acattttctgg | 7140 |
| agctatggta | tccctactgg | attcttttaga | tattgttatt | caaaagataa | aggtccttgga | 7200 |

| | | | | | | | |
|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|-------|
| cataaaca | aa | tcagaagacc | ctgtgacagc | tgaacctcat | ggtgctcttg | tcccttacaa | 7260 |
| tggagaattt | gg | tcctatttg | ttccttttga | gggaaagt | aaaagaaaac | gctctcgagc | 7320 |
| caaagtggat | cttgaccctg | taactgcttt | aatgtggaag | ttactaatgg | gaccagatat | | 7380 |
| gagtgattgt | gctgaaggta | tggataagga | taaagagaaa | tggctaaatg | aagaaagaaa | | 7440 |
| aatattccaa | gggcgtgttg | attcattttat | tgctcgaatg | catctagttc | aaggattttc | | 7500 |
| tatcatttta | aaattgtttt | cctaacatga | acatgatggc | ttccatcttg | tgattgctgc | | 7560 |
| cctcacatta | gtgaatggtc | tcaaactctt | aatattttact | gtgtacccaa | atcctattttc | | 7620 |
| ttcatcccaa | tatatcatg | tttgtactcg | tactgtccca | ttagacttgc | attgtgctgt | | 7680 |
| gaagatcaac | acctttactt | ttaggattac | ctctatgttt | gcaggagatc | ggcgtttttc | | 7740 |
| tccttgga | ggatcagttg | tagattctgt | agtgggagta | tttcttacac | agaatgtttc | | 7800 |
| ggaccatctt | tccaggtgaa | taatgcctag | agcctatttg | aaaactgtga | cttgacttgc | | 7860 |
| attgtgaggt | tatgttggtt | ttctgtctga | ctatttcctt | ttttttcagc | tctgcattta | | 7920 |
| tggctcttg | tgcaaaaattt | cctgtaaagc | cagaagcctc | tgaaaaaccc | gcaaatgtga | | 7980 |
| tgtttcatac | aatttcagaa | aatgggtgatt | gttctgggtt | gttttggtaat | tctgtcaagc | | 8040 |
| tacaggggtga | gatccttggt | caggaggcca | gcaacacagc | agcctctttt | atcacacccg | | 8100 |
| aggataagga | aggaaagtaac | agtgtggaat | tgcttggaag | ttcttttggg | gatggagtg | | 8160 |
| atgggtgcagc | aggagtttat | tctaataattt | atgagaatct | gccagctaga | ctgcattgcta | | 8220 |
| ctaggcgctcc | agtcgttcaa | actggaaacg | ctgtcgaagc | ggaagatggg | tactggagg | | 8280 |
| gtgttggtttc | atcagaaaac | tccactattt | catctcaaaa | ttcatcagat | tatctatttc | | 8340 |
| acatgtctga | tcatatgttt | tcgagcatgt | tactaaattt | cactgccgaa | gacattggca | | 8400 |
| gcagaaatat | gcccacagca | acaagaacca | catatacaga | acttctacga | atgcaggagc | | 8460 |
| tgaagaacaa | gtctaatagaa | accattgaat | catcagagta | tcatgggggtt | ccagtcctcat | | 8520 |
| gtagtaacaa | cattcaagtg | ctcaatggaa | tacaaaatat | cggcagtaaa | catcagcctt | | 8580 |
| tacattcctc | tatttcatat | caccagactg | gccaaagtcca | cctcccagac | atagtacatg | | 8640 |
| cgagtgtattt | ggagcaatca | gtatacactg | gccttaatag | agtgccttgat | tctaattgta | | 8700 |
| cacaaaccag | ttattatcct | tcacctcatc | ctggaattgc | ctgtaacaat | gaaacacaaa | | 8760 |
| aggctgactc | tttaagcaac | atgttatatg | gtatagatag | atcagataag | actacttccc | | 8820 |
| tgtctgagcc | tacaccaaga | atcgataaact | gttttcaacc | attaagtcca | gagaaaatgt | | 8880 |
| catttgctag | ggaacagtcc | tcttctgaaa | attatctttc | aaggaatgaa | gctgaagctg | | 8940 |
| catttggttaa | acagcatgga | acatcaaagt | tgcaagggtga | taataactgtc | aggacagagc | | 9000 |
| aaaatggagg | tgaaaattct | caatcaggat | acagccaaca | ggatgataat | gttggtattc | | 9060 |
| aaacagcgac | aaccagtaat | ctttattctt | caaacttatg | ccaaaaccag | aaagcaaatt | | 9120 |
| ctgaagtact | acacggagtt | tcttccaact | tgatagagaa | ttctaaagat | gacaaaaaga | | 9180 |
| cttcccccaa | agttccagtc | gatggatcaa | aagcaaagag | gccaagagtt | ggggctggta | | 9240 |
| aaaagaaaac | atatgattgg | gatatgttga | gaaaagaagt | tctttacagt | catggtaata | | 9300 |
| aagaaagatc | ccagaatgct | aaggactcaa | ttgattggga | aacaataaga | caagcagagg | | 9360 |
| tgaaggaaat | atctgacaca | attagagagc | gaggaatgaa | taacatgctg | gcagaacgga | | 9420 |
| taaaagtaag | tatggcataa | aacagttttac | attgaaagt | gacataactc | tagtcatatg | | 9480 |
| tgcattgcatg | ctattccata | tagattttgct | tatttggttg | aattccaagt | tttggtatcaa | | 9540 |
| ccatactcat | ctttagcaat | tcattgttgca | ggacttcccta | aaccgattgg | tgagagacca | | 9600 |
| tgggagcatc | gatccttgagt | ggttgcgcta | tgctcgattca | gataaagcga | agtaagctaa | | 9660 |
| ctaaattttat | tttgagcaaa | cattcataat | gcaattggcc | cttgggcatt | ctataatttg | | 9720 |
| tcattttgac | ctctgcattg | cttagcaatg | acaattggat | gtagtgagca | tgggtaataa | | 9780 |
| tgtaaagcaat | gacaattgga | tgtagtgggc | atggttaata | attgaacatg | tctgtgtttg | | 9840 |
| cgggataata | atgcctatca | cctgtgagcc | tgtgacatgc | aaaccttgaa | cgttgaaacct | | 9900 |
| tgaacccccct | acctcgcact | gtgtgctctc | aaccaactga | gcaagtggag | gaccttgttg | | 9960 |
| tatggaaaaaa | ataattttta | ataacccttg | attcaaccaa | agcttcataa | agaatatat | | 10020 |
| tttctatttat | tcatttgaac | cagcgggttg | accagtgaac | cgatgggtctt | gctgggtccgg | | 10080 |
| atttaataat | aactatggct | agaacagatt | agagcaccca | atacttgccg | gatgctaaat | | 10140 |
| atttcaatgg | ggacacacct | gctcgtgtgt | tgcatccaact | acctaagcca | cacaggcatg | | 10200 |
| gcaatcaaat | cagcttgccc | atgtaacatc | aactatctga | tcgcgagaag | gccggagctc | | 10260 |
| tcacttgatg | tttgtcattc | aaaaaatagt | tattcaccaa | tgcaatgtca | agctcccgtta | | 10320 |
| aagaccatga | atgtagttaa | tccttctttg | atcaagtttt | tatttatatt | aaagtgttta | | 10380 |
| ccaatgtaat | cctacattat | ttgtacctgg | tttttacata | taaatacatt | gtaccttttg | | 10440 |
| tgtttcttcc | agggactatc | tcttaagcat | tagaggactt | ggacttaaaa | gtgttgagtg | | 10500 |
| tgtgcgtctt | ttgacactcc | atcacatggc | ttttcctgta | tgtttctttt | cacaaataat | | 10560 |
| tttcaagaat | cttcgtttct | ttatttctgg | agaagtggag | attttatctg | tatctgttga | | 10620 |
| tgatgtaggt | ggatacaaat | gttggttagaa | tatgtgtgag | gcttggtatg | gtgccacttc | | 10680 |
| agccccctacc | cgagtctctt | cagttgcacc | tgttggagat | gtaagtatct | taaateccact | | 10740 |
| ggttggtcttc | actaatgctg | gagagtgata | ggagtttgat | catctgctat | tgaagggtatc | | 10800 |
| caatgctgga | gaacatacag | aaataacctct | ggccgaggtt | atgcaagctt | gatcaacgga | | 10860 |
| cattgtgaggt | tttagaaatg | cagttaaaaa | ctatatatat | aagagcatgt | cattatctga | | 10920 |

| | | | | | | |
|-------------|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|-------|
| gagtgtataa | cagggttcttg | atgatattgta | ggtatgagct | tcactatcaa | atgataactt | 10980 |
| ttggaaagggt | atgagacaac | aactttgata | aagtgaattc | aacccaatta | ctgtgttttg | 11040 |
| atggaccatc | tgtgttactt | tccttctagg | tattttgtac | aaaaagtaag | cccaattgca | 11100 |
| acgcatgccc | aatgagagct | gagtgcagc | actttgcaag | tgcatttgcc | aggtaattct | 11160 |
| caagalgtac | atattttata | tacattctgt | gaaatcacgg | tgatgattgt | taggtatgaa | 11220 |
| caattggctg | agatcccccc | cctccccctt | cccatacctt | tcctggctct | acaagttctc | 11280 |
| ctaggctaat | ttaactgggtg | cataccacat | ttatgttatt | ttgatacatc | aaagattatg | 11340 |
| tttgtgggtg | tgaggctata | ttagtgtgtt | gtatgtaact | cagttttgca | attgtagttt | 11400 |
| tagttagaac | acgttggtct | ctacatttta | ataaataact | tttgactgga | catcaatgac | 11460 |
| tggtgtattt | cogataataa | aagggttgatt | gttgccgagg | gatttcaatt | cgggtccgaat | 11520 |
| agggttcgaca | aatgcagtggt | gcctattagt | ttaagagtga | aagttctatc | agctgttttg | 11580 |
| ctccactgtg | accttttacac | tttgtacttt | tgaagaaaca | gactaacctg | ctcatattaa | 11640 |
| agtcttgga | tgactccatt | gcgaccttta | cgttttgtat | tttagaagaa | acagactaac | 11700 |
| ctgttccatat | tagagtcttg | gaactgtgtg | tgtgtgtgtt | tttttttttt | ttggggggggg | 11760 |
| ggggggcatgg | agatttaatc | caacatttct | ggatgacctt | atattggtaa | tgatatgggt | 11820 |
| tttttatgat | atagtgcag | gctcgctctt | cctggacctg | aagagaagag | tttagttaca | 11880 |
| tctggaaccc | caatagctgc | agaaaccttc | caccagacat | atataagttc | taggcctgta | 11940 |
| gtaagtcagc | ttgagtggaa | ttcaaaccac | tgtaaccatg | gtatgaacaa | tcgccagcca | 12000 |
| atcattgagg | agccagcaag | cccagaacct | gaacatgaga | cagaagagat | gaaagagtgt | 12060 |
| gcaatagagg | atagttttgt | cgatgatcca | gaagaaatcc | ctactatcaa | gcttaatttt | 12120 |
| gaggagttaa | cacagaacct | gaagagttat | atgcaagcaa | ataacattga | gattgaagat | 12180 |
| gctgatatgt | caaaggcttt | ggtcgctata | actcctgaag | ttgcttctat | cccaactcct | 12240 |
| aagctcaaga | atgtcagtcg | cctaaggaca | gagcaccaag | tgtatgatct | tgtccctcct | 12300 |
| gcaaaaccaa | tctcatgaat | atttactatt | gactatcatg | tgttttgctg | cattgcttac | 12360 |
| ttctctgttt | tcaacatata | tgtagctatg | aactgccaga | ttcacatcca | cttcttgaa | 12420 |
| gagtaagttc | ataaaacatt | atagaattct | gtactttcct | tatcaccaac | tgagaatata | 12480 |
| ttgatgctta | ttttcttaca | atacacagtt | caaccaaaga | gaaccagatg | atccttgccc | 12540 |
| atacctaact | tctatatgga | cccagggtaa | gaagtgcata | aacagaacac | aatatcatgg | 12600 |
| gaaccaaact | tttttcaatg | gttacttata | attgttgaaa | tatgcaacag | gtgaaacagc | 12660 |
| tcaatcaact | gatgcacctt | agtcggtctg | caattcacaa | gagaatgggt | aactatgtgc | 12720 |
| aagcaataca | tgcttttagtt | gcaacagtat | aagagaagcg | caggcccaaa | aagttcgagg | 12780 |
| gacactgctg | gtaagtagtt | gtttctgtaa | catatgctca | gttgcccttg | gttcaagatg | 12840 |
| tgctattcaa | gtttatcatg | ttcacgaata | gtgataaagc | tgctatctgt | cctagctatt | 12900 |
| gtccaagcta | taacagttct | gattcactgg | ttgggcacca | gctagggaat | aggatgtaaa | 12960 |
| aaacttatcc | cgcagtttgt | tgacaatctg | tttttctttg | ttgaaaatta | aaaatagata | 13020 |
| ccatgccgaa | cagcaatgag | aggaagcttt | ccacttaatg | ggacataatt | tcaagtcaat | 13080 |
| gagggtgaaaa | cagaaagttc | ttaaagttga | tcttagttta | attattataa | taccattaaa | 13140 |
| atatatgcaa | gtttctactt | tctagtatct | cttttattag | tgttcaaattg | ttatgctggc | 13200 |
| ggtattttgct | gatcatgact | caagccggaa | cccgattgat | gttccaagg | gttggatatg | 13260 |
| gaatctccct | aggagaactg | tttacttttg | aacttcaatt | ccgacaatat | ttaaagggtat | 13320 |
| ttcactaata | aattttgacc | aagaatagga | tttttggcag | cgccaaatgt | gccactatct | 13380 |
| ttattgtgtg | aagtccatta | tgtgattgta | ataatttgaa | tcaccaagag | gactaaggcc | 13440 |
| tgctttggga | catattacga | gcagcttttg | cttgcaaaga | aaccagattc | tggtgccgca | 13500 |
| ccttctccgc | tcttctgcca | cccaagtcgc | tccaataccc | ctcattgagc | gcttggatcc | 13560 |
| taacccccatc | tgccatcatg | catcatcctg | ctaacaactg | cttccaccat | tgccctgtttc | 13620 |
| tggtgttggtg | aggcactcac | gctgcttgct | atagtttagg | ttttctttgt | gtcctgattt | 13680 |
| agatggaaat | tccagctgct | gtcttttaca | taactagcta | aatgtccgcg | ctttgcatatg | 13740 |
| gataatagaa | aatatattat | aatattgtca | aataaattaa | atatgtttta | tacgaaatgt | 13800 |
| gttaacaatc | cttttgctat | agggaaatatt | gaccttaatt | tgattttata | tgtggctatc | 13860 |
| caatttagatt | tgtttggttt | tctaataata | ataagttcaa | gggctaattgt | acaaaattga | 13920 |
| caatgggagt | aggtgggggtg | gcagattcac | tgccaccacc | actaccttct | tttaaagggg | 13980 |
| tatatagatt | tgacagcagtg | gttgcttgat | ctgtgatttg | aaatgtcaag | tacacgctca | 14040 |
| tgcatcagca | ccatatgtct | acgctcctga | cccaacatgc | aaccaatgca | attgaggggt | 14100 |
| ggctctgata | caattactaa | tgtcctatat | ccaaaacaac | tataggccta | tgaccaaaaca | 14160 |
| taattaataa | cctcgcttgc | gctttttgtc | tcacttgctc | catgtaaaag | gggttaaccgc | 14220 |
| aggttactat | gttaggaata | gctgggttta | tgaaacgggt | caactctcaa | ctcctcatat | 14280 |
| agcactaatt | catgtattgc | tgtcagcag | gatttgagtt | ccagatcatg | ctcataagat | 14340 |
| aggaccaaat | tgtccttact | atctactccc | tccgtcccaa | aatataaggt | atttccggtc | 14400 |
| aaaatatctt | atattttggg | atggaggggag | tactatacta | cggaccacc | accaaatagt | 14460 |
| gccgcagaag | agagagagag | agagagaaga | gggggtgggg | gtgggggtgt | atgggtgaaa | 14520 |
| taagaatagt | gccaaagtatt | tgccaacaaa | tgaggcggtc | aaatgtgtca | catcaattgg | 14580 |
| gaagtatgtc | agatcaactg | aaaatttgat | tgggaaatta | ttattcatgc | aacaaagctg | 14640 |
| tacaactgat | cccatgtttc | tatcgcaggt | ttgacaactg | aagaaataca | acattgcttt | 14700 |

```

tggagaggta atcatttttt tttgtatgta cgttttggtt tocataacaa agagagatga 14760
agtgtatagg tactatgttt actgacaagg ataataatag tagcaagtat ataggcagag 14820
gagcatgtct ctattctacc agtattatta ctcataataa ctagtatatc cttttttttg 14880
ccatttcagc tgatagctac tctccagtc aaatatattgc catctctatt gaacttttca 14940
ttgtcttctg aatgtatctt actcttggat cattaatatt tcattttgtc acgatatagt 15000
ggtataggac aataaaatca tgggaagtat ttatttttcat caccaatcta ctcatataat 15060
tttcaaataga caattataaa tatcttaaaa atatatgtgt agttgtctctg tataaaataa 15120
ttgtcacacc ctagtcacac gcgacaagaa tttgtgtcta caggctagag tgagtactct 15180
agaagtatct tcataggaat cggaataaaa tgccaatgtg aatgaacaag gatatcaagt 15240
ataccctcaa aatctctaga gaggattgcg taaatatgta ggtgtaatta aacaattgtt 15300
tcatatggag ggttttctta aaggaggtag aagacttata aatatgggta aagtagtttt 15360
tatccatagg cattgttggc agaaagctgc ttagggtaga atgctactcc ctccgtccca 15420
caatataaga gattttgagt ttttgcttgc aacgtttgac cactcggtt attcaaaaat 15480
ttttgaaatt attatttatt ttatttgtga cttactttat tattcacagt actttaagta 15540
caacttttgc tttttatat ttgcaaaaaa aattgtataa gacgagtggc caaacgttgt 15600
acgcaaaaac tcaaaatccc ttatatgtgt ggacggaggg agtacttatg gatgcctttt 15660
ttgtccaaga tgtcagtaac attttctttc agggatgtgg atttttactt cttttttccc 15720
taacttttgc aggatttgtg tgcgtgagag gctttgatag gacatcaaga gcaccagac 15780
cactgtatgc aagactccac tttccagcaa gcaaaattac caggaataaa aaactctgag 15840
gttctgtctc aggaagagat gatgaatagg ccatctggaa aaccagaaa gaaataaaga 15900
ggaggtacat atgatctgcc agaagatcac tgacctgaaa tggatcgctg accaataagt 15960
tgccgtaggc aattcaatta tttctggcca tatacatctg ctgaaagtta tgaactccag 16020
ccactgaaga attcgtgggt ctggtattct tcggcaacat gatccatcat acagattcta 16080
tgcttgggtg ttgcaagcaa ttcttatgct gtgacagttg ctgctgatag ggagaaaagg 16140
catgtccggc ggtcagcgg ctctaactgt actttcatat gagtggaaac gattgtttgt 16200
catgtgaaaa gtttgccatt caaaatgggc attcatgttg ttaggtcatt catgtagtgc 16260
atgtcaaatt aatcatcaat tatttgattt gattcattca caagtttaat tggctctaga 16320
tacttgtgag ctgcaggcca gcaatgtcat aatgtatgtc gggaaaagg agatataaat 16380
cgtcagcatt tacctgaaat acccttctct tgtccataaa tacaagggat tttgggttgt 16440
taagcgtatt ttaagttcga tatgaaaatt actttgatgt tccgaagggc ttattttgtc 16500
ttgggttgtt tagcatgtca taagggtgat attaaattac tttcatgccc ttaggagttt 16560
tggaaggttg acgcttaaca gatgcgacta gcagtaagca ataaatgtct agatggattg 16620
agaaagtagt atttcttccg tctcaaaata ttgctataag ctctgtttgt tagggttcta 16680
acttctaaat tacttttagaa gtttaggtata tagtgaagtt gtggaactat ttaaataatag 16740
ttatatctct ctagtttatt ttttatttta tgagagcaat tcaattcatt ccactctttt 16800
tttttttgga attgaaatca tttggttgtg cttcagttct agaaaatgtg gagctagagt 16860
tgaagacgtg ttaaaccgggt cctta 16885

```

<210> 10

<211> 35

<212> ADN

<213> Oryza sativa

<400> 10

caatgaggta tttgctgata atgactcaag cggga

35

<210> 11

<211> 56

<212> ADN

<213> Oryza sativa

<400> 11

caatgagtgt tcaaatgtta tgcggcagggt atttgctgat catgactcaa gccgga

56

<210> 12

<211> 152

<212> PRT

<213> Oryza sativa

<400> 12

Cys Asn Ser Gln Glu Asn Gly Glu Leu Cys Ala Ser Asn Thr Cys Phe
1 5 10 15

Ser Cys Asn Ser Ile Arg Glu Ala Gln Ala Gln Lys Val Arg Gly Thr
20 25 30

Leu Leu Ile Pro Cys Arg Thr Ala Met Arg Gly Ser Phe Pro Leu Asn
 35 40 45
 Gly Thr Tyr Phe Gln Val Asn Glu Val Phe Ala Asp His Asp Ser Ser
 50 55 60
 Arg Asn Pro Ile Asp Val Pro Arg Ser Trp Ile Trp Asn Leu Pro Arg
 65 70 75 80
 Arg Thr Val Tyr Phe Gly Thr Ser Ile Pro Thr Ile Phe Lys Gly Leu
 85 90 95
 Thr Thr Glu Glu Ile Gln His Cys Phe Trp Arg Gly Phe Val Cys Val
 100 105 110
 Arg Gly Phe Asp Arg Thr Ser Arg Ala Pro Arg Pro Leu Tyr Ala Arg
 115 120 125
 Leu His Phe Pro Ala Ser Lys Ile Thr Arg Asn Lys Lys Ser Ala Gly
 130 135 140
 Ser Ala Pro Gly Arg Asp Asp Glu
 145 150
 <210> 13
 <211> 159
 <212> PRT
 <213> Oryza sativa
 <400> 13
 Cys Asn Ser Gln Glu Asn Gly Glu Leu Cys Ala Ser Asn Thr Cys Phe
 1 5 10 15
 Ser Cys Asn Ser Ile Arg Glu Ala Gln Ala Gln Lys Val Arg Gly Thr
 20 25 30
 Leu Leu Ile Pro Cys Arg Thr Ala Met Arg Gly Ser Phe Pro Leu Asn
 35 40 45
 Gly Thr Tyr Phe Gln Val Asn Glu Cys Ser Asn Val Met Arg Gln Val
 50 55 60
 Phe Ala Asp His Asp Ser Ser Arg Asn Pro Ile Asp Val Pro Arg Ser
 65 70 75 80
 Trp Ile Trp Asn Leu Pro Arg Arg Thr Val Tyr Phe Gly Thr Ser Ile
 85 90 95
 Pro Thr Ile Phe Lys Gly Leu Thr Thr Glu Glu Ile Gln His Cys Phe
 100 105 110
 Trp Arg Gly Phe Val Cys Val Arg Gly Phe Asp Arg Thr Ser Arg Ala
 115 120 125
 Pro Arg Pro Leu Tyr Ala Arg Leu His Phe Pro Ala Ser Lys Ile Thr
 130 135 140
 Arg Asn Lys Lys Ser Ala Gly Ser Ala Pro Gly Arg Asp Asp Glu
 145 150 155

<210> 14
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Oryza sativa

```

<400> 14
Cys Ser Asn Val Met Arg Gln
1          5

<210> 15
<211> 19
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> đoạn mỗi oligonucleotit
<400> 15
tgagtagttg cgttgttct 19

<210> 16
<211> 18
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> đoạn mỗi oligonucleotit
<400> 16
tcttagtgag ccgtttct 18

<210> 17
<211> 18
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> đoạn mỗi oligonucleotit
<400> 17
ccttctgtgc tatgggtt 18

<210> 18
<211> 18
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> đoạn mỗi oligonucleotit
<400> 18
catgccaaga caccactt 18

<210> 19
<211> 18
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> đoạn mỗi oligonucleotit
<400> 19
tggctttgga aacggtag 18

<210> 20
<211> 19
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> đoạn mỗi oligonucleotit
<400> 20
ttagaggga tgtgcgtca 19

<210> 21
<211> 18
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>

```

| | |
|-------------------------------|----|
| <223> đoạn mỗi oligonucleotit | |
| <400> 21 | |
| aaacaacgat ccagcaaa | 18 |
| <210> 22 | |
| <211> 19 | |
| <212> ADN | |
| <213> Trình tự nhân tạo | |
| <220> | |
| <223> đoạn mỗi oligonucleotit | |
| <400> 22 | |
| ttggcaccgt attactttc | 19 |
| <210> 23 | |
| <211> 24 | |
| <212> ADN | |
| <213> Trình tự nhân tạo | |
| <220> | |
| <223> đoạn mỗi oligonucleotit | |
| <400> 23 | |
| acgcattcctt cattgactgt atgt | 24 |
| <210> 24 | |
| <211> 24 | |
| <212> ADN | |
| <213> Trình tự nhân tạo | |
| <220> | |
| <223> đoạn mỗi oligonucleotit | |
| <400> 24 | |
| gccctttcaa tacaatgact aggt | 24 |
| <210> 25 | |
| <211> 24 | |
| <212> ADN | |
| <213> Trình tự nhân tạo | |
| <220> | |
| <223> đoạn mỗi oligonucleotit | |
| <400> 25 | |
| gaacatttga atcatgttcc tcac | 24 |
| <210> 26 | |
| <211> 24 | |
| <212> ADN | |
| <213> Trình tự nhân tạo | |
| <220> | |
| <223> đoạn mỗi oligonucleotit | |
| <400> 26 | |
| actatccttt gatgcaagtt ctcc | 24 |
| <210> 27 | |
| <211> 24 | |
| <212> ADN | |
| <213> Trình tự nhân tạo | |
| <220> | |
| <223> đoạn mỗi oligonucleotit | |
| <400> 27 | |
| gttgggaagag cagttaaagc aaat | 24 |
| <210> 28 | |
| <211> 24 | |
| <212> ADN | |
| <213> Trình tự nhân tạo | |
| <220> | |

<223> đoạn mỗi oligonucleotit
 <400> 28
 cttcggcagt gaaatttagt aaca 24

<210> 29
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> đoạn mỗi oligonucleotit
 <400> 29
 tacagaactt ctacgaatgc agga 24

<210> 30
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> đoạn mỗi oligonucleotit
 <400> 30
 gcaacatgaa ttgctaaaga tgag 24

<210> 31
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> đoạn mỗi oligonucleotit
 <400> 31
 ctatacctcc tcaactccgg tcaccgtctc cggcg 35

<210> 32
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> đoạn mỗi oligonucleotit
 <220>
 <221> C
 <222> (18)..(18)
 <223> 5-methylxytosin
 <400> 32
 ctatacctcc tcaactccgg tcaccgtctc cggcg 35

<210> 33
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> đoạn mỗi oligonucleotit
 <220>
 <221> C
 <222> (17)..(17)
 <223> 5-methylxytosin
 <400> 33
 ctatacctcc tcaactccgg tcaccgtctc cggcg 35

<210> 34
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi oligonucleotit

<220>
 <221> C
 <222> (22)..(22)
 <223> 5-metylxytosin
 <400> 34
 ctatacctcc tcaactccgg tcaccgtctc cggcg

35

<210> 35
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> đoạn mỗi oligonucleotit

<220>
 <221> g
 <222> (18)..(18)
 <223> vị trí abasic
 <400> 35
 ctatacctcc tcaactcggg caccgtctcc ggcg

34

<210> 36
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> đoạn mỗi oligonucleotit

<220>
 <221> C
 <222> (17)..(17)
 <223> vị trí abasic
 <400> 36
 ctatacctcc tcaactcggg caccgtctcc ggcg

34

<210> 37
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> đoạn mỗi oligonucleotit

<220>
 <221> T
 <222> (15)..(15)
 <223> vị trí abasic
 <400> 37
 ctatacctcc tcaatccggg caccgtctcc ggcg

34

<210> 38
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> đoạn mỗi oligonucleotit

<220>
 <221> A
 <222> (12)..(12)
 <223> vị trí abasic

<400> 38
 ctatacctcc taactccggt cacggtctcc ggcg 34

<210> 39
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> đoạn mỗi oligonucleotit
 <400> 39
 ctatacctcc tcaactctgg tcaccgtctc cggcg 35

<210> 40
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> đoạn mỗi oligonucleotit
 <400> 40
 cgccggagac ggtgaccgga gttgaggagg tatag 35

<210> 41
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> đoạn mỗi oligonucleotit
 <220>
 <221> C
 <222> (17)..(17)
 <223> 5-metylxytosin
 <400> 41
 cgccggagac ggtgaccgga gttgaggagg tatag 35

<210> 42
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> đoạn mỗi oligonucleotit
 <400> 42
 ttaatctaga atgcagagca ttatggactc g 31

<210> 43
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> đoạn mỗi oligonucleotit
 <400> 43
 cggtcgactt aggttttggt gttcttcaat ttgc 34

<210> 44
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Motif
 <400> 44
 Asp His Gly Ser Ile Asp Leu Glu Trp Leu Arg Asp His Gly Ser Ile
 1 5 10 15

Asp Leu Glu Trp Leu Arg
20

<210> 45
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Motif
<400> 45
Gly Leu Gly Leu Lys Ser Val Glu Cys Val Arg Leu Leu Thr Leu His
1 5 10 15

His

<210> 46
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Motif
<400> 46
Ala Phe Pro Val Asp Thr Asn Val Gly Arg Ile
1 5 10

<210> 47
<211> 21
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Motif
<400> 47
Val Arg Leu Gly Trp Val Pro Leu Gln Pro Leu Pro Glu Ser Leu Gln
1 5 10 15

Leu His Leu Leu Glu
20

<210> 48
<211> 22
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Motif
<400> 48
Glu Leu His Tyr Gln Met Ile Thr Phe Gly Lys Val Phe Cys Thr Lys
1 5 10 15

Ser Lys Pro Asn Cys Asn
20

<210> 49
<211> 14
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Motif
<400> 49
His Phe Ala Ser Ala Phe Ala Ser Ala Arg Leu Ala Leu Pro
1 5 10

<210> 50

<211> 1393

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 50

Met Glu Lys Gln Arg Arg Glu Glu Ser Ser Phe Gln Gln Pro Pro Trp
 1 5 10 15

Ile Pro Gln Thr Pro Met Lys Pro Phe Ser Pro Ile Cys Pro Tyr Thr
 20 25 30

Val Glu Asp Gln Tyr His Ser Ser Gln Leu Glu Glu Arg Arg Phe Val
 35 40 45

Gly Asn Lys Asp Met Ser Gly Leu Asp His Leu Ser Phe Gly Asp Leu
 50 55 60

Leu Ala Leu Ala Asn Thr Ala Ser Leu Ile Phe Ser Gly Gln Thr Pro
 65 70 75 80

Ile Pro Thr Arg Asn Thr Glu Val Met Gln Lys Gly Thr Glu Glu Val
 85 90 95

Glu Ser Leu Ser Ser Val Ser Asn Asn Val Ala Glu Gln Ile Leu Lys
 100 105 110

Thr Pro Glu Lys Pro Lys Arg Lys Lys His Arg Pro Lys Val Arg Arg
 115 120 125

Glu Ala Lys Pro Lys Arg Glu Pro Lys Pro Arg Ala Pro Arg Lys Ser
 130 135 140

Val Val Thr Asp Gly Gln Glu Ser Lys Thr Pro Lys Arg Lys Tyr Val
 145 150 155 160

Arg Lys Lys Val Glu Val Ser Lys Asp Gln Asp Ala Thr Pro Val Glu
 165 170 175

Ser Ser Ala Ala Val Glu Thr Ser Thr Arg Pro Lys Arg Leu Cys Arg
 180 185 190

Arg Val Leu Asp Phe Glu Ala Glu Asn Gly Glu Asn Gln Thr Asn Gly
 195 200 205

Asp Ile Arg Glu Ala Gly Glu Met Glu Ser Ala Leu Gln Glu Lys Gln
 210 215 220

Leu Asp Ser Gly Asn Gln Glu Leu Lys Asp Cys Leu Leu Ser Ala Pro
 225 230 235 240

Ser Thr Pro Lys Arg Lys Arg Ser Gln Gly Lys Arg Lys Gly Val Gln
 245 250 255

Pro Lys Lys Asn Gly Ser Asn Leu Glu Glu Val Asp Ile Ser Met Ala
 260 265 270

Gln Ala Ala Lys Arg Arg Gln Gly Pro Thr Cys Cys Asp Met Asn Leu
 275 280 285

Ser Gly Ile Gln Tyr Asp Glu Gln Cys Asp Tyr Gln Lys Met His Trp
 290 295 300

Leu Tyr Ser Pro Asn Leu Gln Gln Gly Gly Met Arg Tyr Asp Ala Ile
 305 310 315 320

Cys Ser Lys Val Phe Ser Gly Gln Gln His Asn Tyr Val Ser Ala Phe
 325 330 335
 His Ala Thr Cys Tyr Ser Ser Thr Ser Gln Leu Ser Ala Asn Arg Val
 340 345 350
 Leu Thr Val Glu Glu Arg Arg Glu Gly Ile Phe Gln Gly Arg Gln Glu
 355 360 365
 Ser Glu Leu Asn Val Leu Ser Asp Lys Ile Asp Thr Pro Ile Lys Lys
 370 375 380
 Lys Thr Thr Gly His Ala Arg Phe Arg Asn Leu Ser Ser Met Asn Lys
 385 390 395 400
 Leu Val Glu Val Pro Glu His Leu Thr Ser Gly Tyr Cys Ser Lys Pro
 405 410 415
 Gln Gln Asn Asn Lys Ile Leu Val Asp Thr Arg Val Thr Val Ser Lys
 420 425 430
 Lys Lys Pro Thr Lys Ser Glu Lys Ser Gln Thr Lys Gln Lys Asn Leu
 435 440 445
 Leu Pro Asn Leu Cys Arg Phe Pro Pro Ser Phe Thr Gly Leu Ser Pro
 450 455 460
 Asp Glu Leu Trp Lys Arg Arg Asn Ser Ile Glu Thr Ile Ser Glu Leu
 465 470 475 480
 Leu Arg Leu Leu Asp Ile Asn Arg Glu His Ser Glu Thr Ala Leu Val
 485 490 495
 Pro Tyr Thr Met Asn Ser Gln Ile Val Leu Phe Gly Gly Gly Ala Gly
 500 505 510
 Ala Ile Val Pro Val Thr Pro Val Lys Lys Pro Arg Pro Arg Pro Lys
 515 520 525
 Val Asp Leu Asp Asp Glu Thr Asp Arg Val Trp Lys Leu Leu Leu Glu
 530 535 540
 Asn Ile Asn Ser Glu Gly Val Asp Gly Ser Asp Glu Gln Lys Ala Lys
 545 550 555 560
 Trp Trp Glu Glu Glu Arg Asn Val Phe Arg Gly Arg Ala Asp Ser Phe
 565 570 575
 Ile Ala Arg Met His Leu Val Gln Gly Asp Arg Arg Phe Thr Pro Trp
 580 585 590
 Lys Gly Ser Val Val Asp Ser Val Val Gly Val Phe Leu Thr Gln Asn
 595 600 605
 Val Ser Asp His Leu Ser Ser Ser Ala Phe Met Ser Leu Ala Ser Gln
 610 615 620
 Phe Pro Val Pro Phe Val Pro Ser Ser Asn Phe Asp Ala Gly Thr Ser
 625 630 635 640
 Ser Met Pro Ser Ile Gln Ile Thr Tyr Leu Asp Ser Glu Glu Thr Met
 645 650 655

Ser Ser Pro Pro Asp His Asn His Ser Ser Val Thr Leu Lys Asn Thr
 660 665 670
 Gln Pro Asp Glu Glu Lys Asp Tyr Val Pro Ser Asn Glu Thr Ser Arg
 675 680 685
 Ser Ser Ser Glu Ile Ala Ile Ser Ala His Glu Ser Val Asp Lys Thr
 690 695 700
 Thr Asp Ser Lys Glu Tyr Val Asp Ser Asp Arg Lys Gly Ser Ser Val
 705 710 715 720
 Glu Val Asp Lys Thr Asp Glu Lys Cys Arg Val Leu Asn Leu Phe Pro
 725 730 735
 Ser Glu Asp Ser Ala Leu Thr Cys Gln His Ser Met Val Ser Asp Ala
 740 745 750
 Pro Gln Asn Thr Glu Arg Ala Gly Ser Ser Ser Glu Ile Asp Leu Glu
 755 760 765
 Gly Glu Tyr Arg Thr Ser Phe Met Lys Leu Leu Gln Gly Val Gln Val
 770 775 780
 Ser Leu Glu Asp Ser Asn Gln Val Ser Pro Asn Met Ser Pro Gly Asp
 785 790 795 800
 Cys Ser Ser Glu Ile Lys Gly Phe Gln Ser Met Lys Glu Pro Thr Lys
 805 810 815
 Ser Ser Val Asp Ser Ser Glu Pro Gly Cys Cys Ser Gln Gln Asp Gly
 820 825 830
 Asp Val Leu Ser Cys Gln Lys Pro Thr Leu Lys Glu Lys Gly Lys Lys
 835 840 845
 Val Leu Lys Glu Glu Lys Lys Ala Phe Asp Trp Asp Cys Leu Arg Arg
 850 855 860
 Glu Ala Gln Ala Arg Ala Gly Ile Arg Glu Lys Thr Arg Ser Thr Met
 865 870 875 880
 Asp Thr Val Asp Trp Lys Ala Ile Arg Ala Ala Asp Val Lys Glu Val
 885 890 895
 Ala Glu Thr Ile Lys Ser Arg Gly Met Asn His Lys Leu Ala Glu Arg
 900 905 910
 Ile Gln Gly Phe Leu Asp Arg Leu Val Asn Asp His Gly Ser Ile Asp
 915 920 925
 Leu Glu Trp Leu Arg Asp Val Pro Pro Asp Lys Ala Lys Glu Tyr Leu
 930 935 940
 Leu Ser Phe Asn Gly Leu Gly Leu Lys Ser Val Glu Cys Val Arg Leu
 945 950 955 960
 Leu Thr Leu His His Leu Ala Phe Pro Val Asp Thr Asn Val Gly Arg
 965 970 975
 Ile Ala Val Arg Leu Gly Trp Val Pro Leu Gln Pro Leu Pro Glu Ser
 980 985 990

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|------|-----|-----|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|-----|-----|
| Leu | Gln | Leu | His | Leu | Leu | Glu | Met | Tyr | Pro | Met | Leu | Glu | Ser | Ile | Gln |
| 995 | | | | 1000 | | | | 1005 | | | | | | | |
| Lys | Tyr | Leu | Trp | Pro | Arg | Leu | Cys | Lys | Leu | Asp | Gln | Lys | Thr | Leu | |
| 1010 | | | | 1015 | | | | | | 1020 | | | | | |
| Tyr | Glu | Leu | His | Tyr | Gln | Met | Ile | Thr | Phe | Gly | Lys | Val | Phe | Cys | |
| 1025 | | | | | | 1030 | | | | | | 1035 | | | |
| Thr | Lys | Ser | Lys | Pro | Asn | Cys | Asn | Ala | Cys | Pro | Met | Lys | Gly | Glu | |
| 1040 | | | | 1045 | | | | | | 1050 | | | | | |
| Cys | Arg | His | Phe | Ala | Ser | Ala | Phe | Ala | Ser | Ala | Arg | Leu | Ala | Leu | |
| 1055 | | | | 1060 | | | | | | 1065 | | | | | |
| Pro | Ser | Thr | Glu | Lys | Gly | Met | Gly | Thr | Pro | Asp | Lys | Asn | Pro | Leu | |
| 1070 | | | | | | 1075 | | | | | | 1080 | | | |
| Pro | Leu | His | Leu | Pro | Glu | Pro | Phe | Gln | Arg | Glu | Gln | Gly | Ser | Glu | |
| 1085 | | | | | | 1090 | | | | | | 1095 | | | |
| Val | Val | Gln | His | Ser | Glu | Pro | Ala | Lys | Lys | Val | Thr | Cys | Cys | Glu | |
| 1100 | | | | | | 1105 | | | | | | 1110 | | | |
| Pro | Ile | Ile | Glu | Glu | Pro | Ala | Ser | Pro | Glu | Pro | Glu | Thr | Ala | Glu | |
| 1115 | | | | 1120 | | | | | | 1125 | | | | | |
| Val | Ser | Ile | Ala | Asp | Ile | Glu | Glu | Ala | Phe | Phe | Glu | Asp | Pro | Glu | |
| 1130 | | | | | | 1135 | | | | | | 1140 | | | |
| Glu | Ile | Pro | Thr | Ile | Arg | Leu | Asn | Met | Asp | Ala | Phe | Thr | Ser | Asn | |
| 1145 | | | | | | 1150 | | | | | | 1155 | | | |
| Leu | Lys | Lys | Ile | Met | Glu | His | Asn | Lys | Glu | Leu | Gln | Asp | Gly | Asn | |
| 1160 | | | | | | 1165 | | | | | | 1170 | | | |
| Met | Ser | Ser | Ala | Leu | Val | Ala | Leu | Thr | Ala | Glu | Thr | Ala | Ser | Leu | |
| 1175 | | | | 1180 | | | | | | 1185 | | | | | |
| Pro | Met | Pro | Lys | Leu | Lys | Asn | Ile | Ser | Gln | Leu | Arg | Thr | Glu | His | |
| 1190 | | | | | | 1195 | | | | | | 1200 | | | |
| Arg | Val | Tyr | Glu | Leu | Pro | Asp | Glu | His | Pro | Leu | Leu | Ala | Gln | Leu | |
| 1205 | | | | | | 1210 | | | | | | 1215 | | | |
| Glu | Lys | Arg | Glu | Pro | Asp | Asp | Pro | Cys | Ser | Tyr | Leu | Leu | Ala | Ile | |
| 1220 | | | | | | 1225 | | | | | | 1230 | | | |
| Trp | Thr | Pro | Gly | Glu | Thr | Ala | Asp | Ser | Ile | Gln | Pro | Ser | Val | Ser | |
| 1235 | | | | | | 1240 | | | | | | 1245 | | | |
| Thr | Cys | Ile | Phe | Gln | Ala | Asn | Gly | Met | Leu | Cys | Asp | Glu | Glu | Thr | |
| 1250 | | | | | | 1255 | | | | | | 1260 | | | |
| Cys | Phe | Ser | Cys | Asn | Ser | Ile | Lys | Glu | Thr | Arg | Ser | Gln | Ile | Val | |
| 1265 | | | | | | 1270 | | | | | | 1275 | | | |
| Arg | Gly | Thr | Ile | Leu | Ile | Pro | Cys | Arg | Thr | Ala | Met | Arg | Gly | Ser | |
| 1280 | | | | | | 1285 | | | | | | 1290 | | | |
| Phe | Pro | Leu | Asn | Gly | Thr | Tyr | Phe | Gln | Val | Asn | Glu | Val | Phe | Ala | |
| 1295 | | | | | | 1300 | | | | | | 1305 | | | |

| | | | |
|---------|---------------------|---------------------|-------------|
| Asp His | Ala Ser Ser Leu Asn | Pro Ile Asn Val Pro | Arg Glu Leu |
| 1310 | 1315 | 1320 | |
| Ile Trp | Glu Leu Pro Arg Arg | Thr Val Tyr Phe Gly | Thr Ser Val |
| 1325 | 1330 | 1335 | |
| Pro Thr | Ile Phe Lys Gly Leu | Ser Thr Glu Lys Ile | Gln Ala Cys |
| 1340 | 1345 | 1350 | |
| Phe Trp | Lys Gly Tyr Val Cys | Val Arg Gly Phe Asp | Arg Lys Thr |
| 1355 | 1360 | 1365 | |
| Arg Gly | Pro Lys Pro Leu Ile | Ala Arg Leu His Phe | Pro Ala Ser |
| 1370 | 1375 | 1380 | |
| Lys Leu | Lys Gly Gln Gln Ala | Asn Leu Ala | |
| 1385 | 1390 | | |