



(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)



1-0041936

(51)^{2020.01} C12N 15/82; C12N 9/10

(13) B

(21) 1-2020-06661

(22) 29/03/2019

(86) PCT/MY2019/000010 29/03/2019

(87) WO2019/203633 24/10/2019

(30) PI 2018701522 18/04/2018 MY

(45) 25/12/2024 441

(43) 25/01/2021 394

(73) KIMAGRI CORPORATION SDN BHD (MY)

24, Persiaran Sg. Pari Timur 16, Taman Mas, Perak, Ipoh, 30200 (MY)

(72) LEE, Kim Chai (MY); NG, Boon Tatt (MY); FOONG, Chuen Yi (MY).

(74) Công ty TNHH Ban Ca (BANCA)

(54) GEN TÁI TỔ HỢP ĐỂ CẢI THIỆN KHẢ NĂNG KHÁNG THUỐC DIỆT CỎ, VI KHUẨN VÀ NẤM VÀ TẠO RA CÁC TÍNH TRẠNG NÔNG HỌC NÂNG CAO, VECTƠ CHỨA GEN TÁI TỔ HỢP VÀ CÂY CHUYỂN GEN

(57) Sáng chế đề cập đến gen tái tổ hợp để cải thiện khả năng kháng thuốc diệt cỏ, vi khuẩn và nấm cũng như tạo ra tính trạng nông học nâng cao, gen tái tổ hợp được đặc trưng bởi axit nucleic bao gồm gen EPSPS thứ nhất với trình tự axit amin theo SEQ ID no. 1 và gen EPSPS thứ hai với trình tự axit amin theo SEQ ID no. 2, trong đó gen tái tổ hợp được dung hợp với gen mã hóa yếu tố phiên mã với trình tự axit amin theo SEQ ID no. 3. Ngoài ra, sáng chế cũng đề cập đến vectơ bao gồm gen tái tổ hợp, tế bào chủ chứa vectơ và cây chuyển gen chứa tế bào chủ.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế nói chung đề cập đến công nghệ ADN tái tổ hợp. Cụ thể, sáng chế đề cập đến gen tái tổ hợp và cây trồng được chuyển gen sử dụng gen tái tổ hợp, nhờ đó cây trồng có khả năng kháng lại thuốc diệt cỏ, vi khuẩn và nấm cũng như nâng cao các tính trạng nông học.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Lúa gạo là một trong những cây lương thực hàng đầu trên thế giới, được người dân châu Á tiêu thụ nhiều nhất nhưng cũng được chú ý ở các nơi khác trên thế giới. Vì vậy, điều quan trọng là phải duy trì sự sinh trưởng và thu hoạch lúa gạo để cung cấp lương thực cho nhân dân trên khắp thế giới. Tuy nhiên, có rất nhiều thách thức mà các nhà nghiên cứu và nhà khoa học phải đối mặt để duy trì sự sinh trưởng và sản lượng. Một trong những thách thức đáng chú ý là dân số ngày càng gia tăng làm tăng nhu cầu về lúa gạo. Người sản xuất lúa gạo cũng như nông dân phải đảm bảo sự sinh trưởng của vụ mùa đủ để có thể cung cấp lương thực cho nhân dân trên khắp thế giới. Trong nhiều năm qua, nhiều nghiên cứu và thí nghiệm đã được thực hiện và vô số tài liệu và bài báo đã được xuất bản nhằm nỗ lực chống lại các thách thức chủ yếu phát sinh từ sự giảm năng suất sinh trưởng do các yếu tố sinh học và phi sinh học.

Các yếu tố sinh học bao gồm sự tấn công từ loài gây hại và côn trùng như sâu ăn rế, sâu đục thân, rầy xanh và rầy nâu, sâu và côn trùng chích hạt, và sự tấn công từ các bệnh như khô vằn, bạc lá do vi khuẩn và đạo ôn. Yếu tố sinh học phổ biến khác là cỏ dại, mà cản trở sự hấp thụ ánh sáng mặt trời, nước và chất dinh dưỡng, và do đó làm chết cây lúa. Các loại cỏ dại bao gồm cỏ tranh, cỏ cói và cỏ lá rộng. Mặt khác, các yếu tố phi sinh học bao gồm độ mặn, thay đổi khí hậu, chất dinh dưỡng và khoáng chất khả dụng, sự tồn tại của kim loại nặng và chất ô nhiễm và các yếu tố khác. Trong số các yếu tố phi sinh học được đề cập trong bản mô tả, hai yếu tố là độ mặn và biến đổi khí hậu có vẻ là nguyên nhân chính gây ra sự suy giảm trong năng suất sinh trưởng. Điều này chủ yếu là do cây lúa được trồng ở khí hậu ôn đới và cận nhiệt đới, và cây

lúa rất nhạy cảm với muối. Do đó, thay đổi mạnh mẽ về độ mặn của đất và nước, và sự tăng hoặc giảm nhiệt độ mạnh mẽ của môi trường có thể và dễ dàng làm chết cây lúa.

Nhiều phương pháp và biện pháp đã được thực hiện để chống lại các thách thức này, từ các phương pháp thông thường như dùng phân bón để tăng khả năng miễn dịch của cây lúa đối với bệnh, dùng thuốc diệt cỏ để ngăn chặn sự phát triển của cỏ dại, dùng thuốc diệt côn trùng hoặc thuốc diệt loài gây hại để ngăn ngừa sự tấn công của côn trùng và loài gây hại và kiểm soát độ mặn của đất và nước. Tuy nhiên, các phương pháp này có những nhược điểm tương ứng. Ví dụ, các hóa chất trong thuốc diệt loài gây hại và thuốc diệt cỏ có thể làm hư hại hoặc tệ nhất là làm chết cây lúa trong khi thực hiện các tác động mà chúng phải có.

Bên cạnh việc sử dụng các phương pháp thông thường, cách khác để chống lại các thách thức này là thực hiện công nghệ ADN tái tổ hợp để tạo ra cây chuyển gen. Công nghệ này cho phép kết hợp các vật liệu di truyền có các đặc điểm ưu việt hoặc tốt như kháng thuốc diệt cỏ, cỏ dại, côn trùng và loài gây hại, kháng thời tiết khắc nghiệt, cải thiện đặc tính dinh dưỡng và miễn dịch, v.v., và từ đó tạo ra cây trồng có những tính trạng 'mới' này mà không xảy ra trong các loài tự nhiên. Một số tài liệu thuộc tình trạng kỹ thuật đã bộc lộ việc sử dụng công nghệ này và các loại cây trồng chuyển gen khác nhau đã được tạo ra, ví dụ như ngô, đậu tương, củ cải đường và nhiều loại cây khác.

Cây lúa cũng đã được biến đổi gen để có những đặc điểm tốt hơn và do đó thúc đẩy năng suất để đáp ứng nhu cầu trên toàn thế giới. Các tài liệu thuộc tình trạng kỹ thuật đã bộc lộ cây lúa chuyển gen, các phương pháp sản xuất polynucleotit, cũng như việc sử dụng polynucleotit trong quá trình sinh trưởng của cây lúa chuyển gen này, và nội dung này sẽ được thảo luận dưới đây.

Bằng sáng chế Hoa Kỳ số US 9,605,271 B2 liên quan đến cây được chuyển gen để có cả khả năng kháng bệnh và các đặc điểm nông học chấp nhận được. Tài liệu bằng sáng chế này bộc lộ cây lúa chuyển gen bao gồm gen WRKY45, trong đó gen WRKY45 được liên kết vận hành với promotor đáp ứng nhiễm bệnh và chất tăng cường dịch mã. Cụ thể, tài liệu mô tả rằng cây chuyển gen có khả năng chống lại bệnh đạo ôn và bệnh bạc lá do vi khuẩn. Tài liệu này cũng lưu ý rằng các tính trạng nông học được duy trì hoặc cải thiện so với cây trồng tự nhiên. Tuy nhiên, các thí nghiệm và

kết quả chỉ cho thấy rằng các tính trạng nông học của cây chuyển gen bị giảm hoặc được duy trì như so với cây đối chứng.

Bằng sáng chế Hoa Kỳ số US 9,434,958 B2 liên quan đến việc tạo ra dòng lúa có cả khả năng kháng bệnh phức tạp và các tính trạng nông học tuyệt vời bằng cách sử dụng cấu trúc axit nucleic bao gồm polynucleotit mã hóa protein nguồn gốc một lá mầm có chức năng cải thiện khả năng kháng bệnh của cây một lá mầm và một promotor có chức năng điều hòa biểu hiện của polynucleotit. Tài liệu này mô tả các gen *OsUbi1*, *eEF1 α* hoặc *OsUbi7* được sử dụng làm promotor. Tài liệu cũng bộc lộ việc sử dụng dòng lúa để tạo ra cây lúa chuyển gen có khả năng kháng bệnh và các tính trạng nông học tốt. Mặc dù đã thu được những kết quả khả quan về khả năng kháng bệnh đạo ôn và bạc lá do vi khuẩn, nhưng kết quả về tính trạng nông học không hoàn toàn khả quan. Cụ thể, cây lúa biểu hiện quá mức *OsWRKY45* điều khiển bởi promotor *POsUbi7* chỉ cho kết quả tốt hơn so với hai promotor còn lại và chỉ cho kết quả tốt hơn một chút so với Nipponbare về số lượng nhánh.

Bên cạnh các vấn đề được nêu trong các tài liệu thuộc tình trạng kỹ thuật, do đó, đòi hỏi sáng chế cần đề xuất gen tái tổ hợp để tạo ra cây chuyển gen có cải thiện khả năng kháng thuốc diệt cỏ, vi khuẩn và nấm cũng như nâng cao các tính trạng nông học như tăng năng suất và chiều cao cây.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế bộc lộ gen tái tổ hợp được đặc trưng bởi axit nucleic bao gồm gen EPSPS thứ nhất với trình tự axit amin theo SEQ ID no.1 và gen EPSPS thứ hai với trình tự axit amin theo SEQ ID no.2, mà được dung hợp với gen mã hóa yếu tố phiên mã với trình tự axit amin theo SEQ ID no. 3. Cụ thể, gen EPSPS thứ nhất được thu từ *Agrobacterium tumefaciens* CP4, gen EPSPS thứ hai được thu từ *Oryza sativa*, gen được mã hóa bằng yếu tố phiên mã là WRKY45 của *Oryza sativa*.

Mục đích của sáng chế nhằm đề xuất gen tái tổ hợp có khả năng kháng thuốc diệt cỏ, vi khuẩn và nấm cũng như nâng cao các tính trạng nông học.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất gen tái tổ hợp được đưa vào vector để tạo ra tế bào chủ cho sự sinh trưởng của cây chuyển gen.

Mục đích của sáng chế còn là đề xuất gen tái tổ hợp được đưa vào vectơ để tạo ra tế bào cây lúa cho sự sinh trưởng của cây lúa chuyển gen.

Mục đích của sáng chế cũng nhằm đề xuất gen tái tổ hợp có khả năng kháng vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo).

Mục đích của sáng chế cũng là đề xuất gen tái tổ hợp có khả năng kháng nấm *Magnaporthe oryzae*.

Mục đích của sáng chế cũng là đề xuất gen tái tổ hợp có các tính trạng nông học nâng cao như năng suất và chiều cao cây.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất gen tái tổ hợp có khả năng kháng thuốc diệt cỏ, vi khuẩn và nấm cũng như các tính trạng nông học nâng cao.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Sáng chế được mô tả với tham chiếu đến các hình vẽ trong đó:

Fig. 1A và 1B thể hiện quá trình nảy mầm khi hạt mọc mầm trên nụ bông có hygromyxin.

Fig. 2A là bảng thống kê tỷ lệ phần trăm bông có hạt trên tổng số bông của cây lúa chuyển gen, Fig. 2B là bảng thống kê tỷ lệ phần trăm của bông dài trên mỗi cây lúa chuyển gen, và Fig. 2C là bảng thống kê khối lượng hạt thu được từ mỗi cây lúa chuyển gen.

Fig. 3A và 3B minh họa phương pháp đo bông của cây lúa chuyển gen.

Fig. 4 minh họa số lượng đẻ nhánh của cây lúa chuyển gen.

Fig. 5 minh họa triển vọng của cây lúa chuyển gen.

Fig. 6A và 6B minh họa trình tự của gen tái tổ hợp.

Mô tả chi tiết sáng chế

Phần mô tả dưới đây được trình bày để người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật của sáng chế có thể thực hiện và sử dụng các phương án khác nhau. Mô tả về các thiết bị, kỹ thuật và ứng dụng cụ thể chỉ được đề xuất như là mẫu thí nghiệm.

Các cải biến khác nhau đối với các ví dụ được mô tả theo sáng chế là rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này và các nguyên tắc chung được xác định theo sáng chế có thể được áp dụng cho các ví dụ và ứng dụng khác mà không đi chệch khỏi phạm vi của các phương án khác nhau. Do đó, các phương án khác nhau không nhằm giới hạn ở các ví dụ được mô tả và được trình bày ở đây, nhưng nhằm phù hợp với phạm vi thống nhất của các yêu cầu bảo hộ.

Như đã được đề cập, lúa là một trong các cây trồng quan trọng nhất và cần phải duy trì hoặc tăng tốc độ sinh trưởng của lúa để đáp ứng nhu cầu từ dân số ngày càng tăng trên thế giới. Tuy nhiên, cây lúa không phải là loại cây dễ trồng ở bất cứ đâu trong điều kiện bất kỳ, và có rất nhiều loại ứng suất sinh học và phi sinh học khác nhau mà cây lúa phải vượt qua để sinh trưởng khỏe mạnh và tạo ra năng suất cao hơn.

Nói chung, sự phát triển của cây được điều hòa bởi các hormon, và có nhiều hormon đã biết để điều hòa sự phát triển của thực vật như axit salixylic (SA), brasinosteroid (BR), jasmonat (JAs), etylen (ET), axit gibberellic (GA), axit abxissic (ABA) và auxin (AU). Đặc biệt, SA là một hormon phenolic thực vật có vai trò điều hòa và làm trung gian sự sinh trưởng của thực vật và có khả năng truyền tín hiệu và làm trung gian bảo vệ thực vật chống lại mầm bệnh. SA cũng được biết đến là tín hiệu điều hòa trung gian cho phản ứng của thực vật chống lại các ứng suất phi sinh học khác như hạn hán, nhiệt độ môi trường tăng hoặc giảm mạnh, khả năng chịu kim loại nặng và áp suất thẩm thấu.

Nhiều nghiên cứu khác nhau đã được thực hiện và các bài viết đã được công bố, giải thích rằng thực vật tổng hợp hỗn hợp phức tạp của các hormon này để hoạt hóa một bộ gen đặc biệt liên quan đến phòng vệ để chống lại mầm bệnh. Các con đường SA và JA thường tương tác với các con đường phytohormon khác, bao gồm các con đường ABA, GA, BR và AU để tạo thành một mạng lưới lớn cùng điều hòa sự cân bằng giữa sinh trưởng và miễn dịch (Denance và cộng sự, 2013; Wang và cộng sự 2007). *Oryza sativa* thường tổng hợp SA mức độ cao mà không thay đổi đáng kể trong quá trình tấn công của mầm bệnh (Silverman và cộng sự, 1995). Tuy nhiên, ứng dụng ngoại sinh của SA hoặc các chất tương tự chức năng của nó (benzothiadiazol, BTH) sẽ tạo ra các phản ứng phòng vệ đối với phổ rộng của mầm bệnh với các vòng đời và cơ chế lây nhiễm khác nhau (Iwai và cộng sự, 2007; Shimono và cộng sự, 2007). Do đó,

dựa trên các nghiên cứu hiện có, các tác giả tin rằng quá trình truyền tín hiệu phòng vệ ở lúa được thực hiện qua trung gian bởi tín hiệu SA chứ không phải tổng hợp SA.

Con đường truyền tín hiệu SA ở lúa bao gồm hai con đường nhỏ, được biết là được điều hòa bởi WRKY45 và *OsNPR1*. Một số chất cảm ứng hóa học, còn được gọi là chất hoạt hóa thực vật như BTH, bảo vệ thực vật khỏi sự tấn công của bệnh bằng cách hoạt động trên các con đường tín hiệu SA. Hơn nữa, một số gen liên quan đến bệnh sinh (PR) và gen yếu tố phiên mã (TF), chẳng hạn như *OsWRKY62*, *OsNAC4* và *OsHSF1*, được điều hòa tăng cường bởi BTH tương tự chức năng SA và phụ thuộc vào WRKY45 (Nakayama và cộng sự, 2013). Cây lúa chuyển gen biểu hiện quá mức *OsNPR1* (*OsNPR1-OX*) đã được báo cáo cho thấy sự sinh trưởng và phát triển bị ức chế mạnh với nâng cao khả năng kháng bệnh bạc lá do vi khuẩn *Xanthomonas oryzae pv oryzae* (Xoo) (Li và cộng sự, 2016). Hơn nữa, *OsWRKY45* cũng là một yếu tố phiên mã đặc hiệu cho lúa cảm ứng BTH. Sự biểu hiện quá mức của WRKY45 cho thấy khả năng chống chịu tốt đối với bệnh đạo ôn do nấm *Magnaporthe oryzae* gây ra và bệnh bạc lá do vi khuẩn *Xanthomonas oryzae pv oryzae* (Xoo), là hai bệnh hại lúa chính (Takatsuji, 2014). Tuy nhiên, một số báo cáo và bài viết đã chỉ ra rằng sự biểu hiện quá mức của WRKY45 dẫn đến nhược điểm về tổn hại về sinh trưởng và sức khỏe cây trồng (Shimono và cộng sự, 2007; Goto và cộng sự, 2015; Tao và cộng sự, 2011). Do đó, các nghiên cứu đã và đang phân tích sâu hơn các tổn hại về chi phí liên quan đến việc sử dụng promotor lúa để tối ưu hóa sự biểu hiện của WRKY45. Dựa trên các nghiên cứu và báo cáo, do đó người ta tin rằng việc tối ưu hóa sự biểu hiện quá mức của WRKY45 có thể dẫn đến việc kiểm soát sự tổn hại và có thể tăng cường sự sinh trưởng triển của cây.

Ngoài khả năng sinh trưởng và kháng bệnh, kháng thuốc diệt cỏ cũng là một ứng suất phi sinh học ảnh hưởng đến sinh trưởng, phát triển và năng suất của cây lúa. Thuốc diệt cỏ, bao gồm glyxin và glyphosat, ức chế 5-enolpyruvylshikimat-3-phosphat (EPSP) tổng hợp trong con đường axit shikimic ở thực vật. Điều quan trọng phải hiểu rằng con đường axit shikimic trong thực vật tạo ra axit thơm, lignin, flavonoid, phenol và các chất chuyển hóa thứ cấp khác (Shah và cộng sự, 1986; Franz và cộng sự, 1997) hỗ trợ sự phát triển của thực vật. Sự ức chế con đường này gây giảm tạo ra các axit amin thơm, cụ thể đối với sự tổng hợp protein ở thực vật, và axit indol-3-axetic (IAA)

(Muller và cộng sự, 1998), cuối cùng dẫn đến chết cây (Funke và cộng sự, 2006). Dựa trên thực tế thường được biết đến về EPSPS, các nghiên cứu đã được thực hiện chủ yếu về khả năng kháng thuốc diệt cỏ của cây lúa thay vì các tính trạng lý học khác. Biểu hiện của EPSPS ảnh hưởng đến sự sinh trưởng, khả năng cạnh tranh, năng suất và sức khỏe lâu dài của cây lúa được biết đến ít hoặc thậm chí chưa được biết đến. Thay vào đó, các nghiên cứu và thí nghiệm chỉ tập trung vào khả năng của gen đối với khả năng kháng thuốc diệt cỏ.

Trước đây đã có báo cáo rằng cây lúa lai giữa cây lúa biến đổi gen mà gen EPSPS lúa biểu hiện quá mức cho thấy sự sinh trưởng và khả năng sinh sản của cây rất mạnh và bền vững mà không cần tiếp xúc với glyphosat (Wang và cộng sự, 2014). Tuy nhiên, báo cáo đã gây tranh cãi trong một trong các bức thư gửi cho biên tập viên của tạp chí *New Phycologist* vì nó được coi là thiếu bằng chứng cho thấy gen chuyển EPSPS của lúa đem lại khả năng kháng glyphosat hoặc lúa cỏ chuyển gen khỏe mạnh hơn so với dòng hoang dại của nó (Gressel và cộng sự, 2014). Mặc dù người ta khẳng định rằng cây lúa lai cỏ chuyển gen đem lại khả năng kháng glyphosat, tuy nhiên không có thông tin nào được các tác giả cung cấp về cải biến trình tự, hoặc các sản phẩm protein của nó là Km hoặc Ki cho glyphosat. Hơn nữa, không có dữ liệu nào được đưa ra về khả năng sinh sản của cây lúa chuyển gen so với giống bố mẹ (Gressel và cộng sự, 2014). Ngoài ra, thiếu dữ liệu phân tử về các gen chuyển và không có dữ liệu về mức độ tăng năng suất do gen EPSPS được cải biến mang lại cho cây lúa được canh tác, mà cần để làm cơ sở so sánh với mức tăng năng suất mà nó mang lại cho cây lúa-cỏ. Điều này sẽ đặt dữ liệu về sự gia tăng khả năng sinh sản của lúa cỏ dưới góc độ liệu điều này có tương tự với các trường hợp khác khi năng suất tăng của cây trồng đưa gen của cỏ dại liên quan hay không. Nhiều nghiên cứu cho thấy rằng các gen nội sinh từ cây trồng tăng tốc độ sinh trưởng và/hoặc khả năng sinh sản của loại cỏ dại liên quan mà cây trồng có thể thụ phấn chéo (Ellstrand, 2003). Bất cứ khi nào các tính trạng nâng cao năng suất được đưa vào cây trồng, chúng có thể nhanh chóng đưa gen vào các loài cỏ dại nhiễm bệnh liên quan (Arrigo và cộng sự, 2011; Perez-Jones và cộng sự, 2006; Rehman và cộng sự, 2006; Weissmann và cộng sự, 2005). Do đó, khả năng sinh trưởng và tăng khả năng sinh sản ở lúa lai cỏ dại có thể là kết quả của các gen nâng cao năng suất khác trên cây lúa chứ không phải là gen chuyển EPSPS của cây lúa được cải biến.

Do đó, với những vấn đề nêu trên, cần phải tạo ra một gen tái tổ hợp có khả năng cải thiện khả năng kháng thuốc diệt cỏ, vi khuẩn và nấm cũng như nâng cao các tính trạng nông học ở cây lúa. Do đó, sáng chế bộc lộ gen tái tổ hợp có axit nucleic bao gồm gen EPSPS thứ nhất có trình tự axit amin theo SEQ ID no. 1 và gen EPSPS thứ hai có trình tự axit amin theo SEQ ID no. 2, trong đó gen tái tổ hợp được dung hợp với gen mã hóa yếu tố phiên mã có trình tự axit amin theo SEQ ID no. 3. Sáng chế nhấn mạnh rằng gen tái tổ hợp cải thiện khả năng kháng thuốc diệt cỏ, vi khuẩn và nấm với các tính trạng nông học được nâng cao.

Theo một phương án của sáng chế, gen EPSPS thứ nhất thu được từ vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* CP4 có trình tự axit amin theo SEQ ID no. 1 và gen EPSPS thứ hai thu được từ *Oryza sativa* có trình tự axit amin theo SEQ ID no. 2. Sau đó, gen tái tổ hợp được dung hợp với gen của *Oryza sativa* mã hóa yếu tố phiên mã là WRKY45 với trình tự axit amin theo SEQ ID no. 3. Trình tự được minh họa trong Fig. 6A và 6B. Các phân đoạn gen EPSPS của vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* CP4 và EPSPS của *Oryza sativa* cũng như WRKY45 của *Oryza sativa* được tổng hợp và tạo ra bằng cách sử dụng các phương pháp thông thường đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Sau đó, phân đoạn này được nối với phân đoạn khác như một loạt các promotor và terminator để tạo thành gen quan tâm hoàn chỉnh bằng kỹ thuật PCR gen chồng lặp (overlapping PCR).

Thông thường, các promotor có vai trò khởi đầu phiên mã cho một gen cụ thể và các terminator có vai trò kết thúc và đánh dấu sự kết thúc phiên mã của một gen cụ thể. Người ta đã thảo luận trước đó rằng promotor và terminator ảnh hưởng đến sự biểu hiện quá mức của các gen, điều này sẽ ảnh hưởng đến điều kiện sinh trưởng của cây. Do đó, mục tiêu của sáng chế là tối ưu hóa loại promotor cũng như terminator được sử dụng để thu được cây có các tính trạng lý học nâng cao. Theo một phương án của sáng chế, sự biểu hiện của gen EPSPS thứ nhất được điều hòa bởi ít nhất một promotor và promotor này tốt hơn là promotor ubiquitin của *Zea mays*. Theo một phương án khác của sáng chế, sự biểu hiện của gen EPSPS thứ hai cũng như gen mã hóa yếu tố phiên mã cũng được điều hòa bởi ít nhất một promotor và promotor này tốt hơn là promotor CaMV 35s đơn.

Để xác định tính hiệu quả của gen tái tổ hợp, cây chuyển gen được tạo ra bằng cách sử dụng gen tái tổ hợp. Theo một phương án khác của sáng chế, gen tái tổ hợp được nhân dòng bằng vector, tốt nhất là vào vị trí Acc65I và PmlI của pCAMBIA1301 T-DNA. Sau đó vector được đưa vào tế bào chủ. Tế bào chủ, theo sáng chế, tốt hơn là tế bào thực vật và tế bào thực vật đó có thể được chọn từ nhóm bao gồm cây trồng trên đồng ruộng, trái cây và rau. Cụ thể hơn là, tế bào thực vật có thể được chọn từ các loại ngũ cốc như ngô, gạo, lúa mì, lúa mạch, cao lương, kê, yến mạch, v.v.. Tế bào thực vật cũng có thể được chọn từ các loại cây trồng khác như đậu nành, bông, củ cải đường, cải dầu, v.v.. Theo một phương án được ưu tiên của sáng chế, tế bào thực vật tốt hơn thu được từ cây lúa. Loại tế bào thực vật được sử dụng theo sáng chế không được giới hạn ở các loại được đề cập trong bản mô tả này. Các phương pháp đưa vector vào tế bào thực vật có thể bao gồm nhưng không giới hạn ở các phương pháp sau đây: (i) súng bắn gen vào vật liệu bằng các hạt được phủ polynucleotit; (ii) bằng xuyên qua vật liệu hoặc sợi silic cacbua được phủ bằng dung dịch chứa polynucleotit; (iii) bằng cách đưa polynucleotit hoặc vector vào vi khuẩn *Agrobacterium* và đồng nuôi cấy vi khuẩn *Agrobacterium* được chuyển gen như vậy với vật liệu thực vật, do đó được chuyển gen và tái sinh. Theo phương án được ưu tiên hơn theo sáng chế, vector được đưa vào dòng *Escherichia coli* thương mại. Sau đó, vật liệu nuôi cấy được sinh trưởng để thu được các mầm hoặc hạt có gen quan tâm theo sáng chế, sau đó sẽ được trồng thành cây chuyển gen. Quy trình sản xuất vector, tế bào chủ và cây chuyển gen được coi là quy trình phòng thí nghiệm thông thường mà quen thuộc đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Do đó, các quy trình được đề cập ở đây không bị giới hạn vì các quy trình có thể đòi hỏi biến tùy theo từng trường hợp.

Trình tự của toàn bộ gen tái tổ hợp được minh họa trong Fig. 6A và 6B. Như đã được đề cập trước đó, gen tái tổ hợp được tổng hợp từ sự kết hợp của các gen và trình tự của các gen cũng được xác định và minh họa trong Fig. 6A và 6B. Để dễ tham khảo, trình tự của các gen được đánh số và danh sách được bổ sung dưới đây:

SEQ. ID NO. 1 – gen EPSPS của *Agrobacterium tumefaciens* chủng CP4

SEQ. ID NO. 2 – gen EPSPS của *Oryza sativa*

SEQ. ID NO. 3 – gen WRKY45 của *Oryza sativa*

SEQ. ID NO. 4 – tín hiệu CaMv poly A

SEQ. ID NO. 5 – Hygromycin

SEQ. ID NO. 6 – promoter CaMv35s, lặp

SEQ. ID NO. 7 – promoter ubiquitin của *Zea mays*

SEQ. ID NO. 8 – Nos (Nopalin Syntaza) 3' UTR (tín hiệu polyA)

SEQ. ID NO. 9 – promoter CaMV 35s

SEQ. ID NO. 10 – Nos (Nopalin Syntaza) 3' UTR (tín hiệu polyA)

Cụ thể, sự phát triển của cây chuyển gen trải qua quá trình nảy mầm mà hạt được nảy mầm đầu tiên trên bông gòn có hygromycin. Quá trình nảy mầm bao gồm nhiều bước và quá trình nảy mầm được coi là hoàn thành khi vỏ hạt vỡ ra và rễ nhú ra từ hạt. Do đó, các hạt giống đã nảy mầm thành công được cho là sẽ sinh trưởng và trở thành cây chuyển gen mang gen tái tổ hợp cũng như các đặc điểm cần thiết. Fig. 1A và 1B minh họa quá trình nảy mầm mà hạt được nảy mầm. Trước khi nảy mầm, hạt được ngâm trong nước hai ngày. Sau đó, hạt được để nảy mầm trong đồ để chứa chứa đầy bông gòn hoặc giấy đã được làm ẩm. Bông gòn được làm ẩm chứa khoảng 30mg/l hygromycin B, mà sự có mặt của hygromycin giúp sàng lọc các hạt chuyển gen. Hạt nảy mầm, sau khoảng bảy ngày, có chồi và rễ thì được chuyển ra đất để trồng tiếp. Tất cả các quy trình được tiến hành ở nhiệt độ phòng trong điều kiện ánh sáng ban ngày bình thường và chu kỳ đêm trong nhà kính chuyển gen BSL2. Rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, các quy trình được đề cập trong bản mô tả được coi là quy trình chung của phòng thí nghiệm. Các quy trình này có thể được sửa đổi để phù hợp với các điều kiện theo yêu cầu của loại cây trồng cụ thể được sử dụng.

Một loạt các tính trạng nông học đang được nông dân và các nhà nghiên cứu nhấn mạnh và theo dõi trong nhiệm vụ của họ trong việc tăng cường sự sinh trưởng của cây lúa và tăng năng suất lúa. Theo sáng chế, các tác giả tập trung vào các tính trạng nông học cụ thể như năng suất và chiều cao cây của cây chuyển gen. Sự sinh trưởng của cây chuyển gen được theo dõi bằng cách ghi lại các đặc điểm vật lý của cây chuyển gen. Theo phương án của sáng chế, các đặc điểm vật lý được ghi lại bao gồm

số nhánh, số bông, số nhánh không có bông, số bông không có hạt, số bông có hạt, số lượng bông dài, trung bình và ngắn trên cây, và khối lượng của hạt.

Fig. 2A là bảng thống kê tỷ lệ bông có hạt trên tổng số nhánh của mỗi cây lúa chuyển gen. Từ Fig. 2A, số nhánh trung bình trên mỗi cây là 45,5 và số bông trung bình trên mỗi cây là 41,13. Để làm rõ, trong số các nhánh và bông lúa này, chỉ có khoảng 4 nhánh được trồng mà không có bông và khoảng 8 bông được trồng mà không có hạt. Hơn nữa, Fig. 2A cho thấy tỷ lệ bông có hạt trung bình trên tổng số nhánh là 72,89%. Cũng cần lưu ý rằng trong số 8 cây chuyển gen được trồng, một trong các cây chuyển gen (tức là T1/7) có tỷ lệ bông có hạt trên tổng số nhánh cao nhất, là 83,33%. Tỷ lệ phần trăm cao hơn quan trọng vì tỷ lệ phần trăm quyết định năng suất lúa. Do đó, tỷ lệ này càng cao thì càng có nhiều bông của cây chứa hạt, điều này cuối cùng sẽ góp phần vào năng suất lúa. Fig. 4 minh họa cây lúa được cắt ở phần dưới cùng để cho thấy các nhánh mọc bên trong cây lúa.

Tính trạng nông học khác được minh họa trong Fig. 2B là chiều dài của bông phát triển trong cây chuyển gen, góp phần vào chiều cao của cây. Fig. 2B cho thấy mỗi cây có trung bình 63,38% số bông dài. Cũng lưu ý rằng trong số 8 cây chuyển gen được trồng, cây chuyển gen T1/7 có tỷ lệ bông dài cao nhất trong cây, là 72,73%. Bông thu được trong cây càng dài thì bông càng cao và càng chứa nhiều hạt, do đó làm tăng năng suất của cây. Fig. 3A và 3B minh họa chiều dài của các bông thu được từ cây chuyển gen, trong đó cả hai bông đều vượt quá 25cm. Vì vậy, điều quan trọng đối với cây chuyển gen là không chỉ có phần trăm số nhánh và bông nhiều mà còn có cây cao hơn với chiều dài của bông dài hơn.

Tính trạng lý học khác được theo dõi và ghi lại là khối lượng của hạt. Theo sáng chế này, khối lượng được ghi lại cho mỗi 1000 hạt tính bằng gam. Khối lượng trung bình được ghi lại trong Fig. 2C là 24,725g và khối lượng nặng nhất được ghi lại cũng là từ cây chuyển gen T1/7. Khối lượng của hạt cho thấy các bông chứa hạt thay vì hạt lép. Do đó, hạt càng nặng thì càng chứa nhiều hạt gạo trong vỏ, do đó làm tăng năng suất gạo.

Fig. 5 của hình vẽ minh họa triển vọng của các cây chuyển gen. Như trong Fig. 5, cây chuyển gen cao và mảnh mai với hầu hết các lá của chúng dựng thẳng lên và một số ít lá ở phần dưới cùng của cây uốn cong về phía mặt đất. Cây lúa ban đầu và

bình thường cũng cao và mảnh mai. Tuy nhiên, thông thường, lá của chúng hầu như bị uốn cong, bao gồm cả bông lúa. Đây cũng là một trong những lý do tại sao người nông dân luôn trồng cách xa nhau. Khoảng trống giữa các cây lúa tạo không gian cho lá và bông lúa uốn cong và sống và tránh trồng quá dày dẫn đến chết cây lúa. Các bông bị cong chủ yếu là do hạt đã chín, mà khối lượng của hạt đã chín cuối cùng sẽ làm các bông bị uốn cong xuống dưới. Cũng có trường hợp các bông quá yếu, không thể giữ được khối lượng của hạt chín và cuối cùng gãy xuống đất. Hạt đã chín bị rơi xuống đất sẽ rất lãng phí, cuối cùng làm giảm năng suất lúa. Lá và bông bị uốn cong cũng cản ánh sáng mặt trời đối với lá mới mọc dưới gốc cây, do đó cản trở sự sinh trưởng của cây lúa.

Không giống như các cây lúa này, cây lúa chuyển gen thu được theo sáng chế không đòi hỏi trồng cây lúa chuyển gen với khoảng cách rộng vì lá và bông lúa mọc thẳng. Do đó, điều này cho phép người nông dân bố trí và trồng nhiều cây lúa hơn trong một không gian cụ thể. Hơn nữa, cấu trúc lá mọc thẳng cho phép ánh sáng mặt trời có thể chiếu xuyên qua phần dưới của cây, giúp các lá phía dưới phát triển. Bông lúa được trồng từ cây lúa chuyển gen dường như cũng khỏe hơn so với cây lúa thường và cây lúa ban đầu. Với bông khỏe hơn, hạt giống được mọc trên bông sẽ không dễ dàng uốn cong bông và rơi xuống đất, mà thay vào đó, chúng có thể được thu hoạch toàn bộ.

Ngoài các tính trạng nông học, gen tái tổ hợp được bộc lộ theo sáng chế tạo ra cây lúa chuyển gen có khả năng kháng thuốc diệt cỏ, vi khuẩn và nấm. Đặc biệt, cây chuyển gen kháng sự phát triển của vi khuẩn - *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo), và nấm - *Magnaporthe oryzae*. Có nhiều cách để kiểm tra khả năng kháng thuốc diệt cỏ của thực vật chuyển gen, cụ thể là thử nghiệm trong chậu trong nhà kính bằng cách sử dụng hạt hoặc cây trồng, thử nghiệm trên đĩa petri, thử nghiệm phân tử hoặc thử nghiệm trong phòng thí nghiệm đánh dấu phóng xạ. Theo phương án được ưu tiên của sáng chế, glyphosat đã được sử dụng để kiểm tra khả năng kháng thuốc diệt cỏ của cây chuyển gen. Trong quá trình kiểm tra, các cây chuyển gen được phun 2,8l/ha glyphosat trong thời gian ba tuần. Sau đó, trạng thái của cây chuyển gen được kiểm tra để xác định xem chúng có thể sống sót sau khi được phun glyphosat trong khoảng thời gian hai tuần hay không. Từ các thí nghiệm, điều đáng chú ý là cây chuyển gen vẫn sống

sót sau khi sử dụng glyphosat mà không có thay đổi rõ ràng nào đối với cây chuyển gen. Thay vào đó, cây lúa không được chuyển gen được phun glyphosat bắt đầu héo và chết sau hai đến ba ngày. Sau lần sử dụng glyphosat đầu tiên, cả cây chuyển gen và cây lúa không được chuyển gen lại được phun glyphosate một lần nữa. Ở lần sử dụng thứ hai, một lần nữa cây chuyển gen không có dấu hiệu héo hay chết. Các cây chuyển gen được duy trì trong nhà kính để phát triển thêm. Từ các thí nghiệm, người ta kết luận rằng cây chuyển gen có khả năng kháng thuốc diệt cỏ.

Đối với khả năng kháng vi khuẩn, cây chuyển gen nên có khả năng kháng vi khuẩn - *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) do cây chuyển gen bao gồm gen của *Oryza sativa* WRKY45 thường được biết là có khả năng kháng vi khuẩn này. Nói chung, sự nhiễm bệnh bạc lá do vi khuẩn trên cây lúa làm cho cây con bị héo, vàng và khô lá, cuối cùng gây chết cây. Nhiệt độ thích hợp cho bệnh là từ 25 đến 34°C với độ ẩm tương đối trên 70%. Bệnh bạc lá do vi khuẩn dễ dàng gây chết cây con bị nhiễm bệnh trong thời gian từ hai đến ba tuần. Cây trưởng thành có thể sống sót, tùy thuộc vào mức độ bệnh, nhưng chắc chắn sẽ ảnh hưởng đến năng suất và chất lượng lúa. Một số phương pháp đã được biết để được sử dụng trong kiểm soát và chống lại bệnh bạc lá do vi khuẩn trên cây lúa, và các phương pháp bao gồm các biện pháp kiểm soát sinh học và hóa học. Tuy nhiên, các phương pháp này không hiệu quả bằng canh tác cây lúa mang gen kháng vi khuẩn. Theo một trong những phương án được ưu tiên theo sáng chế, lá bị nhiễm bệnh bạc lá do vi khuẩn được thu thập và cắt thành các mảnh nhỏ để thực hiện quy trình nhiễm bệnh. Quy trình này là quy trình phòng thí nghiệm thông thường và được biết đến rộng rãi và rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực. Cây biến đổi gen được nhiễm khuẩn được trồng trong thời gian 14 ngày và tiến hành quan sát. Mức độ nghiêm trọng của bệnh bạc lá do vi khuẩn được quan sát bằng cách xác định xem có dấu vết của cây con bị héo và vàng và khô lá hay không. Quan sát thấy rằng hầu hết các cây chuyển gen không có dấu vết như vậy. Cây chuyển gen như vậy được duy trì trong nhà kính để quan sát thêm. Do đó, kết luận rằng cây chuyển gen có khả năng kháng vi khuẩn – *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo).

Nấm *Magnaporthe oryzae* có thể gây ra bệnh đạo ôn trên cây lúa, ảnh hưởng đến hầu hết các bộ phận của cây, tức là lá, cổ lá, mắt, cổ bông, các bộ phận của bông

và thậm chí trên bẹ lá, ngoại trừ rễ cây. Không có giai đoạn sinh trưởng cụ thể mà ở đó và vào thời điểm đó nấm tấn công, người ta cho rằng nấm tấn công ở tất cả các giai đoạn sinh trưởng của cây lúa. Sự nhiễm khi nấm tấn công có thể được quan sát thấy với các triệu chứng như vết tổn thương và đốm. Theo thời gian và không được xử lý đúng cách, các vết tổn thương có thể to ra và lớn lên cùng nhau, làm chết lá hoặc một phần của cây bị nhiễm bệnh. Người ta tin rằng nhiễm bệnh nặng có thể làm chết cây lúa và làm giảm năng suất. Để tránh và ngăn ngừa sự nhiễm nấm này, cần thực hiện các biện pháp phòng ngừa như đốt rơm, rạ đã bị nhiễm bệnh trước đó, sử dụng hạt giống sạch bệnh và cân đối tỷ lệ dinh dưỡng. Tuy nhiên, các nghiên cứu đã chỉ ra rằng đây không phải là cách hiệu quả nhất để kiểm soát và ngăn ngừa sự tấn công của nấm. Thay vào đó, cách phòng trừ tốt nhất là sử dụng và trồng lúa có đặc khả năng kháng bệnh. Theo một trong những phương án được ưu tiên của sáng chế, các lá bị nhiễm nấm được thu thập và cắt thành các mảnh nhỏ cho quy trình nhiễm bệnh. Quy trình này là quy trình phòng thí nghiệm thông thường và được biết đến rộng rãi và rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực. Cây biến đổi gen được nhiễm được trồng trong thời gian 14 ngày và tiến hành quan sát. Mức độ nghiêm trọng của bệnh bạc lá do vi khuẩn được quan sát bằng cách xác định xem có dấu vết của các vết tổn thương trên toàn bộ cây hay không. Người ta quan sát thấy rằng hầu hết các cây chuyển gen không có dấu vết như vậy. Cây chuyển gen được duy trì trong nhà kính để quan sát thêm. Với những quan sát này, có thể kết luận rằng cây chuyển gen có khả năng kháng nấm - *Magnaporthe oryzae*.

Bên cạnh những điều trên, rõ ràng là người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể chọn thí nghiệm bất kỳ để kiểm tra khả năng kháng thuốc diệt cỏ, vi khuẩn và nấm của cây chuyển gen. Các bước và quy trình thử nghiệm không giới hạn như đã nêu ở trên và có thể được sửa đổi khi cần thiết đối với các loại cây khác nhau.

Mặc dù chỉ có một số phương án được lấy làm ví dụ đã được mô tả chi tiết ở trên, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ dễ dàng nhận thức rằng có thể thực hiện các cải biến trong các phương án được lấy làm ví dụ mà không đi chệch khỏi tính mới và thuận lợi của sáng chế. Ngoài ra, các khía cạnh của các phương án được bộc lộ trong bản mô tả có thể được kết hợp trong các kết hợp khác để tạo

thành các phương án bổ sung. Theo đó, tất cả các cải biến như vậy đều được dự định là bao gồm trong phạm vi của sáng chế.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Gen tái tổ hợp để cải thiện khả năng kháng thuốc diệt cỏ, vi khuẩn và nấm cũng như tạo ra tính trạng nông học nâng cao, gen tái tổ hợp được đặc trưng bởi axit nucleic bao gồm gen EPSPS thứ nhất với trình tự axit amin theo SEQ ID no. 1 và gen EPSPS thứ hai với trình tự axit amin theo SEQ ID no. 2, trong đó gen tái tổ hợp được dung hợp với gen mã hóa yếu tố phiên mã với trình tự axit amin theo SEQ ID no. 3.
2. Gen tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó gen EPSPS thứ nhất thu được từ chủng *Agrobacterium tumefaciens* CP4.
3. Gen tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó gen EPSPS thứ hai thu được từ *Oryza sativa*.
4. Gen tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó gen mã hóa yếu tố phiên mã là WRKY45 của *Oryza sativa*.
5. Gen tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó biểu hiện của gen EPSPS thứ nhất được điều hòa bởi ít nhất một promoter.
6. Gen tái tổ hợp theo điểm 5, trong đó biểu hiện của gen EPSPS thứ nhất tốt hơn là được điều hòa bởi promoter ubiquitin của *Zea mays*.
7. Gen tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó biểu hiện của gen EPSPS thứ hai và gen mã hóa yếu tố phiên mã tốt hơn là được điều hòa bởi ít nhất một promoter.
8. Gen tái tổ hợp theo điểm 7, trong đó biểu hiện của gen EPSPS thứ hai và gen mã hóa yếu tố phiên mã tốt hơn là được điều hòa bởi promoter CaMV 35s đơn.
9. Gen tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó khả năng kháng vi khuẩn bao gồm kháng sự sinh trưởng của *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *Xoo*.

10. Gen tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó khả năng kháng nấm bao gồm kháng sự sinh trưởng của *Magnaporthe oryzae*.
11. Gen tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó tính trạng nông học được chọn từ một trong số hoặc kết hợp của năng suất cây trồng và chiều cao cây trồng.
12. Vector bao gồm gen tái tổ hợp theo điểm 1.
13. Tế bào chủ bao gồm vector theo điểm 12.
14. Tế bào chủ theo điểm 13, trong đó tế bào chủ là tế bào thực vật.
15. Tế bào chủ theo điểm 14, trong đó tế bào thực vật được chọn từ ngô, lúa, lúa mỳ, lúa mạch, cao lương, kê, yến mạch, đậu tương, bông, củ cải đường và cải dầu.
16. Tế bào chủ theo điểm 15, trong đó tế bào thực vật tốt hơn là tế bào cây lúa.
17. Cây chuyển gen bao gồm tế bào chủ theo điểm 13.

1/6

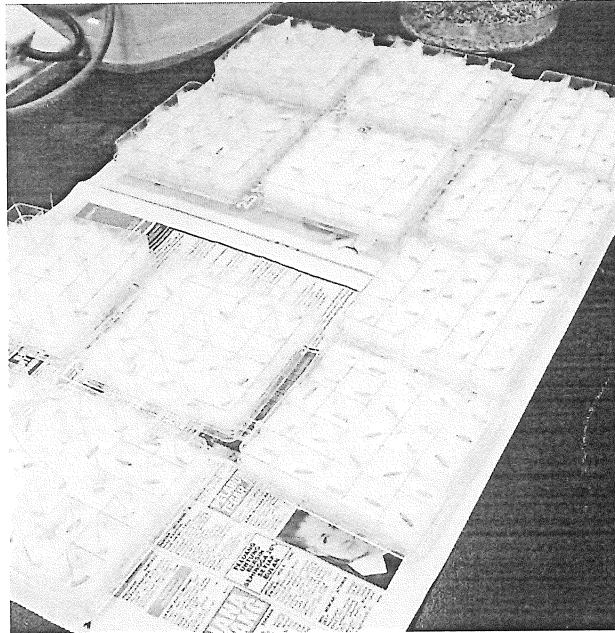


Fig. 1A



Fig. 1B

2/6

Cây	Nhánh không có bông	Bông không có hạt	Bông có hạt	Số nhánh/cây	Số bông/cây	Bông có hạt/Tổng số nhánh
T1/1	4	15	42	61	57	68,85%
T1/2	1	7	35	43	42	81,40%
T1/3	2	6	26	34	32	76,47%
T1/4	8	11	27	46	38	58,70%
T1/5	6	11	39	56	50	69,64%
T1/6	4	6	28	38	34	73,68%
T1/7	4	4	40	48	44	83,33%
T1/8	6	5	27	38	32	71,05%
Trung bình	4,38	8,13	33,00	45,50	41,13	72,89%

Fig. 2A

Cây	Bông dài (>25cm)	Bông trung bình (24cm-20cm)	Bông ngắn (<20cm)	Tỷ lệ phần trăm bông dài
T1/1	32	7	3	56,14%
T1/2	25	8	2	59,52%
T1/3	23	3	0	71,88%
T1/4	23	4	0	60,53%
T1/5	25	14	0	50,00%
T1/6	24	3	1	70,59%
T1/7	32	8	0	72,73%
T1/8	21	6	0	65,63%
Trung bình	25,63	6,63	0,75	63,38%

Fig.2B

Cây	Khối lượng/1000 hạt (gam)
T1/1	24,2
T1/2	23,7
T1/3	24,9
T1/4	25,2
T1/5	24,2
T1/6	24,8
T1/7	28,8
T1/8	25,0
Trung bình	24,725

Fig.2C

3/6

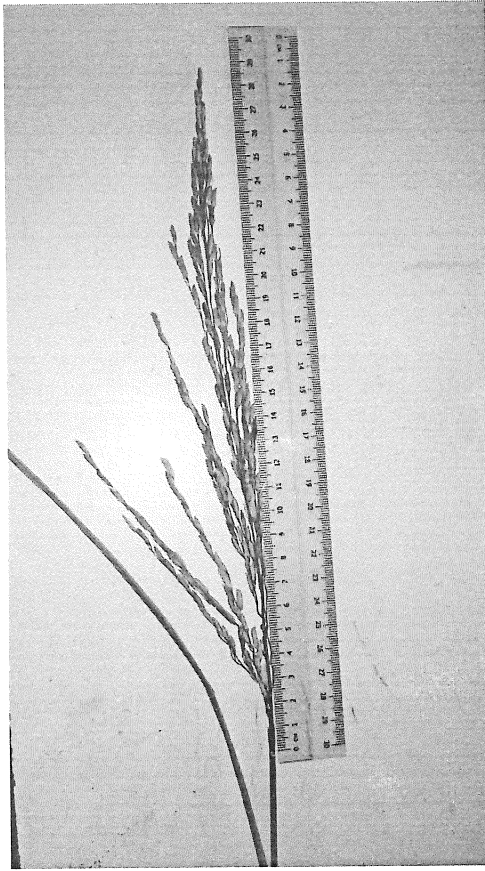


Fig. 3A

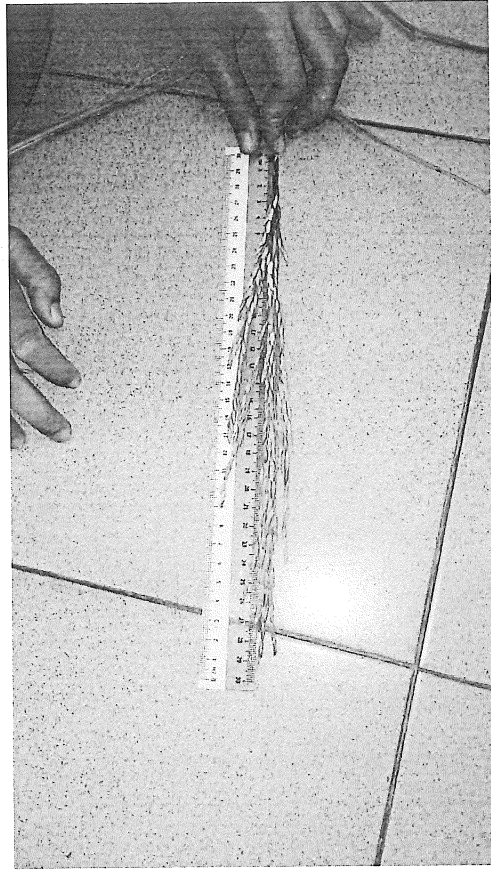


Fig. 3B

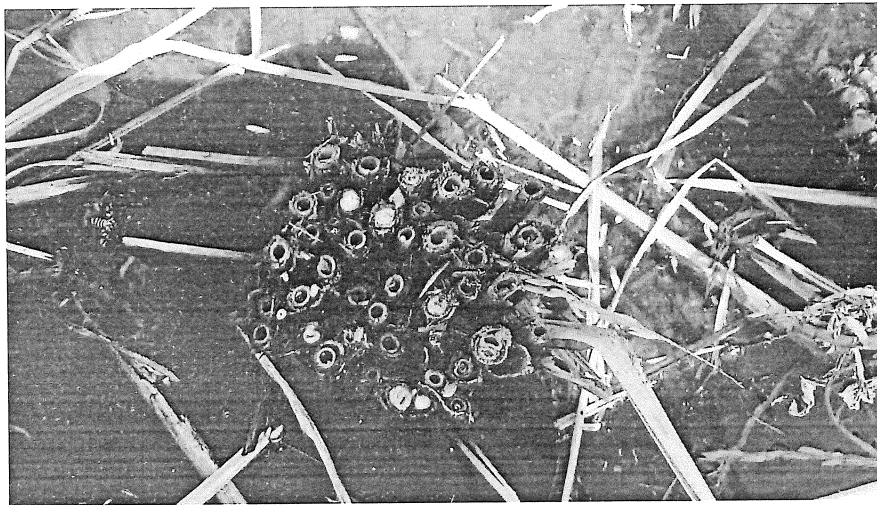


Fig. 4



Fig.5

5/6

tggcaggatatttgggtgtaaacaaattgacgcttagacaacttaataacacattgcgagcgtttt
 taatgtactgaattaacgcgcgaattaattcggggatctggattttagtactggattttggttttagg
 aattagaaattttattgatagaagtattttacaatacaatacataactaagggtttcttatatgctc

CaMy poly A signal

Aacacatgagcgaaccctataggaaccctaattcccttatctggaactactcacacattattatgg
 agaaactcgagccttgcgatcgacagatccggtcgcatctact

SEQ. ID NO. 4

atctcattgcccccggt
 atctcggaaagctcgagagagatagattttagagagagactggtgatttcagcgtgtcctctccaaa
 tgaatgaacttcccttatatagaggaaggtcttgcgaaggatagtggtggtgcgtcatcccttacg
 tcagtgagagatcacatcaatccacttgccttgaagacgtggttgaacgtcttcttttccacgat
 gctcctcggtgggtgggtccatcttggggaccactgtcggcagaggaatctgaacgatagcctttc
 ctttatcgcaatgatggcattttaggtgccaacttccctttctactgtccttttgatgaagtgcacg

SEQ. ID NO. 5

atctcattgcccccggt
 atctcggaaagctcgagagagatagattttagagagagactggtgatttcagcgtgtcctctccaaa
 tgaatgaacttcccttatatagaggaaggtcttgcgaaggatagtggtggtgcgtcatcccttacg
 tcagtgagagatcacatcaatccacttgccttgaagacgtggttgaacgtcttcttttccacgat
 gctcctcggtgggtgggtccatcttggggaccactgtcggcagaggaatctgaacgatagcctttc
 ctttatcgcaatgatggcattttaggtgccaacttccctttctactgtccttttgatgaagtgcacg

CaMV35S promoter, duplicated

atagctgggcaatggaatccgaggaggtttcccgatattaccccttgggtgaaagtctcaatagccct
 ttggtctctgagacgttatctttgatattcttggagtagacgagagtgctgctccaccatgttat
 cacatcaatccacttgccttgaagacgtggttgaacgtctctcttttccacgatgctcctcggtgggt
 gggggccatcttgggaaccactgtcggcagaggaatcttgaacgatagccttcccttatcgcaatg
 atggcattttaggtgccaacttcccttttctactgtccttttgatgaagtgcacgatagctgggcaat
 ggaatccgaggaggtttcccgatattaccccttgggtgaaagtctcaatagcccttgggtctctgag
 actgtatctttagatattcttggagtagacgagagtgctgctccaccatgttggcaagtgtcttag
 ccaatcgcaaacgcctctcccgcgctgtggcgatctcaatgaacgtggcagcagaggtttcc
 cgactggaagcgggcagtgagcgcaacgcaatgaatgtgagtttagctcaacttaggcaccccgag
 ctttacactttatgctccggtcgtatgttgtggaattgtgagcggaatacaatttcacacagga
 aacagctatgacatgattacgaattcgagctcggtacgctgagtgacgctgaccccggtcgtgccc
 ctctctagagataatgagcatttgcattgtctaagttataaaaaattaccacatatttttttgcacac
 ttgtttgaagtgcagtttatctatctttatataatattttaaactttactctacgaataataataatct
 atagtactacaataatcagtggttttagagaatcatataaagaacagtttagacatggtctaaagga
 caattgagtttttgacaacaggaactctacagttttatctttttagtgcatgtgtctcctttttt
 ttgcaaatagcttcaactatataatacttccatctttttagtagacatccatttaggggttaggggt
 taatgggtttttatagactaatttttttagtagacatctattttattctatttttagcctctaaattadga
 aactaaaactctatttttagtttttttatttaataatttttagatataaaaataaataaagaagtgact
 aaaaattaaaacaaataccctttaagaaattaaaaaaactaaggaacatttttctgtttcgagtaga
 taatgcagcctgtttaaagcgcgtcgacgaggtctaagcagacacacacacagcgaacagcagcgtcg
 tcgggccaagcgaagcagacgagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
 tcacacgttggacttgcctcgcgtgtcgccatccagaaattgctggcgagcggcagcagcagcagcagc
 cagcgagcggcgcctcctcctcctcctcagcgcagcgcagcgcagcgcagcgcagcgcagcgcagcgc
 tcggtttccttctcgcgcgcgcgtaataaataagacacccctccacacccctcttccccaacccctg
 gttgttcggagcgcac
 ggtacgcgcgtcgtcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctc
 agggcgcgcgttagttctacttctgttctgttctgttctgttctgttctgttctgttctgttctgtt
 agcgttctgtacacggatgcgacctgtacgtcagacacgttctgtattgctaacttgcagtggttctct

SEQ. ID NO. 6

Reg. mays ubiquitin promoter

tggggaaatcctgggatggcttagcgggttccgcagacgggatcgatttcatgattttttttgtttcc
 ttgcattaggggtttgggtttgcccttttcttttatttcaatatatgcgcgtgcaactgttttgcgggtcat
 cttttcatgcttttttttgccttgggttggatgagtggtctggttggggtggttcttagatcgagag
 tagaattctgtttcaaaactacgtgggtgatttatttaattttggatctgtatgtgtggtccatacatat
 tcatagttacgaattgaagatgatggatggaatatcgatctaggataggtatcatggtttagtcgggg
 ttttactgattgcatatcacagagatgcttttttgcgttgggttggatgagtggttgggttgggttggg
 tgcgttcaattcgttctagatcgagtagaataactgtttcaaaactacgtggttatttatttaattttgga
 actgtatgtgtgtgtcatatcttcatagttacgagttttagatggatggaatatcgatctaggat
 aggtatcatggtttagtggtgttttactgagtcatacatatgagtcagtcagtcagtcagtcagtcagtc
 gctataaccttgagtagcctatctattataataaaacagtagttttataaattattttgactcttgat
 acttggatgagtcagtcagtcagtcagtcagtcagtcagtcagtcagtcagtcagtcagtcagtcagtc
 ttgcttggtagtcttttttgcgtgctcaccctgttgggttgggttacttctgcaggttaacatg
 cgttcaacgcgcgcgtgcggcggtgtccctggaccagcgcgtggcggtgcggcggtgcggcggttctc

SEQ. ID NO. 7

Continue on to figure 6B

Fig. 6A

gtcgcggaagcaqctgcqctgccgcgcgcgcgcgcgggggatgcgggtgcgggtgcgggcgcggg

Oryza sativa EPSPS gene

ggcggcggggaggcggtgtgtgtggcgctccgcgtcgtcgtcgtcgggtggcagcgcggcgcgcggaagcgc
gaggagatcgtgctccagcccatcaggagatctccggggcggttcagctgcggaggtccaaagtctgct
ctccaaaggatctctctctctccgctctccggagctccagacatcagtggtggacaactctgttgcacaa
gtgaagatgttctactacatgctctcgggagcttcatctaggccagctactgccaggaaagtctagcggg
ctcagtggcacggctgcgcactccgtgcgataaaagtatttcaacacagagagcttcatgttcggagagact
tgtctgtggaagacagcagaatacactggttctgtgcttggaggcgcaagatggtatacaacacgggttaaggcg
tgcaagcaatgggtgccagaatccgaaaaaggggcgatacgtggatcatcgacggtgtgtggttaacggga
ggatgtctcgtctccgaagcgcacactgacttgggaacgcagctcaggggtgcgcgtcttactatggg
actcgtgagcgtgatactgacttgaactctacacctcactcgttgacgcgagcgcactcaatagaagacaatgg
gacgagtgctgtaatccctgaggggagatgggtgtccaggtgaaatctaggatgggtgactctctccg
gttactctcgcggggccccaaagacccccagccaatcacgtacaggttccgagtggcgctcagcacatgga
caagtcaagcggtaactcgtcggggcctcaacacacotgtaatacaacoggtatgtgaacctcatgga

SEO, ID NO. 2

Agrobacterium tumefaciens strain CP4 EPSPS gene

Cttagagaccacacggagaagatgtgtcagggttttcggcgctaatactcaacggtcgaaaccgacgccgac
 ggcgtaggagacaatccgcttgaggggcagagggtaaactgactggtccaaagtcatcgatgtgccttgaga
 tccctcgctcacagaattccctccgtagctgcggtgtgctgccttgatctgatctgacgactcctga
 atgtcctcatgaatccaactgaacccggcccatctccacatctgaggagatgggtgtgctgaactgag
 gttatcaatcctagggttgccagggtggagaggatgtggccgactctgcgcgtgcgcttctagtacactcaa
 aggcgtgacgcgtccctgaggatctgcgcctccatcatgactgacagcagatccaccattctgcgcttctgtg
 ctgcggttgccgagggcgcaactgttaatgaacggccttgaggagttgagggtttaaggatcgatgaaagg
 ctgtccggcgttgggcaattggcctgaagctaaacggcgctgggactcgacgaaaggtgaaacgctcccttgt
 agtccgctggtcgcccaacggggaagggtgtggggaattgcttcgggaagctgctgtggcgacgcacacttg
 atcatagaaatcgccatgtcatcttctgggtgactgtctccgagaatccgggtgacccgttgacgat
 gctacatgatgcgcacactcccttcctgagtcttgtagtacctgacggcgttggggcgcaagatcga
 gctgtctgatactaaggcgcttgaaagctattatcacggtgaccagctcgaatttcccgaactgtt
 aacatttgcccaataaagtgttctatgaattgaattctgttgcgggttctggcgatgattatcatataat
 tctgttgtaattacgttaagcatgtaataataaacattgaatgactgacgttattatttgatgagaggttt

SEQ. ID NO.1

nos (nopaline synthase) 3'UTR (polyA signal)

TATGATTAGAGTCCGCGCAATTATACATTTAATACGCGATAGAAACCAAAATATAGCGCGCAAACTAG
 GATAAAATATCGCGCGCGGTGTCATCTATGTTACTGATAGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCAT
 CGACTAGTGGCACTGGCGCTCGTTTACAACGTCGTGACTGGGAAACACCTCGGCTTACCAAACTAA
 TCGCTTGCAGCACTCCCCCTTGCACGCTGGCGTAATAGCGAAGGCGCCGACCGATCGCCTT
 CCAACACTGTGCGCAGCCTGAATGCGCAATGCTAGAGCAGCTTGAGCTTGGATCAGATTGTGCTTTCC
 CGCCTTCAGTTTAGCTTCATGGAATCAAGAGATCAAAATAGAGACCTCAACGAACCTCGCGCTAAAGAC
 TGGCGAACAGTCTCATACAGAGTCTCTACGACTCAATGACGAAGAAGAAATCTTGCTCAACATGGTGT
 AGCAGCACACACTGTCTCTCAAAAAATCTCAAAGATACAGTCTCGAAGACCAAGAGGGCAATTGAG
 ACTTTTCAACAAAGGGTAAATCTCCGGAACCTCTCGGATTCATGCGCCAGCTCATCTGCTCACTTAT
 TGTGAAGATGATGGAAAGGAAAGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCT
 TGAAGAGTGCCTCTGCGACAGTGGTCTCCAAGATGGAACCCCAACCGAGGAGCATCTGTGAAAATA

SEO. ID NO. 8

CaMV 35S promoter

Gaagcagcttccaacacgtcttcaaagcaagtggattgatgtatattccactgcagtaagggatga
cgcaaatcccactctcttcgcaagacctctctatataaaggagttoatttctttggagaaaga
cacgggggactcttgacctggatgacgtcctgatgtgcgcggcgccggcgacgcagcgaggg
tgatggaggacatggagaagggaggagctggcggtgcagctgcagggggctcctcgcgactcgccg
gagcgccggcgtctctgcgcagacagtcttcccacacctctcccgcgcgatcgggcgctgcgaacaggc
ggcgctctcgcgcgcgggaaggagagggctgcggagtgcagagcgagctcactgcgggggcggccg
cgccggcggggaagcgggaagcccccgcgcgcacacgggaaggccaactgccgcaggaggacgcagcaa
ctcgtccgggaatccggctgtctgcgaagaacctgcagacgcgcaggcagctgcggcagatccgggcagaa
ggagatccaaagctccgaagcaccgaagggcctactctcgggtgcagcacaagctacgacagcatgtgca

- SEQ. ID NO. 9

Oryza sativa WRKY45 gene

CGGGCGCAGCGGCAGGTCGACGCTCGACGACGACCGCGCAGGTACAGGGTCACTACATCGGCGAG
CACACCTGCGGGGACCGGCCACCGCCCCCATCATCGGGCGCAAGTCATCAACAGGTCGCGCGCGG
CGACGACGACGACGGTCGCGCGGGCTCAACGCGGGTCCCGCTCATCAAGTTCGTCGCGCGCGG
CGGCGCGCACTAGAGCTGCGCGCGCGCGCGGACGACGAGCATCACCGCGTCAACCGCGCGGGCGCG
CTGCTGACGCGCTCAAGTGTGGAGGGCGGCGATCGGCTCGTCCGACAGGAGGAGTGTGAGCAGCT
CACGCGCGCGCGCTCGCGCGCGCGCGCGGAGTCGCGGGTCCCTCGGCGCGGACAGGGCGAGT
TCAAGTCCTCCCTGCACTGGAGTACGACGAGTCGCGCGGATGAGTTCTCAAGAACGACGAGGTT
GTCTTCGATCTGGACGACATTATGGGTTTGGAGCTTTTGCAAGTGTGAATACAGGTGACAGCTCGA
ATTCCCGCATCTGTTCAAACTCTTGGCAATAAGTTTCTTAAGATCAACTCTGTGCGGCTCTTGG
ATGATCTATCATATAATCTCTTGAATCTGCTTAAGCATGAATAATGAACGTGAATGTCATGACG

SEQ. ID NO. 3

nos (nopaline synthase) 3'UTR (polyA signal)

atttatgagatggggtttttatgattagagtcgcgcgaattatcacatttaatacgcgatagaaaccaaa
tatcgcgccgaactaggataaattatcgcgcggggtgtcatctatgttactagatcgggaattaaac
tatcaagtgtttgacaggatataattgcgcqqtaaac

SEO, ID NO. 10

-24-

TRÌNH TỰ

<110> KIMAGRI CORPORATION SDN BHD

<120> GEN TÁI TỔ HỢP ĐỂ CẢI THIẾN KHẢ NĂNG KHÁNG THUỐC DIỆT CỎ, VI KHUẨN VÀ NẤM VÀ TẠO RA CÁC TÍNH TRẠNG NÔNG HỌC NĂNG CAO, VECTO CHỨA GEN TÁI TỔ HỢP VÀ CÂY CHUYỂN GEN

<140> PCT/MY2019/000010

<210> SEQ ID NO. 1

<213> Gen EPSPS của chủng *Agrobacterium tumefaciens* strain CP4

<400> 1

```

atggagcttc atctaggcca gctactgcc a ggaagtctag cgggctcagt ggcaccgtgc 60
gcatccctgg cgataaaagt atttcacaca ggagcttcat gttcggagga cttgctagtg 120
gagagacgag aatcactggg ttgcttgagg gcgaagatgt tatcaacacc ggtaaggcga 180
tgcaagcaat ggggtgccaga atccgaaaag agggcgatac gtggatcatc gacgggtgtg 240
gtaacggagg attgctcgct cccgaagcgc cacttgactt tgggaacgca gctacggggg 300
gccgtcttac tatgggactg gtaggcgtgt atgactttga ctctaccttc atcgggtgacg 360
cgagcctcac taagagacca atgggacgag tgctgaatcc cctgaggagg atgggtgtcc 420
aggtgaaatc tgaggatggg gatcgtcttc cggttactct gcgaggcccc aagaccccca 480
cgccaatcac gtacaggggt ccgatggcgt cagcacagggt caagtcagcg gtactcctgg 540
cgggcctcaa cacacctgga atcacaaccg tgattgaacc catcatgact agagaccaca 600
cggagaagat gttgcagggt ttccggcgta atctaaccgt cgaaaccgac gccgacggcg 660
tgaggacaat ccgcttgagg ggcagaggta aactgactgg ccaagtcacg gatgtgcctg 720
gagatccctc gtccacagcg tttcccctcg tagctgcgtt gctcgtccct ggatctgatg 780
tgacgatcct gaatgtctc atgaatccaa ctagaaccgg cctcatcctc acattgcagg 840
agatgggtgc tgacatcgag gttatcaatc ctagggtggc aggtggagag gatgtggccc 900
atctgcgcgt gcgttctagt acactcaaag gcgtgaccgt cctgaggat cgcgctccat 960
ccatgatcga cgagtacccc attctcgccg ttgctgctgc gtttgccgag ggcgcaactg 1020
taatgaacgg ccttgaggag ttgaggggta aggagagtga caggctgtcc gcgggtggcg 1080

```

atggcctgaa gctaaacggc gtggactgcg acgaaggtga aacgtccctt gtagtccgtg 1140
 gtcgcccaga cggaagggg ttggggaatg ctccgggagc tgctgtggcg acgcaccttg 1200
 atcatagaat cgccatgtca tttctggtga tgggacttgt ctccgagaat ccggtgaccg 1260
 ttgacgatgc taccatgata gccacctcct ttctgagtt catggacctc atggcaggct 1320
 tgggggcca gatcgagctg tctgatacta aggccgcttg a 1361

<210> SEQ ID NO. 2

<213> Gen EPSPS của *Oryza sativa*

<400> 2

atggcgtcca acgccgcggc tgcggcggcg gtgtccctgg accaggccgt ggccggcgtcg 60
 gcggcggttct cgtcgcggaa gcagctgcgg ctgcccgccg cggcgcgcgg ggggatgcgg 120
 gtgcgggtgc gggcgcggg gcggcgggag gcggtggtgg tggcgtccgc gtcgtcgtcg 180
 tcggtggcag cgccggcggc gaaggcggag gagatcgtgc tccagcccat caggagatc 240
 tccggggcgg ttcagctgcc aggtccaag tcgtctcca acaggatcct cctcctctcc 300
 gccctctccg agggcacaac agtggcggac aacttgctga acagtgagga tgttcactac 360
 atgcttc 367

<210> SEQ ID NO. 3

<213> Gen WRKY45 của *Oryza sativa*

<400> 3

atgacgtcat cgatgtcgcc ggccgcggcg ccggcgtaac cgcaggtgat ggaggacatg 60
 gagaagggga aggagctggc ggccgagctg caggggctcc tccgcgactc gccggaggcc 120
 ggccgcttcg tcgaccagat tctccacacc ttctcccggg cgatgcgggc gctcgacaag 180
 gcggcggtct ccgccgccg aggagaagg tcggaggtgc agagcgaggt cacctgcggg 240
 ggccggggcca gcgccggcg gaagaggaaa gccccgccg ccaaccggaa ggccaactgc 300

cgcaggagga cgcagcaatc gtccgggaat acggtggtcg tcaagaacct cgacgacggc 360
 caggcatggc gcaagtacgg gcagaaggag atccaaaact ccaagcacc ccaaggcctac 420
 ttccggtgca cgcacaagta cgaccagatg tgcacggcgc agcggcaggt gcagcgctgc 480
 gacgacgacc cggcgagcta cagggtcacc tacatcggcg agcacacctg cggggaccgc 540
 gccaccgccc ccatcatcgc ggcgacgctc atccaccagg tcgccgccgg cgacgacgac 600
 gacggctgcg gcggcctcca cgcgggggtcc cgcctcatca gcttcgtcgc cgcgccggcg 660
 gcgccagtag acgtcgccgc ggcgccgacg accagcacga tcaccacggt caccgcgccg 720
 ggcccgtgcg tgcagccgct caaggtggag ggcggcacgc gctcgtccga ccaggaggag 780
 gtgctgagca gcctcacgcc cggcagctcc gcggcgcgcg gcggcgaggt cgcgggtccc 840
 ttcgggccgg accagggcga tgtcacgtcc tcctgcact ggagctacga cgcgctcgcc 900
 ggcattggagt tcttcaagaa cgacgaggtt gtcttcgatc tggacgacat tatgggtttg 960
 agctttttga 969

<210> SEQ ID NO. 4

<213> Tín hiệu CaMv poly A

<400> 4

taattcgggg gatctggatt ttagtactgg attttggttt taggaattag aaattttatt 60
 gatagaagta ttttaciaat acaaatacat actaagggtt tcttatatgc tcaacacatg 120
 agcgaaaccc tataggaacc ctaattccct tatctgggaa ctactcacac attattatgg 180
 agaaactcga gcttgctgat cgacagatc 209

<210> SEQ ID NO. 5

<213> Hygromycin

<400> 5

ctattttttt gccctcggac gaggctggg gcgtcgggtt ccactatcgg cgagtacttc 60

tacacagcca tcggtccaga cggccgcgct tctgcgggcg atttgtgtac gcccgacagt 120
 cccgggtccg gatcggaaga ttgcgtcgca tcgacctgc gcccaagctg catcatcgaa 180
 attgccgtca accaagctct gatagagttg gtcaagacca atgcggagca tatacgcccg 240
 gagtcgtggc gatcctgcaa gctccggatg cctccgctcg aagtagcgcg tctgctgctc 300
 catacaagcc aaccacggcc tccagaagaa gatgttggcg acctcgtatt ggggaatcccc 360
 gaacatcgcc tcgctccagt caatgaccgc tggtatgcgg ccattgtccg tcaggacatt 420
 gttggagccg aaatccgcgt gcacgaggtg cgggacttcg gggcagtcct cggcccaaag 480
 catcagctca tcgagagcct gcgcgacgga cgcactgacg gtgtcgtcca tcacagtttg 540
 ccagtgatac acatggggat cagcaatcgc gcatatgaaa tcacgccatg tagtgtattg 600
 accgattcct tgcggtccga atgggcccga cccgctcgtc tggctaagat cggccgcagc 660
 gatcgcatcc atagcctccg cgaccgggtg tagaacagcg ggcagttcgg tttcaggcag 720
 gtcttgcaac gtgacaccct gtgcacggcg ggagatgcaa taggtcaggc tctcgctaaa 780
 ctccccaatg tcaagcactt ccggaatcgg gagcgcggcc gatgcaaagt gccgataaac 840
 ataacgatct ttgtagaaac catcggcgca gctatttacc cgcaggacat atccacgccc 900
 tcctacatcg aagctgaaag cacgagattc ttcgccctcc gagagctgca tcaggtcgga 960
 gacgctgtcg aacttttcga tcagaaactt ctgcacagac gtcgcggtga gttcaggcctt 1020
 tttcat 1026

<210> SEQ ID NO. 6

<213> Promoto CaMV35S(lăp)

<400> 6

agagatagat ttgtagagag agactggtga tttcagcgtg tcctctccaa atgaaatgaa 60
 cttccttata tagaggaagg tcttgcaag gatagtggga ttgtgcgtca tcccttacgt 120
 cagtggagat atcacatcaa tccacttgct ttgaagacgt ggttggaacg tcttcttttt 180
 ccacgatgct cctcgtgggt gggggtccat ctttgggacc actgtcggca gaggcattctt 240
 gaacgatagc ctttccttta tcgcaatgat ggcatttgta ggtgccacct tccttttcta 300
 ctgtcctttt gatgaagtga cagatagctg ggcaatggaa tccgaggagg tttcccgata 360
 ttaccctttg ttgaaaagtc tcaatagccc tttggtcttc tgagactgta tctttgatat 420
 tcttgagata gacgagagtg tcgtgctcca ccatgttata acatcaatcc acttgctttg 480

aagacgtggt tggaacgtct tctttttcca cgatgctcct cgtgggtggg ggtccatctt 540
tgggaccact gtgcgcagag gcatcttgaa cgatagcctt tcctttatcg caatgatggc 600
atgttaggt gccaccttc ttttctactg tcctttgat gaagtgcag atagctgggc 660
aatggaatcc gaggaggttt cccgatatta ccctttgttg aaaagtctca atagcccttt 720
ggtcttctga gactgtatct ttgatattct tggagtagac gagagtgtcg tgctccacca 780
t 781

<210> SEQ ID NO. 7

<213> Promotor ubiquitin của Zea mays

<400> 7

ctgcagtgca gcgtgacccg gtgcgtgcccc tctctagaga taatgagcat tgcattgtcta 60
agttataaaa aattaccaca tttttttttt gtcacacttg tttgaagtgc agtttatcta 120
tctttataca tatatttaaa ctttactcta cgaataatat aatctatagt actacaataa 180
tatcagtgtt ttagagaatc atataaatga acagtttagac atgggtctaaa ggacaattga 240
gtattttgac aacaggactc tacagtttta tcttttttagt gtgcattgtt tctccttttt 300
ttttgcaaat agcttcacct atataatact tcatccattt tattagtaca tccatttagg 360
gttttagggtt aatggttttt atagactaat ttttttagta catctatttt attctatttt 420
agcctctaaa ttaagaaaac taaaactcta ttttagtttt tttatttaat aatttagata 480
taaaatagaa taaaataaag tgactaaaaa ttaaacaaat accctttaag aaattaaaaa 540
aactaaggaa acatttttct tgtttcgagt agataatgcc agcctgttaa acgcccgtcg 600
cgagtctaac ggacaccaac cagcgaacca gcagcgtcgc gtcgggcca gcaagcaga 660
cggcacggca tctctgtcgc tgcctctgga cccctctcga gagttccgct ccaccgttgg 720
acttgctccg ctgtcggcat ccagaaattg cgtggcgagg cggcagacgt gagccggcac 780
ggcaggcggc ctctctctcc tctcacggca cggcagctac gggggattcc tttcccaccg 840
ctccttctgt ttccttctct cgcgcgcgt aataaataga cccccctcc acacctctt 900
tcccaacct cgtgttggtc ggagcgcaca cacacacaac cagatctccc ccaatccac 960
ccgtcggcac ctccgttca aggtacgccg ctgcctctcc ccccccccc ctctctacct 1020
tctctagatc ggcgttccgg tccatggtta gggcccggt gttctacttc tgttcattgt 1080
tgtgttagat ccgtgtttgt gttagatccg tgcgtctagc gttcgtacac ggatgcgacc 1140

tgtacgtcag acacgttctg attgctaact tgccagtgtt tctctttggg gaatcctggg 1200
 atggctctag ccgttccgca gacgggatcg atttcatgat tttttttgtt tcgttgcata 1260
 gggtttggtt tgcccttttc ctttatttca atatatgccg tgcacttggt tgtcgggtca 1320
 tcttttcatg cttttttttg tcttggttgt gatgatgtgg tctggttggg cggtcgttct 1380
 agatcggagt agaattctgt ttcaaactac ctgggtggatt tattaatttt ggatctgtat 1440
 gtgtgtgcca tacatattca tagttacgaa ttgaagatga tggatggaaa tatcgatcta 1500
 ggataggtat acatgttgat gcgggtttta ctgatgcata tacagagatg ctttttgttc 1560
 gcttggttgt gatgatgtgg tgtggttggg cggtcgttca ttcgttctag atcggagtag 1620
 aatactgttt caaactacct ggtgtattta ttaatttttg aactgtatgt gtgtgtcata 1680
 catcttcata gttacgagtt taagatggat ggaaatatcg atctaggata ggtatacatg 1740
 ttgatgtggg ttttactgat gcatatacat gatggcatat gcagcatcta ttcatatgct 1800
 ctaaccttga gtacctatct attataataa acaagtatgt tttataatta ttttgatctt 1860
 gatatacttg gatgatggca tatgcagcag ctatatgtgg attttttttag cctgccttc 1920
 atacgctatt tatttgcttg gtactgtttc ttttgtcgat gctcaccctg ttgtttggtg 1980
 ttacttctgc ag 1992

<210> SEQ ID NO. 8

<213> NOS (nopalín syntaza) 3'UTR (tín hiệu polyA)

<400> 8

gatcgttcaa acatttggca ataaagtttc ttaagattga atcctgttgc cggctcttgcg 60
 atgattatca tataatttct gttgaattac gtttaagcatg taataattaa catgtaatgc 120
 atgacgttat ttatgagatg ggtttttatg attagagtcc cgcaattata catttaatac 180
 gcgatagaaa acaaaatata gcgcgcaaac taggataaat tatcgcgcgc ggtgtcatct 240
 atgttactag atc 253

<210> SEQ ID NO. 9

<213> Promotor CaMV 35S

<400> 9

```

tgagactttt caacaaaggg taatatccgg aaacctctc ggattccatt gcccagctat 60
ctgtcacttt attgtgaaga tagtggaataa ggaaggtggc tcctacaaat gccatcattg 120
cgataaagga aaggccatcg ttgaagatgc ctctgccgac agtgggtcca aagatggacc 180
cccacccacg aggagcatcg tggaaaaaga agacgttcca accacgtctt caaagcaagt 240
ggattgatgt gatattctcca ctgacgtaag ggatgacgca caatcccact atccttcgca 300
agacccttcc tctatataag gaagttcatt tcatttggag agaaca 346

```

<210> SEQ ID NO. 10

<213> NOS (nopalín syntaza) 3'UTR (tín hiệu polyA)

<400> 10

```

cgttcaaaca tttggcaata aagtttctta agattgaatc ctggtgccgg tcttgcgatg 60
attatcatat aatttctggt gaattacggt aagcatgtaa taattaacat gtaatgcatg 120
acgttattta tgagatgggt ttttatgatt agagtccgcg aattatacat ttaatacgcg 180
atagaaaaca aaatatagcg cgcaaactag gataaattat cgcgcgcggt gtcattctatg 240
ttactagatc ggg 253

```