



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0023619

(51)⁷ C12N 1/20; A01N 63/00

(13) B

(21) 1-2014-03464

(22) 20/03/2013

(86) PCT/SG2013/000112 20/03/2013

(87) WO2013/141815 26/09/2013

(30) 61/613,579 21/03/2012 US

(45) 25/05/2020 386

(43) 26/01/2015 322A

(73) TEMASEK LIFE SCIENCES LABORATORY LIMITED (SG)

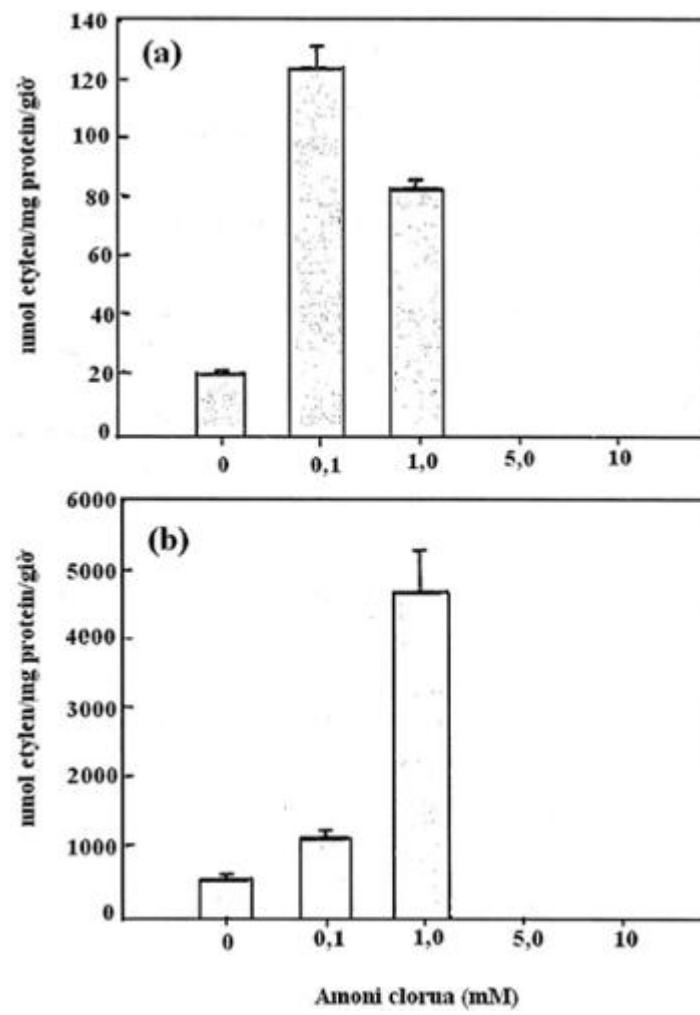
National University of Singapore, 1 Research Link, Singapore 117604, Singapore

(72) MUNUSAMY, Madhaiyan (IN); JI, Lianghui (AU)

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

(54) CHẾ PHẨM VI SINH VÀ PHƯƠNG PHÁP CẢI THIỆN NĂNG SUẤT THỰC VẬT

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm vi sinh để bón cho thực vật, chứa lượng hữu hiệu dịch cấy vi khuẩn thuần khiết sinh học chứa ít nhất một loài vi khuẩn, các ion kim loại vi lượng và chất mang, trong đó các ion kim loại vi lượng được chọn từ nhóm bao gồm ion molypden (Mo^{2+}), ion sắt (Fe^{2+}), ion mangan (Mn^{2+}) hoặc hỗn hợp bất kỳ của chúng; chất mang được chọn từ nhóm bao gồm polyme sinh học, đường, sữa động vật, vật liệu thực vật và chất mang hóa học trơ xốp; ít nhất một loài vi khuẩn là loài *Enterobacter* R4-368 (NRRL B-50631); và các loài vi khuẩn này có tác dụng khử axetylen thành etylen hoặc nitơ trong không khí (N_2) thành amoniac (NH_3) và cải thiện năng suất thực vật khi chế phẩm vi sinh này được bón cho thực vật; và phương pháp cải thiện năng suất thực vật.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp giảm mức sử dụng phân bón hóa học và phát thải khí nitơ oxit (N_2O) gây hiệu ứng nhà kính và phương pháp cải thiện tốc độ sinh trưởng của thực vật và năng suất thu hoạch hạt trong lĩnh vực nông nghiệp bằng cách sử dụng chế phẩm vi sinh chứa vi khuẩn cố định đạm có khả năng tạo nốt sần hiệu quả ở phần trên mặt đất và hệ rễ của thực vật không thuộc họ đậu. Chế phẩm vi sinh và phương pháp theo sáng chế đặc biệt thích hợp cho các thực vật thuộc chi dầu mè (*Jatropha*), lúa miến (*Sorghum*), bông (*Gossypium*), cọ dầu (*Elaeis*), lúa (*Oryza*), thầu dầu (*Ricinus*) và sắn (*Manihot*).

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Gần đây, sự tăng nhanh giá nhiên liệu hóa thạch, sự suy giảm nhanh các nguồn nhiên liệu trên trái đất và mối lo ngại về sự nóng lên của trái đất do tích tụ các khí gây hiệu ứng nhà kính trong bầu khí quyển được xem là ba yếu tố thúc đẩy việc nghiên cứu nhiên liệu sinh học (Chang, 2007). Do làm giảm phát thải khí cacbonic gây hiệu ứng nhà kính, nên việc tiêu thụ nhiên liệu sinh học được tin là sẽ làm lợi cho môi trường.

Gần đây, lợi ích của nhiên liệu sinh học là vấn đề mới đang được thảo luận. Nitơ oxit được tạo ra một cách tự nhiên trong đất trong các quá trình nitrat hóa và khử nitrat hóa. Một phần lớn phân đạm sử dụng trong sản xuất nhiên liệu sinh học bị biến đổi thành nitơ oxit là khí gây hiệu ứng nhà kính có khả năng giữ nhiệt cao gấp 310 lần khả năng của bầu khí quyển (Barton and Atwater, 2002). Lợi ích của việc giảm phát thải khí cacbonic nhờ sử dụng nhiên liệu sinh học sẽ không đạt được nếu không kiểm soát được việc sử dụng phân đạm (Galloway et al., 2008; Melillo et al., 2009; Crutzen et al., 2008).

Việc sử dụng phân đạm đã trở nên phổ biến trong ngành nông nghiệp hiện đại do cần duy trì năng suất cây trồng cao. Đã biết rằng các cây họ đậu không cần bón nhiều phân đạm do nó có các tổ chức cố định đạm được gọi là nốt sần chứa các vi sinh vật cố định đạm (vi khuẩn cố định đạm), hầu hết là các loài thuộc chi *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* và *Bradyrhizobium* (Jourand et al., 2004; Kaneko et al., 2000; Stacey et al., 1991; Gottfert et al., 2001) tạo ra mối quan hệ cộng sinh cùng có lợi

trong đó các vi khuẩn này cung cấp nguồn nitơ cho thực vật và sử dụng nguồn cacbon từ tế bào thực vật (Long, 1996; Young and Johnston, 1989). Gần đây, một số vi sinh vật ngoại lệ đã được phát hiện. Ví dụ, *Methylobacterium nodulans* là tác nhân gây nốt sần ở rễ cho một số loài họ đậu thuộc chi *Crotalaria* (Renier et al., 2011; Jourand et al., 2005) và các nốt sần cố định đạm này có thể phát triển ở mô thân của một số cây họ đậu (Eaglesham and Szalay, 1983; Dreyfus and Dommergues, 1981). Vi khuẩn Gram dương *Frankia* sống trong đất cũng tạo ra các nốt sần cố định đạm ở rễ của một số loài thuộc họ Hoa hồng- *Rosaceae* (Moir et al., 2011).

Sự hình thành nốt sần cộng sinh tạo ra các mối liên hệ di truyền và hóa học phức tạp giữa vi khuẩn cố định đạm và thực vật chủ. Ví dụ, sự cộng sinh giữa *Sinorhizobium meliloti* và thực vật chủ của nó bắt đầu khi thực vật này tiết vào vùng rễ các betain và flavonoid: 4,4'-đihydroxy-2'-metoxychalcon, chrysoeriol, xynarosit, 4',7'-đihydroxyflavon, 6''-O-malonylononin, liquiritigenin, luteolin, 3',5'-dimetoxyluteolin, 5-metoxyluteolin, medicarpin, stachydrin, trigonelin. Các hợp chất này thu hút *S. meliloti* lên bề mặt rễ tơ của thực vật là nơi vi khuẩn này bắt đầu tiết ra các yếu tố tạo nốt sần (Peters et al., 1986; Maxwell et al., 1989). Kết quả là các nốt sần cộng sinh cố định đạm hầu như chỉ được thấy ở các cây họ đậu. Các vi khuẩn *Bradyrhizobium* và *rhizobium* có cùng đặc tính của vi khuẩn vùng rễ kích thích tăng trưởng thực vật (plant growth promoting rhizobacteria - PGPR). Các vi khuẩn tạo nốt sần, như các PGPR khác, có khả năng tạo nốt sần ở rễ của các cây không thuộc họ đậu (Antoun et al., 1998).

Các vi khuẩn cố định đạm đã được phát hiện ở dạng sống tự do, trong đó *Azotobacter vinelandii* được nghiên cứu kỹ nhất. Ngày càng có nhiều loài vi khuẩn cố định đạm, ví dụ *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Burkholderia*, *Gluconacetobacter* được thấy là có mối quan hệ cộng sinh không điển hình với các thực vật (Zehr, 2011; Radiers et al., 2004; Pedraza, 2008). Các vi khuẩn này thường sinh trưởng trên bề mặt hệ rễ (vi khuẩn vùng rễ) mặc dù một số có thể xâm nhiễm vào mô thực vật (vi khuẩn nội ký sinh) để thực hiện quá trình cố định đạm và có thể kích thích tăng trưởng thực vật. Ví dụ, Patent Mỹ số 7,393,678 B2 đề cập đến chủng *Klebsiella pneumonia* có khả năng tạo nốt sần ở bề mặt rễ (Liu et al., 2011) và kích thích tăng trưởng các cây ngũ cốc (cây lúa mì và cây ngô) khi có bón phân đạm hoặc không. Tuy nhiên, do hoạt tính cố định đạm ở phần lớn các chủng này đều thấp, nên chỉ các chủng *Klebsiella pneumonia* đột biến đặc hiệu được phân lập mới có khả năng kích thích tăng trưởng thực vật mạnh nhất. Ví dụ về

các loài vi khuẩn nội ký sinh thực vật hữu hiệu nhất có thể được tìm thấy ở cây mía đường và cây lúa đại, bao gồm *Herbaspirillum*, *Gluconacetobacter*, *Enterobacter*, *Azospirillum*, *Swaminathania* và *Acetobacter* là các loài vi khuẩn cố định đạm bổ sung (Pedraza, 2008; Boddey et al., 1995; Baldani et al., 2002; Elbeltagy et al., 2001; Saravanan et al., 2008). Vi khuẩn *Bradyrhizobium* có khả năng quang hợp là loài nội ký sinh tự nhiên của cây lúa đại Châu Phi *Oryza breviligulata* trong khi đó *Methylobacterium* sp. có tác dụng kích thích tăng trưởng và tạo nốt sần nội bào ở cây lúa *Oryza sativa* L. Cv CO-43 mặc dù các tác dụng này được cho là do quá trình bài tiết hormon kích thích tăng trưởng của vi khuẩn *Methylobacterium* sp. (Senthilkumar et al., 2009; Chaintreuil et al., 2000).

Nghiên cứu của Azospirilla cho thấy rằng giống như quá trình tạo nốt sần và cố định đạm ở các cây họ đậu, quá trình tạo nốt sần của các loài nội ký sinh được điều khiển qua đường di truyền và sự sản sinh polysaccharit ngoại bào (exopolysaccharide - EPS) ức chế cả quá trình tạo nốt sần nội ký sinh lẫn cố định đạm ở cây lúa mì thông thường (Kennedy et al., 1997). Ngoài ra, quá trình đột biến ức chế tổng hợp polysaccharit ngoại bào có thể ngăn ngừa quá trình tạo nốt sần ở cây Đậu bởi *Rhizobium leguminosarum* nhưng không ngăn ngừa quá trình tạo nốt sần ở cây Đậu bởi *R. phaseoli* (Borthakur et al., 1986). Do đó, khả năng kích thích tăng trưởng thực vật của vi khuẩn cố định đạm không thể dự đoán được từ đặc tính của nó ở các loài thực vật khác.

Cây dầu mè (*Jatropha curcas*) là loài cây gỗ nhỏ thuộc họ Thầu dầu (*Euphorbiaceae*). Nhờ có một số đặc tính độc đáo, loài cây này đã trở thành nguyên liệu lý tưởng để sản xuất nhiên liệu sinh học (Fairless, 2007; Gaydou et al., 1982; Openshaw, 2000). Các đặc tính này bao gồm khả năng phát triển trên đất hoang hóa; cần ít nước; không phải cây lương thực và có khả năng sản xuất dầu trong vòng từ 0,5 đến 2 năm sau khi trồng, nhanh hơn so với cây cọ dầu (hơn 3 năm). Một số quốc gia Châu Á, đặc biệt là Indonesia và Ấn Độ đã có kế hoạch phát triển trồng cây dầu mè. Một số thực vật khác cũng được quan tâm nhiều để phát triển thành nguyên liệu sản xuất nhiên liệu sinh học thay thế, bao gồm cây thầu dầu, cây lúa miến, và cây lúa miến ngọt.

Do cây dầu mè chủ yếu được trồng ở các vùng đất hoang hóa có ít chất dinh dưỡng, nên cần bón nhiều phân đạm hơn các thực vật khác. Do đó, có nhu cầu cấp thiết về công nghệ giảm mức sử dụng phân đạm. Hiện nay, có rất ít nghiên cứu về các vi

khuẩn cố định đạm tự nhiên ở cây dầu mè cũng như ứng dụng các vi khuẩn này để cải thiện năng suất thực vật. Tình trạng này cũng gặp ở các thực vật khác, như cây lúa miến, cây thầu dầu và cây sắn.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề cập đến phương pháp giảm mức sử dụng phân bón hóa học và phát thải khí nitơ oxit (N_2O) gây hiệu ứng nhà kính và phương pháp cải thiện tốc độ sinh trưởng của thực vật và năng suất thu hoạch hạt trong lĩnh vực nông nghiệp bằng cách sử dụng chế phẩm vi sinh chứa vi khuẩn cố định đạm có khả năng tạo nốt sần hiệu quả ở phần trên mặt đất và hệ rễ của thực vật không thuộc họ đậu. Chế phẩm vi sinh và phương pháp theo sáng chế đặc biệt thích hợp cho các thực vật thuộc chi dầu mè (*Jatropha*), lúa miến (*Sorghum*), bông (*Gossypium*), cọ dầu (*Elaeis*), lúa (*Oryza*), thầu dầu (*Ricinus*) và sắn (*Manihot*).

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất dịch cấy vi khuẩn thuần khiết sinh học, chứa loài vi khuẩn được chọn từ nhóm bao gồm vi khuẩn thuộc chi *Enterobacter*, *Methylobacterium*, *Sphingomonas*, và *Pleomorphomonas*. Theo một số phương án, các loài vi khuẩn theo sáng chế có khả năng khử hiệu quả nitơ trong không khí thành amoniac ở thực vật như được kiểm chứng bằng thử nghiệm khử axetylen (acetylene reduction assay - AR assay). Theo một số phương án, quá trình khử khí N_2 diễn ra ở bề mặt lá. Theo các phương án khác, quá trình khử khí N_2 diễn ra ở bên trong bề mặt lá. Theo các phương án bổ sung, quá trình khử khí N_2 diễn ra ở bề mặt rễ hoặc hệ rễ. Theo các phương án khác, quá trình khử khí N_2 diễn ra ở bên trong mô rễ. Theo một số phương án, các loài vi khuẩn này có thể tự sinh sôi hữu hiệu trên bề mặt lá, bề mặt rễ hoặc bên trong mô thực vật mà không gây ra phản ứng bảo vệ đáng kể ở thực vật, như gây chết tế bào. Theo các phương án khác, các loài vi khuẩn theo sáng chế có thể được phân lập bằng cách nuôi cấy dịch chiết mô thực vật hoặc dịch rửa bề mặt lá trong môi trường không chứa nitơ.

Theo một phương án, ADN bộ gen của các loài vi khuẩn này có độ tương đồng ít nhất bằng 97%, và tốt hơn nếu ít nhất bằng 98% so với trình tự SEQ ID NO.10. Theo một số phương án, các loài vi khuẩn này là vi khuẩn thuộc chi *Enterobacter* có bộ gen cần thiết để cố định đạm. Theo một số phương án, các loài vi khuẩn *Enterobacter* này chủ yếu sản sinh polysacarit ngoại bào, hoặc endoglucanaza. Theo một phương án khác,

ADN bộ gen của các loài vi khuẩn này có độ tương đồng ít nhất bằng 97%, và tốt hơn nếu ít nhất bằng 98% so với trình tự SEQ ID NO.11. Theo một số phương án, các loài vi khuẩn này là vi khuẩn thuộc chi *Pleomorphomonas* có khả năng cố định đạm được kích thích bởi ion NH_4^+ ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,1mM đến 0,5mM. Theo phương án khác, ADN bộ gen của các loài vi khuẩn này có độ tương đồng ít nhất bằng 97%, và tốt hơn nếu ít nhất bằng 98% so với trình tự SEQ ID NO.12. Theo một số phương án, các loài vi khuẩn này là vi khuẩn thuộc chi *Sphingomonas* có khả năng sinh trưởng trong môi trường không chứa nitơ. Theo phương án khác, ADN bộ gen của các loài vi khuẩn này có độ tương đồng ít nhất bằng 97%, và tốt hơn nếu ít nhất bằng 98% so với trình tự SEQ ID NO.13 hoặc SEQ ID NO.14. Theo một số phương án, các loài vi khuẩn này là vi khuẩn thuộc chi *Methylobacterium*.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề xuất chế phẩm vi sinh chứa ít nhất một dịch cấy vi khuẩn thuần khiết sinh học chứa các loài vi khuẩn được chọn từ nhóm bao gồm vi khuẩn thuộc chi *Enterobacter*, *Methylobacterium*, *Sphingomonas*, và *Pleomorphomonas*. Theo một phương án, chế phẩm vi sinh này chứa hỗn hợp của ít nhất hai dịch cấy vi khuẩn thuần khiết sinh học chứa các loài vi khuẩn này. Theo một số phương án, quy trình sản xuất chế phẩm vi sinh này bao gồm bước sản xuất các loài vi khuẩn theo sáng chế ở quy mô lớn trong môi trường tùy ý được khử nước theo phương pháp thích hợp để duy trì khả năng sống sót của tế bào và khả năng tự sinh sôi và tạo nốt sần ở thực vật chủ. Theo một số phương án, chế phẩm vi sinh này có thể chứa các ion kim loại vi lượng. Theo một phương án, các ion kim loại vi lượng này được chọn từ nhóm bao gồm ion molybden (Mo^{2+}), ion sắt (Fe^{2+}), ion mangan (Mn^{2+}) hoặc hỗn hợp bất kỳ của chúng. Theo một phương án khác, chế phẩm vi sinh này chứa các ion kim loại vi lượng với hàm lượng nằm trong khoảng từ 0,1mM đến 50mM. Theo một số phương án, chế phẩm vi sinh này có thể chứa chất mang. Chất mang bất kỳ có thể được sử dụng và ví dụ về các chất mang thích hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, beta-glucan, carboxymetyl xenluloza (CMC), polysacarit ngoại bào của vi khuẩn, đường và sữa động vật. Theo một số phương án, các loài vi khuẩn có thể được sử dụng để bào chế chế phẩm vi sinh này là các loài vi khuẩn nêu trên. Theo các phương án khác, các loài vi khuẩn có thể được sử dụng để bào chế chế phẩm vi sinh này được phân lập bằng cách nuôi cấy dịch chiết mô thực vật hoặc dịch rửa bề mặt lá trong môi trường không chứa nitơ hoặc được lấy từ các ngân hàng giống vi sinh vật dựa theo chỉ số phân loại và đặc tính của các loài vi khuẩn theo sáng chế. Theo một

số phương án, chế phẩm vi sinh này có tác dụng kích thích tăng trưởng thực vật, duy trì hàm lượng chất diệp lục cao trong lá, tăng sản lượng quả hoặc hạt, tăng trọng lượng quả hoặc hạt và giảm phát thải khí NO_2 do giảm sử dụng phân đạm. Theo các phương án khác, các đặc tính này được kiểm chứng ở các loài thực vật thuộc chi dầu mè (*Jatropha*), lúa miến (*Sorghum*), bông (*Gossypium*), cọ dầu (*Elaeis*), lúa (*Oryza*), thầu dầu (*Ricinus*) và sắn (*Manihot*).

Theo khía cạnh thứ ba, sáng chế đề xuất phương pháp cải thiện năng suất thực vật không thuộc họ đậu. Theo một số phương án, năng suất thực vật bao gồm sự tăng trưởng thực vật, duy trì hàm lượng chất diệp lục cao trong lá, tăng sản lượng quả hoặc hạt, tăng trọng lượng quả hoặc hạt hoặc tổ hợp bất kỳ của các đặc tính này. Theo các phương án khác, năng suất thực vật cũng bao gồm giảm phát thải khí NO_2 dẫn đến giảm sử dụng phân đạm. Theo một số phương án, các loài thực vật không thuộc họ đậu được chọn từ các loài thuộc chi dầu mè (*Jatropha*), lúa miến (*Sorghum*), bông (*Gossypium*), cọ dầu (*Elaeis*), thầu dầu (*Ricinus*), lúa (*Oryza*) và sắn (*Manihot*). Theo sáng chế, phương pháp này bao gồm bước bón chế phẩm theo sáng chế cho thực vật. Theo một phương án, chế phẩm theo sáng chế được phun lên phần trên mặt đất của thực vật. Theo một phương án khác, chế phẩm vi sinh này có thể được bón vào rễ bằng cách bón lót vào các luống gieo hạt, tưới vào đất hoặc nhúng rễ vào hỗn dịch chứa chế phẩm vi sinh này. Theo phương án khác, chế phẩm vi sinh này có thể được ủ với hạt giống. Theo một số phương án, chế phẩm theo sáng chế chứa các ion kim loại vi lượng. Theo các phương án khác, thực vật được phun với dung dịch chứa các ion kim loại vi lượng ngoài chế phẩm theo sáng chế có thể không chứa các ion kim loại vi lượng.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1a và Fig.1b thể hiện tác dụng của amoni clorua đến hoạt tính nitrogenaza của chủng *Methylobacterium* sp. L2-4 (Fig.1a) và chủng *Enterobacter* sp. R4-368 (Fig.1b). Hoạt tính nitrogenaza được xác định trên các chủng vi khuẩn sinh trưởng trong các chai huyết thanh dung tích 125mL chứa môi trường không có nitơ được bổ sung amoni clorua với nồng độ khác nhau ở nhiệt độ 30°C trong 48 giờ. Ký hiệu sai số thể hiện độ lệch chuẩn $\pm$ SD.

Fig.2 thể hiện tác dụng của đồng nhân tố nitrogenaza (Mo/Fe/Mn) đến hoạt tính nitrogenaza của chủng *Enterobacter* sp. R4-368 (biểu đồ bên trên) và chủng

Methylobacterium sp. L2-4 (biểu đồ bên dưới). Hoạt tính nitrogenaza được xác định trên các chủng vi khuẩn sinh trưởng trong các chai huyết thanh dung tích 125mL chứa môi trường không có nitơ được bổ sung Mo/Fe/Mn với nồng độ khác nhau ở nhiệt độ 30°C trong 48 giờ.

Fig.3 thể hiện hoạt tính cố định đạm của các chủng vi khuẩn được chọn khi có mặt các ion kim loại vi lượng (Mo/Fe/Mn) ở cây dầu mè (*Jatropha*). Sự phát thải khí etylen từ các cây dầu mè được bổ sung 15% axetylen (thể tích/thể tích) vào khoảng không bên trên được xác định khi bón hoặc không bón các chủng vi khuẩn cố định đạm phân lập từ rễ. Hoạt tính khử axetylen được tính từ độ chênh lệch giữa các cây được bón các chủng vi khuẩn cố định đạm phân lập từ rễ và các cây không được bón các chủng này. Các trị số thu được được tính bằng trị số trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn cho ba lần lặp lại.

Fig.4a và Fig.4b thể hiện cụm gen cố định đạm của *Klebsiella pneumonia* (Mã truy cập Genbank X13303) (Fig.4a) và các protein tương đồng được xác định bằng phần mềm BLASTP ở chủng *Enterobacter* R4-368 (SEQ ID NO.3; Fig.4b).

Fig.5 thể hiện các protein dự kiến mã hóa bởi trình tự SEQ ID NO.4 được xác định bằng phần mềm BLASTP.

Fig.6a và Fig.6b thể hiện hoạt tính nitrogenaza của chủng *Pleomorphomonas jatrophae* R5-392. Fig.6a thể hiện hoạt tính nitrogenaza của chủng *Pleomorphomonas jatrophae* R5-392^T sinh trưởng trong môi trường không chứa nitơ và mức sinh trưởng được đo theo mật độ quang OD_{600nm} ở các khoảng thời gian khác nhau. Hoạt tính nitrogenaza của các chủng vi khuẩn sinh trưởng trong môi trường lỏng không chứa nitơ này được đo bằng cách bơm 15% axetylen tinh khiết (thể tích/thể tích) vào và ủ ở nhiệt độ 30°C, sau đó định lượng etylen tạo ra bằng phương pháp sắc ký khí GC. Fig.6b thể hiện kết quả bất hoạt nitrogenaza bằng ion amoni (biểu đồ bên trên) và tác dụng của các đồng nhân tố Fe và Mo đến hoạt tính nitrogenaza (biểu đồ bên dưới) ở chủng *Pleomorphomonas jatrophae* R5-392.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến các công nghệ sạch mới để dùng trong nông nghiệp và môi trường. Cụ thể, sáng chế đề cập đến phương pháp giảm mức sử dụng phân đạm; kích thích tăng trưởng thực vật; cải thiện năng suất thực vật và giảm phát thải khí NO₂ gây hiệu ứng nhà kính trong lĩnh vực nông nghiệp. Theo một số phương án, sáng chế đề cập

đến phương pháp giảm mức sử dụng phân bón hóa học và phát thải khí NO₂ gây hiệu ứng nhà kính và phương pháp cải thiện tốc độ sinh trưởng của thực vật và năng suất thu hoạch hạt trong lĩnh vực nông nghiệp bằng cách sử dụng chế phẩm vi sinh chứa vi khuẩn cố định đạm có khả năng tạo nốt sần hiệu quả ở phần trên mặt đất và hệ rễ của thực vật không thuộc họ đậu. Chế phẩm vi sinh và phương pháp theo sáng chế đặc biệt thích hợp cho các thực vật thuộc chi dầu mè (*Jatropha*), lúa miến (*Sorghum*), bông (*Gossypium*), cọ dầu (*Elaeis*), lúa (*Oryza*), thầu dầu (*Ricinus*) và sắn (*Manihot*).

Thuật ngữ “chế phẩm vi sinh”, “phân vi sinh” hoặc “chế phẩm vi sinh” được dùng trong bản mô tả để chỉ chế phẩm chứa một hoặc nhiều loài vi khuẩn theo sáng chế.

Thuật ngữ “dịch cấy vi khuẩn thuần khiết sinh học” hoặc “dịch cấy vi khuẩn gần như thuần khiết” được dùng trong bản mô tả để chỉ các dịch nuôi cấy vi khuẩn theo sáng chế không chứa các loài vi khuẩn khác với số lượng đủ để tác động vào sự tái bản của các chủng vi khuẩn theo sáng chế hoặc có thể được phát hiện bằng kỹ thuật phân tích vi khuẩn học thông thường.

Thuật ngữ “năng suất thực vật” được dùng trong bản mô tả để chỉ sự tăng trưởng hoặc phát triển của thực vật. Đối với cây lương thực như cây ngũ cốc hoặc rau xanh, thuật ngữ “năng suất thực vật” được dùng để chỉ năng suất hạt hoặc quả, v.v, được thu hoạch từ thực vật cụ thể. Do đó, thuật ngữ “cải thiện năng suất thực vật” được dùng để chỉ các phương pháp cải thiện năng suất hạt, quả, hoa, hoặc các bộ phận khác của thực vật được thu hoạch cho các mục đích khác nhau, cải thiện sự tăng trưởng của các bộ phận của thực vật, bao gồm thân, lá và rễ, cải thiện sự tăng trưởng thực vật, duy trì hàm lượng chất diệp lục cao ở lá, tăng sản lượng quả hoặc hạt, tăng trọng lượng quả hoặc hạt, giảm phát thải khí NO₂ do giảm sử dụng phân đạm và các cải thiện sinh trưởng và phát triển tương tự của thực vật.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất dịch cấy vi khuẩn thuần khiết sinh học, chứa loài vi khuẩn được chọn từ nhóm bao gồm vi khuẩn thuộc chi *Enterobacter*, *Methylobacterium*, *Sphingomonas*, và *Pleomorphomonas*. Theo một số phương án, các loài vi khuẩn này có khả năng khử hiệu quả nitrơ trong không khí thành amoniac ở thực vật như được kiểm chứng bằng thử nghiệm khử axetylen (acetylene reduction assay - AR assay). Theo một số phương án, quá trình khử khí N₂ diễn ra ở bề mặt lá. Theo các phương án khác, quá trình khử khí N₂ diễn ra ở bên trong bề mặt lá. Theo các phương án

bổ sung, quá trình khử khí N_2 diễn ra ở bề mặt rễ hoặc hệ rễ. Theo các phương án khác, quá trình khử khí N_2 diễn ra ở bên trong mô rễ. Theo một số phương án, các loài vi khuẩn này có thể tự sinh sôi hữu hiệu trên bề mặt lá, bề mặt rễ hoặc bên trong mô thực vật mà không gây ra phản ứng bảo vệ đáng kể ở thực vật, như gây chết tế bào. Theo các phương án khác, các loài vi khuẩn này được phân lập bằng cách nuôi cấy dịch chiết mô thực vật hoặc dịch rửa bề mặt lá trong môi trường không chứa nitơ, bằng cách sử dụng các phương pháp thích hợp như phương pháp theo sáng chế hoặc phương pháp tương tự đã biết trong lĩnh vực này hoặc phương pháp cải tiến của chúng.

Theo một phương án, ADN bộ gen của các loài vi khuẩn này có độ tương đồng ít nhất bằng 97%, và tốt hơn nếu ít nhất bằng 98% so với trình tự SEQ ID NO.10. Theo một số phương án, các loài vi khuẩn này là vi khuẩn thuộc chi *Enterobacter* có bộ gen cần thiết để cố định đạm. Theo một số phương án, các loài vi khuẩn *Enterobacter* này chủ yếu sản sinh polysaccharit ngoại bào, hoặc endoglucanaza. Theo một phương án khác, ADN bộ gen của các loài vi khuẩn này có độ tương đồng ít nhất bằng 97%, và tốt hơn nếu ít nhất bằng 98% so với trình tự SEQ ID NO.11. Theo một số phương án, các loài vi khuẩn này là vi khuẩn thuộc chi *Pleomorphomonas* có khả năng cố định đạm được kích thích bởi ion NH_4^+ ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,1mM đến 0,5mM. Theo phương án khác, ADN bộ gen của các loài vi khuẩn này có độ tương đồng ít nhất bằng 97%, và tốt hơn nếu ít nhất bằng 98% so với trình tự SEQ ID NO.12. Theo một số phương án, các loài vi khuẩn này là vi khuẩn thuộc chi *Sphingomonas* có khả năng sinh trưởng trong môi trường không chứa nitơ. Theo phương án khác, ADN bộ gen của các loài vi khuẩn này có độ tương đồng ít nhất bằng 97%, và tốt hơn nếu ít nhất bằng 98% so với trình tự SEQ ID NO.13 hoặc SEQ ID NO.14. Theo một số phương án, các loài vi khuẩn này là vi khuẩn thuộc chi *Methylobacterium*.

Dịch cấy vi khuẩn thuần khiết sinh học của các loài *Enterobacter* R4-368 và *Pleomorphomonas jatrophae* R5-392 được đăng ký vào ngày 06/01/2012 theo Thỏa thuận Budapest với Ngân hàng giống nghiên cứu nông nghiệp (Cơ quan đăng ký quốc tế), Trung tâm nghiên cứu nông nghiệp quốc gia, Bộ Nông Nghiệp Hoa Kỳ (Agricultural Research Service Culture Collection - NRRL (International Depositary Authority), National Center for Agricultural Utilization Research Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture), 1815 North University Street, Peoria, Illinois 61604 U.S.A., với số đăng ký lần lượt là NRRL B-50631 và NRRL B-50630. Các chủng này có thể

được nuôi cấy trong môi trường R₂A (chiết xuất nấm men 0,5g/L; proteoza pepton 0,5g/L; axit amin thủy phân casein 0,5g/L; glucoza 0,5g/L; tinh bột hòa tan 0,5g/L; Na-pyruvat 0,3g/L; K₂HPO₄ 0,3g/L; MgSO₄.7 H₂O 0,05g/L; aga 15g/L, độ pH = 7,2).

Dịch cấy vi khuẩn thuần khiết sinh học của các loài *Methylobacterium* sp. L2-4; *Methylobacterium* sp. L2-76 và *Sphingomonas* sp. S6-274 được đăng ký vào ngày 06/01/2012 theo Thỏa thuận Budapest với Ngân hàng giống nghiên cứu nông nghiệp (Cơ quan đăng ký quốc tế), Trung tâm nghiên cứu nông nghiệp quốc gia, Bộ Nông Nghiệp Hoa Kỳ (Agricultural Research Service Culture Collection - NRRL (International Depositary Authority), National Center for Agricultural Utilization Research Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture), 1815 North University Street, Peoria, Illinois 61604 U.S.A., với số đăng ký lần lượt là NRRL B-50628, NRRL B-50629 và NRRL B-50632. Các chủng này có thể được nuôi cấy trong môi trường 869 (trypton 10,0g/L; chiết xuất nấm men 5,0g/L; NaCl 5,0g/L; D-glucoza 1,0g/L; CaCl₂.2H₂O 0,345g/L; độ pH = 7,0).

Một số thể đột biến của các loài vi khuẩn theo sáng chế cũng có khả năng kích thích tăng trưởng thực vật giống như các thể không đột biến. Thể đột biến của các loài vi khuẩn theo sáng chế có thể bao gồm cả thể đột biến xuất hiện trong tự nhiên lẫn các thể đột biến nhân tạo. Một số thể đột biến này đã được kiểm chứng là hữu ích trong các thử nghiệm theo sáng chế. Các thể đột biến khác có thể được tạo ra bằng cách đột biến các loài vi khuẩn theo sáng chế bằng các gen đột biến đã biết, như N-metyl-nitrosoguanidin, theo các phương pháp thông thường. Ví dụ, xem, Patent Mỹ số. 4,877,738 và Patent Mỹ số. 5,552,138, mỗi tài liệu này được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề xuất chế phẩm vi sinh chứa ít nhất một dịch cấy vi khuẩn thuần khiết sinh học chứa các loài vi khuẩn được chọn từ nhóm bao gồm vi khuẩn thuộc chi *Enterobacter*, *Methylobacterium*, *Sphingomonas*, và *Pleomorphomonas*. Theo một phương án, chế phẩm vi sinh này chứa hỗn hợp của ít nhất hai dịch cấy vi khuẩn thuần khiết sinh học chứa các loài vi khuẩn này. Theo một số phương án, quy trình sản xuất chế phẩm vi sinh này bao gồm bước sản xuất các loài vi khuẩn theo sáng chế ở quy mô lớn trong môi trường tùy ý được khử nước theo phương pháp thích hợp để duy trì khả năng sống sót của tế bào và khả năng tự sinh sôi và tạo nốt sần ở thực vật chủ. Theo một số phương án, chế phẩm vi sinh này chứa các loài vi khuẩn theo sáng chế với hàm

lượng nằm trong khoảng từ 10^8 đến 10^{10} đơn vị tạo khuẩn lạc/mL (CFU/mL – Colony Forming Unit/mL). Theo một số phương án, chế phẩm vi sinh này có thể chứa các ion kim loại vi lượng. Theo một phương án, các ion kim loại vi lượng này được chọn từ nhóm bao gồm ion molypden (Mo^{2+}), ion sắt (Fe^{2+}), ion mangan (Mn^{2+}) hoặc hỗn hợp bất kỳ của chúng. Theo một phương án khác, chế phẩm vi sinh này chứa các ion kim loại vi lượng với hàm lượng nằm trong khoảng từ 0,1mM đến 50mM.

Theo một số phương án, chế phẩm vi sinh này có thể chứa chất mang. Chất mang thích hợp bất kỳ có thể được sử dụng. Ví dụ về các chất mang thích hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, beta-glucan, CMC, polysacarit ngoại bào của vi khuẩn, đường và sữa động vật. Ngoài ra, các vật liệu thực vật hoặc than bùn có thể được sử dụng làm chất mang. Ngoài ra, polyme sinh học có thể được sử dụng làm chất mang, trong đó chế phẩm vi sinh theo sáng chế được bao bằng polyme sinh học này. Ví dụ, xem, Patent Mỹ số. 4,828,600, Patent Mỹ số. 5,061,490, Patent Mỹ số. 5,951,978 và Patent Mỹ số. 7,393,678, mỗi tài liệu này được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn.

Theo một số phương án, các loài vi khuẩn có thể được sử dụng để bào chế chế phẩm vi sinh này là các loài vi khuẩn nêu trên. Theo các phương án khác, các loài vi khuẩn có thể được sử dụng để bào chế chế phẩm vi sinh này được phân lập bằng cách nuôi cấy dịch chiết mô thực vật hoặc dịch rửa bề mặt lá trong môi trường không chứa nitơ hoặc được lấy từ các ngân hàng giống vi sinh vật dựa theo chỉ số phân loại và đặc tính của các loài vi khuẩn theo sáng chế. Theo một số phương án, chế phẩm vi sinh này có tác dụng kích thích tăng trưởng thực vật, duy trì hàm lượng chất diệp lục cao trong lá, tăng sản lượng quả hoặc hạt, tăng trọng lượng quả hoặc hạt và giảm phát thải khí NO_2 do giảm sử dụng phân đạm. Theo các phương án khác, các đặc tính này được kiểm chứng ở các loài thực vật thuộc chi dầu mè (*Jatropha*), lúa miến (*Sorghum*), bông (*Gossypium*), cọ dầu (*Elaeis*), thầu dầu (*Ricinus*), lúa (*Oryza*) và sắn (*Manihot*).

Theo khía cạnh thứ ba, sáng chế đề xuất phương pháp cải thiện năng suất thực vật không thuộc họ đậu. Theo một số phương án, năng suất thực vật bao gồm sự tăng trưởng thực vật, duy trì hàm lượng chất diệp lục cao trong lá, tăng sản lượng quả hoặc hạt, tăng trọng lượng quả hoặc hạt hoặc tổ hợp bất kỳ của các đặc tính này. Theo các phương án khác, năng suất thực vật cũng bao gồm giảm phát thải khí NO_2 dẫn đến giảm sử dụng phân đạm. Theo một số phương án, các loài thực vật không thuộc họ đậu được chọn từ

các loài thuộc chi dầu mè (*Jatropha*), lúa miến (*Sorghum*), bông (*Gossypium*), cọ dầu (*Elaeis*), thầu dầu (*Ricinus*), lúa (*Oryza*) và sắn (*Manihot*). Theo sáng chế, phương pháp này bao gồm bước bón chế phẩm theo sáng chế cho thực vật. Theo một phương án, chế phẩm theo sáng chế được phun lên phần trên mặt đất của thực vật. Theo một phương án khác, chế phẩm vi sinh này có thể được bón vào rễ bằng cách bón lót vào các luống gieo hạt, tưới vào đất hoặc nhúng rễ vào hỗn dịch chứa chế phẩm vi sinh này. Theo phương án khác, chế phẩm vi sinh này có thể được ủ với hạt giống. Theo một số phương án, chế phẩm vi sinh này chứa các ion kim loại vi lượng. Theo các phương án khác, thực vật được phun bằng dung dịch chứa các ion kim loại vi lượng ngoài chế phẩm theo sáng chế có thể không chứa các ion kim loại vi lượng.

Theo một phương án, chế phẩm vi sinh này có thể được bón cho hạt giống bằng phương pháp bón lót hoặc bón thúc thích hợp trước khi gieo hạt. Phương pháp ủ với hạt giống bằng chế phẩm vi sinh đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Ví dụ, các loài vi khuẩn theo sáng chế có thể được trộn với chất mang hóa học dạng hạt trơ xốp, như được mô tả trong Patent Mỹ số. 4,875,921, được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn. Theo một phương án khác, chế phẩm vi sinh này có thể chứa chất mang hoặc không và bán dưới dạng chế phẩm riêng để sử dụng trực tiếp bởi người dùng, ví dụ bón lót vào các luống gieo hạt hoặc phun lên lá thực vật. Phương pháp bón trực tiếp chế phẩm vi sinh vào luống gieo hạt đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, ví dụ phun chế phẩm vi sinh này lên thực vật.

Nhìn chung, mật độ ủ các loài vi khuẩn này vào hạt giống, luống gieo hạt, hoặc tưới lên rễ cần đủ để tạo ra quần thể vi khuẩn sinh trưởng phát triển ở vùng đất tiếp giáp với rễ của thực vật. Tương tự, mật độ ủ các loài vi khuẩn này vào thực vật cần đủ để tạo ra quần thể vi khuẩn sinh trưởng phát triển ở lá của thực vật. Lượng hữu hiệu của chế phẩm vi sinh nên được sử dụng. Lượng hữu hiệu là lượng đủ để tạo ra sự tăng trưởng của vi khuẩn sao cho cải thiện được năng suất thực vật.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này hiểu rằng chế phẩm vi sinh theo sáng chế có nhiều ưu điểm hơn chế phẩm phân bón hóa học, hormon sinh trưởng hoặc các chế phẩm tương tự dùng trong nông nghiệp hiện nay. Do chính bản chất của chế phẩm vi sinh này, nên các loài vi khuẩn tự sinh sôi liên tục khi thực vật được bón theo phương pháp bất kỳ theo sáng chế. Do đó, không cần bón phân nhiều lần cho thực vật

trong mùa vụ. Trong quá trình canh tác các vi khuẩn này sinh trưởng cùng với thực vật và tiếp tục tạo ra tác dụng có lợi đối với thực vật trong suốt mùa vụ. Điều này trái ngược hoàn toàn với chế phẩm phân bón hóa học, chất diệt nấm cần được bổ sung định kỳ để ức chế nấm liên tục hoặc cải thiện tốc độ sinh trưởng của thực vật trong suốt mùa vụ. Do chế phẩm vi sinh theo sáng chế có thể được ủ lên hạt giống dưới dạng khan hoặc ẩm, nên việc áp dụng các kỹ thuật này tương đối đơn giản đối với người nông dân do hạt có thể được ủ trước khi gieo. Do chế phẩm vi sinh theo sáng chế có thể được phun lên thực vật, nên việc áp dụng các kỹ thuật này tương đối đơn giản đối với người nông dân và tạo ra lợi ích kinh tế đáng kể.

Trừ khi có quy định khác, trên thực tế sáng chế đã sử dụng các kỹ thuật hóa học, sinh học phân tử, vi sinh vật học, A tái tổ hợp, di truyền, miễn dịch học, sinh học tế bào, nuôi cấy tế bào và sinh học chuyển gen đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ xem, Maniatis *et al.*, 1982, *Molecular Cloning* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York); Sambrook *et al.*, 1989, *Molecular Cloning*, 2nd Ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York); Sambrook and Russell, 2001, *Molecular Cloning*, 3rd Ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York); Ausubel *et al.*, 1992), *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Sons, including periodic updates); Glover, 1985, *DNA Cloning* (IRL Press, Oxford); Russell, 1984, *Molecular biology of plants: a laboratory course manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.); Anand, *Techniques for the Analysis of Complex Genomes*, (Academic Press, New York, 1992); Guthrie and Fink, *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology* (Academic Press, New York, 1991); Harlow and Lane, 1988, *Antibodies*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York); *Nucleic Acid Hybridization* (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); *Transcription And Translation* (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); *Culture Of Animal Cells* (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987); *Immobilized Cells And Enzymes* (IRL Press, 1986); B. Perbal, *A Practical Guide To Molecular Cloning* (1984); the treatise, *Methods In Enzymology* (Academic Press, Inc., N.Y.); *Methods In Enzymology*, Vols. 154 và 155 (Wu et al. eds.), *Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology* (Mayer and Walker, eds., Academic Press, London, 1987); *Handbook Of Experimental Immunology*, Volumes I-IV (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds., 1986); Riott, *Essential Immunology*, 6th Edition, Blackwell Scientific Publications,

Oxford, 1988; Fire et al., *RNA Interference Technology: From Basic Science to Drug Development*, Cambridge University Press, Cambridge, 2005; Schepers, *RNA Interference in Practice*, Wiley-VCH, 2005; Engelke, *RNA Interference (RNAi): The Nuts & Bolts of siRNA Technology*, DNA Press, 2003; Gott, *RNA Interference, Editing, and Modification: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology)*, Human Press, Totowa, NJ, 2004; Sohail, *Gene Silencing by RNA Interference: Technology and Application*, CRC, 2004.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế sẽ được mô tả chi tiết thông qua các ví dụ sau, nhằm mục đích minh họa chứ không giới hạn phạm vi của sáng chế. Các kỹ thuật chuẩn đã biết trong lĩnh vực này và các kỹ thuật cụ thể được sử dụng.

Ví dụ 1

Phân lập các chủng vi khuẩn theo sáng chế

Cây dầu mè (*Jatropha curcas* L.) được lấy từ các lô nghiên cứu của Agrotechnology Experimental Station có trụ sở tại Lim Chu Kang, Singapore. Các cây dầu mè được lấy mẫu từ ba cây của các giống khác nhau có nguồn gốc từ Indonesia, Trung Quốc và Ấn Độ. Các rễ con có đường kính khoảng từ 1,2cm đến 2,0cm có dính đất được loại bỏ cẩn thận khỏi hệ rễ bằng bay và thu vào các túi dẻo vô trùng. Các đoạn cành có đường kính nằm trong khoảng từ 1,5cm đến 2,5cm được cắt bỏ khỏi các cây dầu mè bằng kéo và các lá thứ ba trưởng thành (không nhiễm bệnh) từ các cành khỏe mạnh được đặt vào nước đá để chuyển từ vườn thực địa đến phòng thí nghiệm và xử lý ngay lập tức. Các mẫu rễ, cành (khoảng 50g) và lá (khoảng 15g đến 20g) được rửa kỹ bằng nước cất, khử trùng bề mặt trong 1 phút bằng etanol 90%, sau đó trong 10 phút bằng nước oxy già 15% và rửa 3 đến 5 lần bằng nước cất vô trùng. 100µL mẫu nước từ lần rửa thứ ba được cấy vào môi trường giàu dinh dưỡng để kiểm chứng hiệu quả khử trùng. Sau khi khử trùng, các rễ và chồi được ngâm vào 10mL dung dịch MgSO₄ 10mM bằng cách sử dụng máy trộn trong các điều kiện vô trùng. Các dung dịch pha loãng liên tiếp được điều chế và 100µL mẫu được cấy chuyển vào môi trường không chọn lọc để kiểm chứng sự có mặt của các vi khuẩn nội ký sinh thực vật và đánh giá đặc tính của chúng. Các vi khuẩn này được phân lập bằng kỹ thuật cấy trải (100µL) bằng cách sử dụng các môi trường khác nhau chứa aga/phytagel như môi trường không chứa nitơ (Nfb) (Baldani et al.,

1980) để phân lập các vi khuẩn cố định đạm, môi trường giàu dinh dưỡng (M869) (Barac et al., 2004); để phân lập các vi khuẩn dị dưỡng tổng số và môi trường tối thiểu (AMS) (Whittenbury et al., 1970) để phân lập các vi khuẩn hướng methyl. Để phân lập các vi khuẩn cố định đạm, hỗn dịch tế bào (tỷ lệ pha loãng từ 10^{-3} đến 10^{-5}) được nạp vào hai ống giống nhau chứa môi trường bán rắn không có nitơ và ủ trong 96 giờ ở nhiệt độ 30°C. Các màng mỏng sinh trưởng trong môi trường bán rắn được cấy chuyển vào môi trường thạch aga không chứa nitơ để bảo quản khuẩn lạc đơn và sử dụng tiếp theo.

Ví dụ 2

Điều kiện nuôi cấy và bón các chủng vi khuẩn phân lập theo sáng chế

Các chủng *Methylobacterium* được sinh trưởng trong môi trường lỏng 869 (Barac et al., 2004) chứa 1% metanol được dùng làm nguồn cacbon. Các chủng phân lập từ rễ được nuôi cấy trong môi trường lỏng 869 hoặc môi trường 2xYT không chứa metanol. Toàn bộ các mẫu nuôi cấy được ủ ở nhiệt độ 30°C và sinh trưởng cho đến giai đoạn ổn định sớm. Ngay trước khi bón vào cây, thu lấy các tế bào (10000 vòng/phút, 8 phút), rửa một lần và tái hỗn dịch hóa trong dung dịch SDW hoặc dung dịch $MgSO_4$ 10mM, mật độ quang ở bước sóng 600nm (OD_{600nm}) được điều chỉnh và bón vào cây như sau: để bón rễ, lượng hỗn dịch tế bào tương đương ($OD_{600nm} = 1,0$ hoặc 10^8 CFU/mL) của mỗi chủng phân lập được trộn và bổ sung ở thời điểm gieo trồng và sau 15 ngày gieo trồng (days after sowing - DAS); để bón vào lá, hỗn hợp các chủng phân lập hoặc từng chủng phân lập được tưới lên lá cho đến khi lá cây được thấm ướt hoàn toàn sau 15 ngày hoặc 30 ngày gieo trồng (lượng thay đổi phụ thuộc vào kích cỡ cây và số lượng lá).

Ví dụ 3

Giải trình tự và khuếch đại gen *nifH*

Gen *nifH* được phát hiện bằng phương pháp PCR mô tả trong bài báo: Pinto-Tomás et al. (2009). Gen *nifH* được khuếch đại bằng các mồi thông dụng mồi xuôi (5'-AAA GGY GGW ATC GGY AAR TCC ACC AC-3'; SEQ ID NO.1) và mồi ngược (5'-TTG TTS GCS GCR TAC ATS GCC ATC AT-3'; SEQ ID NO.2) ở các điều kiện PCR nghiêm ngặt được mô tả trong bài báo: Widmer et al. (1999) để hạn chế xuất hiện các sản phẩm khuếch đại lỗi dương tính, bao gồm: 95°C/5 phút, 94°C/11giây trong 40 chu kỳ, 92°C/15 giây, 54°C/8 giây, 56°C/30giây, 74°C/10giây và 72°C/10giây, và tổng hợp trong 10 phút/72°C. Các sản phẩm PCR được rửa gải bằng kit chiết xuất gel QIAquick trước

khi điều chế các dung dịch giải trình tự chứa hỗn hợp phản ứng BigDye và nạp vào máy giải trình tự AND tự động Applied Biosystems 3700. Các trình tự *nifH* từ nghiên cứu này và các trình tự tương đồng được phân tích từ cơ sở dữ liệu NCBI bằng phần mềm BLAST.

Ví dụ 4

Đánh giá hoạt tính nitrogenaza *in vitro*

Thử nghiệm khử axetylen (AR) được thực hiện trên các chủng vi khuẩn sống tự do và các chủng vi khuẩn cộng sinh với thực vật. Khả năng cố định đạm được xác định bằng cách nuôi cấy các chủng trong 40mL môi trường không chứa nitơ (Môi trường DSMZ số 3) đựng trong chai huyết thanh dung tích 125mL (Wheaton Industries Inc., USA). Môi trường này chứa các thành phần sau (trong 1L nước cất): 5,0g Glucoza, 5,0g manitol, 0,1g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,1g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5,0mg $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,9g K_2HPO_4 , 0,1g KH_2PO_4 , 0,01g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5,0g CaCO_3 và 1mL hỗn hợp các ion kim loại vi lượng. Hỗn hợp các ion kim loại vi lượng (SL-6, trong môi trường DSMZ số 27) chứa các thành phần sau (trong 1L nước cất): 0,1g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,03g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,3g H_3BO_3 , 0,2g $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,01g $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ và 0,02g $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Thử nghiệm khử axetylen được thực hiện trên toàn bộ các mẫu nuôi cấy lỏng bằng cách bơm axetylen tinh khiết vào các bình chứa thích hợp được bịt kín bằng nút chai kín khí để thu được hàm lượng axetylen bằng 15% (thể tích/thể tích); sau đó ủ trong thời gian lên đến 96 giờ ở nhiệt độ 30°C. Trong các khoảng thời gian nhất định, các mẫu khí (0,5mL) được hút ra bằng bơm tiêm PTFE (Hewlett-Packard, USA) và phân tích bằng thiết bị sắc ký khí (GC 6890N, Agilent Technologies Inc., USA) được trang bị bộ phận phát hiện ion hóa ngọn lửa được vận hành như sau: khí mang: He; 35mL/phút; nhiệt độ của bộ phận phát hiện: 200°C; cột: GS-Alumina (30m x 0,53mm I.D.); áp suất: 4,0 psi. Đường chuẩn được thiết kế bằng etylen (C_2H_4 , Mã sản phẩm: 00489, Sigma-Aldrich) được tiêm lặp lại hai lần với nồng độ nằm trong khoảng từ 1nM đến 1000nM và hiệu chuẩn (chiều cao pic so với nồng độ nmol của C_2H_4). Nồng độ protein được xác định bằng phương pháp Lowry có cải tiến với chất chuẩn là abumin huyết thanh bò.

Ví dụ 5

Đánh giá hoạt tính nitrogenaza trong điều kiện *in planta*

Thử nghiệm khử axetylen (AR) được thực hiện 2 đến 3 tuần sau khi bón, và số lượng vi khuẩn có khả năng sống sót ở chồi/rễ được xác định bằng kỹ thuật pha loãng

liên tiếp. Các mẫu từ mỗi lô lặp lại được thu thập từ nhà kính và loại bỏ toàn bộ đất bám dính bằng cách rũ. Các chồi/rễ/toàn bộ cây con được chuyển vào bình thủy tinh có dung tích 125mL, được đầy bằng nút màu đỏ đường kính 20mm. Sau khi hút bỏ thể tích khí tương đương, axetylen được bơm vào các chai này đến nồng độ cuối cùng bằng 15% và ủ ở nhiệt độ 30°C trong 4 đến 12 giờ. Thiết bị sắc ký khí được vận hành ở cùng điều kiện nêu trên. Toàn bộ các trị số biểu diễn thu được sau khi trừ đi các trị số etylen mà không cần mẫu trắng

Ví dụ 6

Đếm quần thể vi khuẩn

Các mẫu cây trên ba lô lặp lại được chọn ngẫu nhiên trong mỗi lần lấy mẫu, và mỗi mẫu lặp lại bao gồm rễ và phần trên mặt đất của ba cây. Để đếm toàn bộ quần thể vi khuẩn, các dịch chiết đồng nhất được pha loãng liên tiếp bằng nước cất vô trùng và cấy chuyển lên môi trường AMS chứa 0,5% metanol để xác định quần thể *Methylobacterium* hoặc vào các đĩa chứa môi trường M869 để xác định quần thể vi khuẩn tổng số. Các khuẩn lạc được đếm sau khi bón các đĩa này trong 5 ngày ở nhiệt độ 30°C.

Ví dụ 7

Hoạt tính khử axetylen của các chủng vi khuẩn cố định đạm phân lập trong điều kiện *in vitro* và *in planta*

Nhiều loài vi khuẩn cố định đạm được phân lập từ thực vật thuộc chi dầu mè (*Jatropha*) hoặc vùng rễ của các thực vật này. Khả năng cố định đạm của các loài này được kiểm chứng bằng cách phát hiện sự có mặt của gen tương đồng *nifH* bằng phương pháp PCR, hoạt tính khử axetylen trong điều kiện *in vitro* và *in planta*. Các tác giả sáng chế đã phát hiện thấy rằng hoạt tính nitrogenaza của các chủng vi khuẩn phân lập trong điều kiện *in vitro* là khác biệt đáng kể so với trong điều kiện *in planta*. Hoạt tính của các chủng này được thể hiện trong Bảng 1.

Bảng 1

Hoạt tính khử axetylen của các chủng vi khuẩn cố định đạm phân lập

Các chủng phân lập	Môi trường sử dụng	Hoạt tính nitrogena của chủng tinh khiết (nmol C ₂ H ₄ /giờ/mg protein)	Hoạt tính khử hóa axetylen trong điều kiện <i>in planta</i> (nmol C ₂ H ₄ /giờ/cây)	Gen <i>nifH</i> *	Hoạt tính Endoglucanaza
<i>Methylobacterium</i> sp. L2-4	JNFb	661,3 ± 65,31	94,17 ± 9,52	+ (420 nt)	+
<i>Methylobacterium</i> sp. L2-76	JNFb	272,2 ± 20,15	32,70 ± 5,21	+	+
<i>Methylobacterium</i> sp. L7-515	JNFb	223,3 ± 32,14	61,57 ± 7,62	+	+
<i>Enterobacter</i> sp. R4-368	DSMZ**	1060,7 ± 110,6	220,08 ± 20,08	+ (432 nt)	+
<i>Enterobacter</i> sp. R5-362	DSMZ	960,5 ± 110,5	77,54 ± 8,54	+	+
<i>Enterobacter</i> sp. R4-390	DSMZ	1012,8 ± 62,8	71,13 ± 10,07	+	+
<i>Pleomorphomonas jatrophae</i> sp. R5-392	DSMZ	92,79 ± 4,8	Nd	+ (409 nt)	-
<i>Sphingomonas</i> sp. S6-274	DSMZ	16,14 ± 1,2	Nd	+	+

Chú thích: gen *nifH**: gen được khuếch đại bằng PCR và các sản phẩm được giải trình tự để kiểm chứng tiếp. ** DSMZ: Môi trường không chứa nitơ số 3; thử nghiệm khử axetylen được thực hiện đối với tất cả các mẫu nuôi cấy lỏng bằng cách bơm axetylen tinh khiết vào các bình chứa thích hợp được bịt kín bằng nút chai kín khí đến nồng độ cuối cùng bằng 15% (thể tích/thể tích); sau đó ủ trong thời gian lên đến 96 giờ ở nhiệt độ 30°C. Píc etylen không được phát hiện ở bình đối chứng không được bơm 15% axetylen (thể tích/thể tích) vào khoảng không khí ở bên trên bình. Các trị số thu được được tính bằng trị số trung bình ± độ lệch chuẩn cho ba lần lặp lại. Nd: không xác định.

Ví dụ 8

Tác dụng của ion amoni đến hoạt tính cố định đạm

Tính kháng amoniac là đặc tính quan trọng của các chủng vi khuẩn cố định đạm theo sáng chế. Để kiểm chứng đặc tính này, hoạt tính khử axetylen của hai chủng vi khuẩn tiềm năng nhất theo sáng chế đã được đánh giá ở các nồng độ amoni clorua khác nhau. Ngạc nhiên phát hiện thấy cả chủng *Enterobacter* sp. R4-368 lẫn chủng *Methylobacterium* sp. L2-4 không chỉ có hoạt tính mạnh ở nồng độ amoni clorua lên đến 1mM nhưng mà ion NH₄⁺ còn làm cải thiện đáng kể hoạt tính của các chủng này mặc dù amoni clorua có tác dụng ức chế hoạt tính của chúng ở nồng độ bằng khoảng 5mM (Fig.1a và Fig.1b).

Ví dụ 9

Tác dụng của ion kim loại đến hoạt tính cố định đạm

Hoạt tính nitrogenaza được đánh giá trên các môi trường không chứa nitơ có bổ sung Na_2MoO_4 hoặc $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ở nồng độ khác nhau (0mM, 0,1mM, 0,5mM, 1mM, 10mM). Hoạt tính nitrogenaza được kích thích bởi các ion Fe^{2+} và molypden Mo^{2+} (Fig.2 và Fig.3).

Ví dụ 10

Đặc tính nông học của cây dầu mè được bón các chủng vi khuẩn cố định đạm theo sáng chế

Để kiểm chứng hiệu quả cố định đạm của các chủng vi khuẩn theo sáng chế ở thực vật, các chủng được chọn được bón cho cây con dầu mè ở dạng chủng đơn hoặc hỗn hợp. Các cây dầu mè được sinh trưởng trong điều kiện không khí ngoài trời trong các chậu nhựa (đường kính 30cm) sau khi bón các chủng vi khuẩn này. Từ thời điểm ra hoa đến khi thu hoạch, chế phẩm phân bón NPK có bán trên thị trường được bón ở liều bằng một nửa liều chỉ dẫn (0,5g/cây) một lần trong khoảng thời gian 15 ngày. Như được thể hiện trong Bảng 4, hàm lượng chất diệp lục, hoạt tính khử axetylen ở lá, năng suất hạt và trọng lượng hạt đã được cải thiện đáng kể. Đáng chú ý là khi bón bằng hỗn hợp các chủng phân lập được từ rễ và lá đã tạo ra hàm lượng chất diệp lục cao nhất và hoạt tính khử axetylen mạnh nhất. Thời điểm ra hoa cũng được rút ngắn, đặc biệt khi bón bằng các chủng L2-4. Hoạt tính khử axetylen tương đối mạnh ở các cây đối chứng có thể do có các loài cố định đạm từ môi trường tự nhiên. Quan trọng là năng suất hạt đã tăng gấp khoảng 4 lần khi được bón riêng bằng chủng phân lập từ lá L2-4 hoặc hỗn hợp các chủng phân lập được từ rễ (Bảng 2).

Bảng 2

Tác dụng của các chủng cố định đạm theo sáng chế trên cây dầu mè

Mẫu thử nghiệm	Hàm lượng chất diệp lục tương đối	Hoạt tính khử axetylen (nmol C_2H_4 /giờ/lá)	Thời gian trung bình để ra hoa (DAP)	Số lượng quả trong mỗi lần bón	Số lượng hạt/cây	Tổng khối lượng hạt trong mỗi lần bón (g)	Trọng lượng hạt (g)
Cây đối chứng	$33,29 \pm 2,44$	$18,11 \pm 2,1$	137	$26 \pm 2,87$	$75 \pm 8,14$	36,25	0,483
L2-4	$38,17 \pm 4,10$	$22,31 \pm 3,3$	110	$101 \pm 7,91$	$261 \pm 20,78$	134,89	0,517

L2-76	36,47 ± 4,01	20,95 ± 4,0	125	58 ± 4,37	157 ± 11,41	81,56	0,519
Chủng phân lập từ lá (Leaf isolates - LI)	37,66 ± 4,17	24,00 ± 4,0	118	43 ± 2,72	119 ± 8,13	62,63	0,526
Chủng phân lập từ rễ (Root isolates - RI)	38,12 ± 3,30	19,97 ± 2,0	124	98 ± 9,00	286 ± 25,47	145,27	0,508
RI và LI (MI)	40,07 ± 5,14	36,67 ± 5,7	115	73 ± 5,03	182 ± 12,41	92,05	0,506

Chú thích: Mỗi trị số được tính bằng trị số trung bình ± độ lệch chuẩn của tám lô lặp lại mỗi lần bốn (n = 8). Chủng phân lập từ lá (Leaf isolates - LI): L2-4 (*Methylobacterium* sp.), L2-76 (*Methylobacterium* sp.) và S6-274 (*Sphingomonas* sp.); Chủng phân lập từ rễ (Root isolates - RI): R4-368 (*Enterobacter* sp.), R5-362 (*Enterobacter* sp.), R5-431 (*Klebsiella* sp.), R7-601 (*Sinorhizobium* sp.) và R1-99 (*Rhizobium* sp.). Để bón hỗn hợp chứa các chủng phân lập từ lá, các chủng này được phun bằng máy phun cầm tay (25mL/chậu; 1×10^9 CFU chủng/mL hoặc tưới ẩm toàn bộ các lá) sau 30 ngày và 90 ngày gieo trồng (days after planting - DAP). Hàm lượng chất diệt lục và hoạt tính khử axetylen được đo sau 30 ngày bón (days after inoculation - DAI). Các quả chín được thu hoạch liên tục và làm khô ở nhiệt độ 37°C trong 2 ngày. Các hạt được thu hoạch từ các quả khô và bảo quản ở nhiệt độ 4°C để phân tích tiếp. Năng suất quả và hạt được theo dõi trong 7 tháng.

Để kiểm chứng khả năng tự sinh sản của các loài vi khuẩn này ở mô thực vật, các dịch chiết mô đồng nhất không được khử trùng bề mặt được pha loãng liên tiếp bằng nước cất vô trùng và kỹ thuật MPN được thực hiện với 3 ống chứa môi trường Nfb bằng cách sử dụng tỷ lệ pha loãng từ 10^{-3} đến 10^{-5} và ủ ở nhiệt độ 30°C trong 7 ngày. Để định lượng quần thể vi khuẩn nội ký sinh thực vật trước khi đồng nhất hóa, các mô lá và mô rễ được khử trùng bề mặt bằng cách ngâm vào etanol 70% trong 1 phút; nước oxy già 15% trong 1 phút, sau đó rửa từ 5 đến 10 lần bằng nước cất vô trùng. Các dung dịch pha loãng liên tiếp được cấy phủ lên môi trường thạch aga không chứa nitơ. Các khuẩn lạc được đếm sau khi bón các đĩa này trong 5 ngày ở nhiệt độ 30°C. Các kết quả thử nghiệm được thể hiện trong Bảng 3. Đối với các chủng phân lập được từ lá, quần thể vi khuẩn dị dưỡng

và hướng methyl nhiều hơn quần thể vi khuẩn nội ký sinh thực vật (dữ liệu không được thể hiện).

Bảng 3

Quần thể vi khuẩn cố định đạm (Kỹ thuật MPN)

Mẫu thử nghiệm	Quần thể (Log CFU/g mẫu)			
	Mẫu lá		Mẫu rễ	
	Chủng phân lập từ lá	Vi khuẩn nội ký sinh thực vật	Chủng phân lập từ rễ	Vi khuẩn nội ký sinh thực vật
Cây đối chứng	$3,97 \pm 0,97$	$2,48 \pm 0,18$	$2,56 \pm 0,16$	$2,46 \pm 0,36$
L2-4	$5,38 \pm 0,38$	$2,96 \pm 0,46$	$3,51 \pm 0,41$	$2,81 \pm 0,11$
L2-76	$5,61 \pm 0,51$	$2,82 \pm 0,72$	$3,16 \pm 0,36$	$2,64 \pm 0,34$
Chủng phân lập từ lá (Leaf isolates - LI)	$5,46 \pm 0,26$	$3,10 \pm 0,30$	$3,24 \pm 0,54$	$2,59 \pm 0,19$
Chủng phân lập từ rễ (Root isolates - RI)	$4,12 \pm 0,12$	$3,05 \pm 0,25$	$4,32 \pm 0,32$	$3,65 \pm 0,25$
RI và LI (MI)	$5,72 \pm 0,62$	$3,21 \pm 0,31$	$4,66 \pm 0,66$	$3,88 \pm 0,43$

Chú thích: Quần thể các chủng phân lập được từ lá hoặc các vi khuẩn nội ký sinh thực vật từ cả các lá được khử trùng bề mặt lần không được khử trùng bề mặt được đo trong môi trường Nfb ở thời điểm thu hoạch quả, tức là 6 tháng sau lần bón thứ hai.

Ví dụ 11

Kích thích tăng trưởng cây con dầu mè

Hạt giống của cây dầu mè (*Jatropha*; giống MD44) được khử trùng bề mặt bằng cách ngâm vào etanol 70% trong 1 phút; 2% NaOCl trong 30 giây, sau đó rửa từ 5 đến 10 lần bằng nước cất vô trùng. Để bón vào thực vật, các chủng *Methylobacterium* phân lập được từ lá L2-4 và L7-515 được sinh trưởng trên môi trường lỏng 2xYT chứa 30mM metanol và các chủng phân lập từ rễ R4-368, R5-362, R5-431, R7-601 và R1-99 được sinh trưởng trong môi trường không chứa metanol đến giai đoạn sinh trưởng theo cấp số nhân vừa phải, ly tâm, rửa, hỗn dịch hóa lại trong nước cất vô trùng và bảo quản ở nhiệt độ 4°C cho đến khi sử dụng. Hỗn dịch chứa các vi khuẩn này được điều chỉnh đến mật độ quang OD_{600nm} bằng 1,2 (10⁸ CFU/mL) và bón cho các hạt giống cây dầu mè sau khi khử trùng. Để bón hỗn hợp, trộn năm chủng với lượng bằng nhau; sau đó sử dụng để ngâm hạt (ở nhiệt độ phòng trong 6 giờ ở tốc độ 60 vòng/phút), bón rễ (2mL/chậu sau khi gieo trồng) và phun bề mặt cho đến khi thấm ướt lá.

Trong các điều kiện nhà kính, sau 45 ngày gieo trồng cho thấy hầu hết các thông số đánh giá của các cây dầu mè được bón với vi khuẩn cố định đạm đều cao hơn đáng kể so với các cây đối chứng không được bón (Bảng 4). Ở cây dầu mè, việc bón riêng các chủng vi khuẩn cố định đạm (LI và RI) hoặc hỗn hợp của nó đã làm tăng đáng kể số lượng lá, hàm lượng chất diệp lục, sức khỏe cây con, tỷ lệ nảy mầm và sinh khối so với các cây đối chứng hoặc các cây bón riêng với các chủng phân lập được từ lá hoặc các chủng phân lập được từ rễ. Trong điều kiện nhà kính, hoạt tính khử axetylen ở các cây đối chứng thấp hơn rất nhiều, có thể do sự nhiễm chéo thấp.

Bảng 4

Chỉ số sức khỏe của cây con, số lượng lá và tỷ lệ nảy mầm của hạt Dầu mè được bón các chủng vi khuẩn cố định đạm sau 45 ngày gieo trồng

Thử nghiệm [†]	Số lượng lá	Hàm lượng chất diệp lục tương đối	Hoạt tính nitrogenaza [‡]	SVI	RG	Sinh khối (g)
Cây đối chứng	6,19 ± 0,29	34,91 ± 3,91	4,15 ± 0,25	901,7 ± 46,7	23,50 ± 2,5	46,12 ± 6,12
Các chủng phân lập được từ rễ (Root isolates - RI)	6,58 ± 0,48	36,08 ± 4,08	8,56 ± 1,06	1054,1 ± 60,18	24,55 ± 2,55	62,0 ± 4,0
Các chủng phân lập được từ lá (Leaf isolates - LI)	6,47 ± 0,42	38,81 ± 4,31	16,79 ± 2,79	986,2 ± 65,22	23,57 ± 2,57	61,4 ± 3,4
RI+LI	6,72 ± 0,42	35,31 ± 3,81	11,52 ± 1,72	1037,6 ± 67,51	25,41 ± 2,41	63,0 ± 4,0

Chú thích: [†]Trị số trung bình của của 150 cây dầu mè. [‡]Trị số được tính theo số nmol C₂H₄/ngày/cây con. Mỗi trị số được tính bằng trị số trung bình của ba lô lặp lại mỗi lần bón. Chỉ số sức khỏe của cây con (Seedling vigour index - SVI) được tính theo công thức sau: SVI = % cây nảy mầm × chiều cao cây con (chiều cao chồi + chiều cao rễ) tính theo cm (Baki and Anderson, 1973). Tỷ lệ nảy mầm (Rate of germination - RG) được tính theo công thức sau: RG = $\sum N_i/D_i$, trong đó N_i là số lượng hạt đã nảy mầm trong khoảng thời gian nhất định; và D_i là đơn vị thời gian (ngày) (Madhaiyan et al., 2004).

Tác dụng kích thích tăng trưởng thực vật có thể được quan sát trong thời gian dài trong các chậu có đường kính 35cm. Như được thể hiện trong Bảng 5, chiều cao cây, đường kính thân, số lượng lá và khối lượng thân đã được cải thiện đáng kể. Đất nghèo

chất dinh dưỡng được sử dụng và chế phẩm phân bón NPK được bón ở liều lượng bằng một nửa liều chỉ dẫn (0,5g/cây) một lần trong khoảng thời gian 15 ngày.

Bảng 5

Tác dụng của hỗn hợp các chủng vi khuẩn cố định đạm đến sự tăng trưởng sớm của cây dầu mè sau 90 ngày gieo trồng

Thử nghiệm ủ	Chiều cao cây (cm)	Đường kính thân	Số lượng lá	Hàm lượng chất diệp lục tương đối	Khối lượng thân
Chủng đối chứng	32,23	25,55	11,58	26,20	167,41
RI	40,37	27,72	20,58	33,40	244,08
RI và LI	43,97	27,44	24,50	38,16	261,59

Chú thích: Mỗi trị số được tính bằng trị số trung bình của 12 cây mỗi lần bón ($n = 12$). Các chủng phân lập từ lá (Leaf isolates - LI): L2-4 (*Methylobacterium* sp.) và L7-515 (*Methylobacterium* sp.); Các chủng phân lập từ rễ (Root isolates - RI): R4-368 (*Enterobacter* sp.), R5-362 (*Enterobacter* sp.), R5-431 (*Klebsiella* sp.), R7-601 (*Sinorhizobium* sp.) và R1-99 (*Rhizobium* sp.).

Ví dụ 12

Tác dụng của chủng *Metylobacterim* sp đến sự tăng trưởng của cây bông, cây thầu dầu, và cây lúa miến

Các hạt giống được khử trùng bề mặt bằng cách ngâm vào etanol 70% trong 1 phút; NaOCl 2% trong 30 giây, sau đó rửa từ 5 đến 10 lần bằng nước cất vô trùng. Để bón vào thực vật, chủng *Methylobacterium* L2-4 được sinh trưởng trong môi trường lỏng 2xYT chứa 30mM metanol (thể tích/thể tích) đến giai đoạn sinh trưởng theo cấp số nhân vừa phải, ly tâm, rửa, hỗn dịch hóa lại trong nước cất vô trùng và bảo quản ở nhiệt độ 4°C cho đến khi sử dụng. Để ngâm hạt, các hạt giống đã được khử trùng bề mặt được ngâm vào thể tích gấp đôi hỗn dịch vi khuẩn ($OD_{600nm} = 1,2$ hoặc 10^9 CFU/mL hỗn dịch). Sau 6 giờ ngâm, hỗn dịch vi khuẩn này được loại bỏ, và các hạt giống được phơi khô trong bóng râm trong 30 phút trước khi để nảy mầm trong 24 giờ và đem gieo. Để phun lên bề mặt lá, các chủng vi khuẩn được phun bằng máy phun bằng tay (khoảng 25mL/cây; $OD_{600nm} = 1,2$) sau 15 ngày gieo trồng.

Trong các điều kiện nhà kính, chủng *Methylobacterium* L2-4) có hoạt tính khử axetylen mạnh ở lá của cây bông, cây thầu dầu, cây lúa miến (*Sorghum*), và cây lúa

(Bảng 6). Các tác dụng của chủng vi khuẩn này đến sự tăng trưởng của các cây này được thể hiện trong Bảng 7.

Bảng 6

Hoạt tính nitrogenaza hoặc hoạt tính khử axetylen của các thực vật khác nhau được bón với chủng *Methylobacterium* sp. L2-4; sau 20 ngày bón

Thực vật	Hoạt tính khử axetylen (nmol C ₂ H ₄ /ngày/cây)	Hoạt tính khử axetylen (nmol C ₂ H ₄ /ngày/g mẫu) (DW)
Cây bông	176,67 ± 21,67	70,7 ± 11,72
Cây lúa miến	259,61 ± 59,61	177,8 ± 28,77
Cây thầu dầu	25,78 ± 5,78	19,2 ± 5,20
Cây lúa	17,54 ± 2,54	140,8 ± 15,77
Cây dầu mè (<i>Jatropha</i> ; giống MD-44)	288,45 ± 78,45	114,5 ± 19,46

Chú thích: Mỗi trị số được tính bằng trị số trung bình ± độ lệch chuẩn của ba lô lặp lại mỗi lần bón.

Bảng 7

Tác dụng của chủng *Methylobacterium* sp. L2-4 đến sự tăng trưởng thực vật

Thực vật	Chiều cao cây (cm)		Số lượng lá (#)		Hàm lượng chất diệp lục tương đối*		Số lượng cành (#)		Số lượng hoa (#)	
	Cây đối chứng	Cây được ủ	Cây đối chứng	Cây được ủ	Cây đối chứng	Cây được ủ	Cây đối chứng	Cây được ủ	Cây đối chứng	Cây được ủ
Cây bông	101,5 ± 4,45	103,4 ± 3,08	40 ± 2,16	44,25 ± 1,89	35,95 ± 1,12	39,195 ± 1,89	5,75 ± 0,50	8,75 ± 0,96	9,25 ± 1,5	15,75 ± 1,26
Cây thầu dầu	105,8 ± 12,21	115,8 ± 3,92	10 ± 2,16	12,25 ± 1,50	49,95 ± 4,28	54,575 ± 1,97	ND	ND	0	2 (4)
Cây lúa miến	146,5 ± 31,41	138,3 ± 23,45	17 ± 2,16	19,25 ± 4,99	51,08 ± 4,04	61,15 ± 3,61	ND	ND	1,5 ± 1,0	1,5 ± 0,58
Cây dầu mè	70,8 ± 1,71	72,0 ± 2,45	16,75 ± 0,5	20,75 ± 4,50	30,66 ± 0,97	34,18 ± 1,62	ND	ND	ND	ND

Chú thích: Mỗi trị số được tính bằng trị số trung bình ± độ lệch chuẩn của ba lô lặp lại mỗi lần bón. Hàm lượng chất diệp lục tương đối được đo ở 5 lá từ phía đỉnh các cây. Các kết quả được ghi sau 75 ngày bón.

Ví dụ 13

Hoạt tính khử axetylen và dữ liệu phân loại chủng *Pleomorphomonas jatrophae*

Khả năng cố định đạm có thể được kiểm chứng bằng phương pháp đa ngành. Chủng *Pleomorphomonas jatrophae* R5-392^T được phân tích khuếch đại PCR đặc hiệu

gen *nifH*. Sản phẩm khuếch đại có chiều dài 409 cặp bazơ dự kiến được quan sát với chủng *Pleomorphomonas jatrophae* R5-392 thử nghiệm. Trong trường hợp của chủng *Pleomorphomonas jatrophae* R5-392, sản phẩm PCR này được tinh chế và giải trình tự. So sánh trình tự thu được với cơ sở dữ liệu EMBL cho thấy độ tương đồng của trình tự này với gen *nifH* của *P. oryzae* bằng 98%. Trình tự axit amin thu được (gồm 130 axit amin suy luận) có độ tương đồng bằng 100% với reductaza phụ thuộc ATP hoặc nitrogenaza sắt-protein (thành phần nitrogenaza II, đinitrogenaza reductaza, protein *nifH*) của *P. oryzae*. Hoạt tính nitrogenaza của chủng *Pleomorphomonas jatrophae* R5-392 được đánh giá bằng thử nghiệm khử axetylen. Chủng *Pleomorphomonas jatrophae* R5-392^T được sinh trưởng trong môi trường không chứa nitơ, đã khử hữu hiệu axetylen và có hoạt tính nitrogenaza mạnh nhất lớn hơn 300 nmol C₂H₄/mL trong mẫu khí ở khoảng không bên trên sau 96 giờ ủ ở nhiệt độ 30°C với số lượng quần thể vi khuẩn lớn hơn 6 log CFU/mL (Fig.6a). Tuy nhiên, loài di truyền gần với chủng *Pleomorphomonas jatrophae* R5-392 có hoạt tính nitrogenaza nhỏ hơn 10nmol C₂H₄/mg protein (dữ liệu không được thể hiện). Trong môi trường không chứa nitơ, nồng độ nitơ càng thấp (0,1mM NH₄Cl) thì hoạt tính nitrogenaza càng mạnh hơn so với môi trường chứa nồng độ nitơ cao hoặc không chứa NH₄Cl (Fig.6b). Nitrogenaza được bất hoạt bằng cách sử dụng NH₄Cl ở nồng độ lớn hơn 1mM trong môi trường không chứa nitơ. Hoạt tính nitrogenaza được đo bằng cách bổ sung Na₂MoO₄/FeSO₄.7H₂O ở các nồng độ khác nhau (0mM, 0,1mM, 0,5mM, 1mM, 10mM) vào môi trường không chứa nitơ và bơm với 15% axetylen (thể tích/thể tích) sau khi bón. Hoạt tính nitrogenaza cao hơn khi nồng độ Fe bằng 0,1mM và giảm khi nồng độ Fe tăng. Hoạt tính nitrogenaza không được ghi nhận trong môi trường không chứa nitơ không có Fe (Fig.6b).

Ví dụ 14

Giải trình tự bộ gen của chủng *Enterobacter* sp R4-369 và chủng *Methylobacterium* sp. L2-4

AND tổng số của chủng *Enterobacter* sp R4-369 và chủng *Methylobacterium* sp. L2-4 được chiết xuất và một phần trình tự bộ gen thu được được sử dụng để xác định các trình tự đoạn gen ngắn bằng phương pháp giải trình tự nhờ định lượng pyrophosphat 454. Bằng cách sử dụng cụm gen *nif* của *Klebsiella pneumonia* làm trình tự truy vấn (Mã truy cập Genbank 13303), toàn bộ chiều dài các gen *nif* của các chủng này được xác định

(Fig.4). Trình tự gen *nif* của *Methylobacterium* sp. L2-4 là SEQ ID NO.3. Trái lại, các gen này không thể xác định được ở *Enterobacter cloacae* (Mã truy cập Genbank. NC_014121.1 và NC_014618.1) hoặc *Enterobacter* sp. 638 nội ký sinh kích thích tăng trưởng thực vật (Mã truy cập Genbank. NC_009436.1).

Ngạc nhiên là không phát hiện thấy độ tương đồng về bộ gen của *Methylobacterium* sp. L2-4 và bộ gen của *Methylobacterium radiotolerans* JCM 2831 đã công bố (Mã truy cập Genbank. CP001001 - CP001009), mà có độ tương đồng về ADN ribosom 16S và trình tự tổng số bằng 99%. Sử dụng công cụ tra cứu độ tương đồng trình tự Blast với các trình tự protein *nifH* của *K. pneumonia* làm các protein truy vấn có mối liên hệ di truyền xa, Mã truy cập Genbank. YP_001755485.1 và YP_001754523.1 mà có độ tương đồng axit amin bằng khoảng 35% và được dự đoán là để mã hóa lần lượt clophylit reductaza sắt protein tiểu đơn vị X và protoclophylit reductaza sắt-lưu huỳnh protein gắn kết ATP. Độ tương đồng giữa gen *nifH* của *K. pneumonia* và gen *nifH* của vi khuẩn lam *cyanobacteria* thấp hơn nhiều (Mã truy cập Genbank.ACC79194.1). Bộ gen này rõ ràng cũng không chứa cụm gen *nif*. Trình tự SEQ ID NO.7 mã hóa gen tiến hóa thẳng *nifH* giả định. Ngạc nhiên là các trình tự mã hóa liên kề giả định cho các protoclophylit reductaza tiểu đơn vị gần như tương đồng với *nifD* và *nifE* (Fig.5). Do *Methylobacterium* sp. L2-4 có khả năng cố định đạm, nên các gen này có thể rất quan trọng cho sự cố định đạm ở vi khuẩn hướng methyl *Methylobacterium*.

Ví dụ 15

Tác dụng của EPS đến hoạt tính cố định đạm của chủng *Enterobacter*

Các chủng đột biến mất khả năng cố định đạm được xác định bằng quá trình đột biến Tn5. Các chủng đột biến EPS được xác định dưới dạng các khuẩn lạc nhỏ không di động trong môi trường rắn không chứa nitơ. Toàn bộ các chủng đột biến EPS có hoạt tính nitrogenaza không đáng kể như được xác định bằng thử nghiệm khử axetylen (AR). Các chủng đột biến được thể hiện trong Bảng 8.

Bảng 8

Đột biến EPS

Mã đột biến	Gen được chèn	Trình tự đoạn ranh giới Tn5 (SEQ ID NO.)
S238	Axit colanic polymeraza	cgttaatctcaatttggctcagcatcaaacagtttgggtat (5)

S236	Đột biến mất đoạn gen EPS	gcgttgccccaggggatgtgctgaacgtaaccgtg (6)
S210	Axit colanic axetyltransferaza WcaF	ccccgcaggtgctgtatcgctggcgcgcat (7)
S237	GDP-L-fucoza synthetaza	ctggtgctgctgttccccgcgaggagctgaacc (8)
S300	Sinh tổng hợp axit colanic UDP-chất mang lipid glucoza transferaza WcaJ	cgtctgaacggtgaatcgcggcacgacgagga (9)

Ví dụ 16

Giải trình tự bộ gen và khuếch đại gen ARN ribosom 16S

ADN bộ gen được chiết xuất theo quy trình chuẩn (Wilson, 1997), tinh chế bằng cột DNeasy mini spin (Qiagen Cat. No.: 69106) và giải trình tự bằng kỹ thuật FLX Titan (GS-FLX Titanium) tại MacroGen (Republic of Korea). Quá trình giải trình tự bằng súng bắn gen và giải trình tự từ hai đầu gen (mate-pair end sequencing) (3kb) được thực hiện và quá trình lắp ráp các đoạn trình tự chính xác (quality filtered reads) được thực hiện bằng phần mềm GS De Novo (v 2.6). Gen ARN ribosom 16S được khuếch đại bằng các đoạn mồi 27F và 1492R (DeLong, 1992). Các điều kiện PCR là như sau: biến tính ban đầu 95°C trong 10 phút; 95°C trong 1,5 phút trong 30 chu kỳ, 55°C trong 1,5 phút và 72°C; trong 1,5 phút và tổng hợp ở 72°C trong 10 phút. Các sản phẩm PCR được gắn vào vector plasmid pGEM-T Easy (Promega, Madison, USA) và biến nạp vào tế bào hoạt lực mạnh *Escherichia coli* XL-Blue bằng cách sử dụng hệ vector pGEM-T Easy (Promega). Sau đó, các chủng vi khuẩn đã được biến nạp này được nuôi cấy qua đêm ở nhiệt độ 37°C trên các đĩa thạch chứa môi trường Luria-Bertani (LB) chứa ampicilin (100µg/mL, các chủng vi khuẩn đã được biến nạp dương tính được nuôi cấy qua đêm trong môi trường lỏng LB. Các plasmid được thiết kế bằng kỹ thuật QIAprep Miniprep (Qiagen). Trình tự của các gen ARN ribosom 16 S thu được bằng cách sử dụng các đoạn mồi 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTC-3'; SEQ ID NO.15), 1492R (5'-TACCTTGTTACGACTT-3'; SEQ ID NO.16), 785F (5'-GGATTAGATACCCTGGTA-3'; SEQ ID NO.17), 518R (5'-GTATTACCGCGGCTGCTGG-3'; SEQ ID NO.18), 1100R (5'-GGGTTGCGCTCGTTG-3'; SEQ ID NO.19) và các trình tự nucleotit của chúng được xác định bằng máy giải trình tự ADN Applied Biosystems 3730 XI (AB Applied Biosystems, HITACHI). Các trình tự ARN ribosom 16S này được sắp hàng bằng chương trình Megalign do DNASTAR cung cấp. Độ tương đồng trình tự được phân tích bằng phần mềm EzTaxon server (<http://www.eztaxon.org/>; Chun et al., 2007).

Ví dụ 17

Tác dụng của các chủng *Enterobacter* và chủng *Methylobacterium* đối với cây cọ dầu

Các cây cọ dầu lai nội dòng được trồng vào các chậu đất không vô trùng được bón bằng cách đổ vào đất chủng *Enterobacter* R4-368 hoặc phun cho đến khi thấm ướt lá chủng *Methylobacterium* sp L2-4. Các cây cọ dầu được sinh trưởng trong điều kiện không khí ngoài trời. So với các cây cọ dầu được bón với phân bón giả, chiều cao cây cọ dầu đã được cải thiện đáng kể khi được bón với cả hai chủng vi khuẩn này. Toàn bộ các cây được bón với cả hai chủng vi khuẩn này đều có số lượng lá cao hơn đáng kể (Bảng 8). Các kết quả này tương đương với số lượng vi khuẩn nội ký sinh thực vật cao ở rễ và trên bề mặt lá (Bảng 10).

Bảng 9

Chiều cao cây và số lượng lá cây cọ dầu sau 150 ngày bón

Chiều cao cây												
Mã số cây.	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Giá trị P
Cây được bón với phân bón giả	60	55	56	35	61	54	59	60	55	55,00	7,94	
L2-4	42	55	52	69	53	68	57	67	51	57,11	9,16	
R4-368	57	54	58	65	61	61	60	69	59	60,44	4,42	0,09
L2-4+R4-368	56	63	66	68	48	61	69	65	71	63,00	7,21	0,04
Số lượng lá												
Mã số cây.	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	Trung bình	Độ lệch chuẩn	
Cây được bón với phân bón giả	10	10	9	11	10	10	11	10	10	10,11	0,60	
L2-4	12	13	13	13	13	12	12	13	13	12,67	0,50	0,0005
R4-368	11	11	12	12	12	12	12	11	11	11,56	0,53	0,0005
L2-4 và R4-368	13	13	11	12	12	12	12	11	11	11,89	0,78	0,0005

Bảng 10

Số lượng vi khuẩn cố định đạm sau 150 ngày bón

	Quần thể vi khuẩn ở rễ ¹		Quần thể vi khuẩn ở lá ²	
Chủng vi khuẩn được sử dụng	CFU/g	Độ lệch chuẩn	CFU/cm ²	Độ lệch chuẩn
Cây được bón với phân bón giả	1,27 x10 ⁶	0,20	0	0
L2-4	Nd		7,33	0,88
R4-368	3,68 x10 ⁶	0,05	Nd	
L2-4 và R4-368	1,85 x10 ⁷	0,22	8,00	1,73

Chú thích: ¹: rễ được vô trùng bề mặt trước khi bón. ²: bề mặt lá phía trên không được vô trùng được phủ lên các đĩa thạch aga và các khuẩn lạc màu đỏ được đếm 3 ngày sau khi bón ở nhiệt độ 30°C.

Ví dụ 18

Tác dụng của gen cố định đạm đến sự kích thích tăng trưởng và hàm lượng nitơ ở lá

Đột biến mất đoạn các gen *nifH*, *nifD* và *nifK* được tạo ra ở vi khuẩn nội ký sinh thực vật *Enterobacter* R4-368 bằng cách điện di gen cấu trúc mất đoạn tương ứng chứa các trình tự ranh giới có chiều dài khoảng 1kb được dung hợp ở cả hai đầu của gen nhảy kích thước nhỏ Tn5 tổng hợp (gen kháng kanamycin). Các đột biến mất đoạn được kiểm chứng bằng phương pháp PCR và phương pháp lai Southern. Các chủng đột biến và chủng thể tự nhiên này được bón vào hệ rễ của các cây dầu mè thu được từ hạt giống đã được khử trùng bề mặt của cây dầu mè và trồng trong chậu chứa hỗn hợp cát vô trùng và vermiculit theo tỷ lệ 1:1. Quá trình bón được thực hiện bằng cách tưới 100mL hỗn dịch tế bào (OD_{600nm} bằng khoảng 1,0 trong nước) vào mỗi chậu. Các cây dầu mè được sinh trưởng trong điều kiện không khí ngoài trời trong nhà kính. Chiều cao cây, số lượng lá và sinh khối khô được đo sau 45 ngày bón. Hàm lượng nitơ trong sinh khối lá khô (khoảng 2mg) từ 4 cây dầu mè cũng được định lượng theo phương pháp Elementar Vario Micro Cube (ELEMENTAR Analysensysteme, Germany). Như được thể hiện trong Bảng 11, toàn bộ các chủng đột biến mất đoạn có cùng chiều cao cây, số lượng lá, sinh khối và hàm lượng nitơ so với các cây dầu mè được bón với phân bón giả, trong khi các đặc tính này đã được cải thiện đáng kể ở các cây dầu mè được bón với chủng thể tự nhiên *Enterobacter* sp. R4-368.

Bảng 11

Tác dụng của gen đột biến mất đoạn *nifHDK* đến chủng *Enterobacter* sp. R4-368 sau 45 ngày bón

Chủng	Chiều cao cây (cm)*	Số lượng lá*	Sinh khối chồi (g)*	Sinh khối rễ (g)*	Hàm lượng nitơ trong lá (%) [#]
Chủng tự nhiên	34,0 ± 5,8	10,0 ± 2,4	7,1 ± 0,7	1,4 ± 0,1	1,968 ± 0,323
<i>nifHA</i>	25,3 ± 4,5	8,1 ± 1,2	4,1 ± 1,3	0,7 ± 0,1	1,055 ± 0,013
<i>nifDA</i>	23,1 ± 4,5	7,1 ± 1,2	4,4 ± 0,4	0,6 ± 0,1	0,878 ± 0,019
<i>nifKA</i>	22,6 ± 3,9	7,3 ± 1,3	4,4 ± 0,5	0,8 ± 0,1	1,263 ± 0,025
Phân bón giả	17,9 ± 1,3	6,1 ± 1,2	2,6 ± 0,5	0,6 ± 0,0	0,903 ± 0,025

Chú thích: * n = 7; # n = 4

Ví dụ 19

Tác dụng của cụm gen EPS đến sự tăng trưởng thực vật

Vỏ hạt của cây dầu mè (giống MD-44) được loại bỏ, nhân hạt được khử trùng bằng etanol 75% (thể tích/thể tích) trong 1 phút, sau đó bằng nước oxy già 10% (thể tích/thể tích) trong 60 phút, tiếp theo rửa năm lần liên tiếp bằng nước cất vô trùng và ngâm vào nước cất vô trùng qua đêm ở nhiệt độ 28°C trong bóng tối. Các phôi không có nội nhũ được nảy mầm trong môi trường không chứa hormon (1/2 muối MS, Vitamin B5, 5g/L sucroza, 0,5g/L MES và 2,2g/L phytigel, độ pH = 5,6) và nuôi cấy trong phòng nuôi cấy mô ở nhiệt độ 25°C ± 2°C trong điều kiện 16 giờ chiếu sáng (100µmol/m²)/8 giờ trong bóng tối. Các chủng vi khuẩn được sử dụng bao gồm chủng *Enterobacter* sp. R4-368 thể tự nhiên, chủng đột biến Tn5 300 chứa gen nhảy Tn5 trong cụm gen EPS và tạo ra rất ít EPS và chủng đột biến mất đoạn toàn bộ cụm gen EPS. Các chủng đột biến và thể tự nhiên được bón vào hệ rễ của các cây dầu mè thu được từ hạt giống của cây dầu mè đã được khử trùng bề mặt và trồng vào chậu chứa hỗn hợp cát vô trùng và vermiculit theo tỷ lệ 1:1. Quá trình bón được thực hiện bằng cách tưới 100mL hỗn dịch tế bào (OD_{600nm} = 1,0 trong nước) vào mỗi chậu. Các cây dầu mè được sinh trưởng trong điều kiện không khí ngoài trời trong nhà kính kết hợp tưới nước và các dung dịch dinh dưỡng thường xuyên. Cả chủng đột biến Tn5 lẫn chủng đột biến mất đoạn gen EPS đã làm giảm đáng kể chiều cao cây và sinh khối (p<0,05; Bảng 12).

Bảng 12

Tác dụng của chủng *Enterobacter* hoặc gen EPS đến sự kích thích tăng trưởng của cây dầu mè

Chủng	Chiều cao cây (cm) ¹	Sinh khối khô (g) ²	
		Chồi	Rễ
Chủng <i>Enterobacter</i> sp. R4-368	28,1 ± 2,90	9,50 ± 0,57	1,74 ± 0,04
Chủng đột biến mất đoạn gen EPS 130-1	24,9 ± 2,90	6,75 ± 0,76	1,15 ± 0,17
Chủng đột biến sTn5 S300	26,0 ± 1,50	6,90 ± 0,31	1,14 ± 0,12
Cây được bón với phân bón giả	23,3 ± 2,30	7,57 ± 0,30	0,96 ± 0,20

Chú thích: Mỗi trị số được tính bằng trị số trung bình và độ lệch chuẩn của 7 cây dầu mè; ¹: sau 30 ngày ủ; ²: sau 45 ngày ủ.

Thuật ngữ “một”, “duy nhất” và “cái này” và các thuật ngữ tương tự được dùng trong bản mô tả (đặc biệt là trong bộ yêu cầu bảo hộ) để chỉ các danh từ số ít lẫn số nhiều,

trừ khi có quy định khác hoặc trừ khi có chỉ dẫn khác. Thuật ngữ “bao gồm”, “có”, “có chứa” và “chứa” được xem là các thuật ngữ “khoảng trị số” được dùng trong bản mô tả chỉ nhằm mục đích thể hiện cách viết tắt đề cập đến từng trị số riêng biệt thuộc khoảng trị số đó, trừ khi có quy định khác, và mỗi trị số riêng biệt được kết hợp vào bản mô tả nếu nó được viện dẫn. Ví dụ, nếu khoảng trị số từ 10 đến 15 được bộc lộ, thì các trị số 11, 12, 13, và 14 cũng được bộc lộ. Toàn bộ các phương pháp được thể hiện trong bản mô tả này có thể được thực hiện theo cách thức thích hợp bất kỳ trừ khi có quy định khác hoặc trừ khi có chỉ dẫn khác. Việc sử dụng bất kỳ và tất cả các ví dụ, hoặc ngôn ngữ (ví dụ “như”) được đề xuất trong bản mô tả, chỉ nhằm mục đích thể hiện chứa không giới hạn phạm vi của sáng chế, trừ khi có quy định khác. Không có ngôn ngữ trong bản mô tả này được hiểu là chỉ ra bất kỳ yếu tố không cần yêu cầu bảo hộ là cần thiết cho việc thực hành theo sáng chế. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng các phương pháp và chế phẩm theo sáng chế có thể được kết hợp ở dạng nhiều phương án và chỉ một vài trong số các phương án này được thể hiện trong bản mô tả. Các phương án theo sáng chế theo sáng chế, bao gồm các phương án tốt nhất để thực hiện sáng chế. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này hiểu rằng biến thể của các phương án này có thể được tạo ra dựa trên bản mô tả sáng chế. Các tác giả sáng chế hy vọng người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ sử dụng các thay đổi thích hợp, và sáng chế sẽ được thực hiện theo các phương án khác với các phương án cụ thể được thể hiện trong bản mô tả này. Theo đó, trừ khi có quy định khác hoặc chỉ dẫn khác sáng chế này bao gồm tất cả các thay đổi và biến đổi tương đương của đối tượng nêu trong bộ yêu cầu bảo hộ kèm theo do được pháp luật cho phép áp dụng. Hơn nữa, sự kết hợp bất kỳ của các yếu tố trên trong tất cả các biến thể của nó đều nằm trong phạm vi của sáng chế.

Tài liệu tham khảo

Antoun H, Beauchamp CJ, Goussard N, Chabot R, Lalande R: Potential of Rhizobium and Bradyrhizobium species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: Effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). *Plant and Soil* 1998, 204(1):57-67.

Baldani JJ, Reis VM, Baldani VLD, Döbereiner J: Review: A brief story of nitrogen fixation in sugarcane- reasons for success in Brazil. *Functional Plant Biology* 2002, 29(4):417-423.

Baldani VLD, Döbereiner J: Host-plant specificity in the infection of cereals with *Azospirillum* spp. *Soil biology and biochemistry* 1980, 12(4):433-439.

Barac T, Taghavi S, Borremans B, Provoost A, Oeyen L, Colpaert JV, Vangronsveld J, Van Der Lelie D: Engineered endophytic bacteria improve phytoremediation of water-soluble, volatile, organic pollutants. *Nature biotechnology* 2004, 22(5):583-588.

Barton PK, Atwater JW: Nitrous Oxide Emissions and the Anthropogenic Nitrogen in Wastewater and Solid Waste, vol. 128: ASCE; 2002.

Boddey R, Oliveira OC, Urquiaga S, Reis V, Olivares FL, Baldani V, Döbereiner J: Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: contributions and prospects for improvement. *Plant and Soil* 1995, 174(1):195-209.

Borthakur D, Barber C, Lamb J, Daniels M, Downie J, Johnston A: A mutation that blocks exopolysaccharide synthesis prevents nodulation of peas by *Rhizobium leguminosarum* but not of beans by *R. phaseoli* and is corrected by cloned DNA from *Rhizobium* or the phytopathogen *Xanthomonas*. *Molecular and General Genetics MGG* 1986, 203(2):320-323.

Chaintreuil C, Giraud E, Prin Y, Lorquin J, Ba A, Gillis M, De Lajudie P, Dreyfus B: Photosynthetic bradyrhizobia are natural endophytes of the African wild rice *Oryza breviligulata*. *Applied and environmental microbiology* 2000, 66(12):5437.

Chang MCY: Harnessing energy from plant biomass. *Curr Opin Chem Biol* 2007, 11(6):677-684.

Chun, J.S., Lee, J.H., Jung, Y.Y., Kim, M.J., Kim, S., Kim, B.K., Lim, Y.W. (2007) EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 57, 2259-2261.

Crutzen PJ, Mosier AR, Smith KA, Winiwarter W: N₂O release from agro-biofuel production negates global warming reduction by replacing fossil fuels. *Atmospheric Chemistry and Physics* 2008, 8(2):389-395.

Delong, E.F. (1992) Archaea in coastal marine environments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 5685-5689.

Dreyfus B, Dommergues Y: Nitrogen-fixing nodules induced by Rhizobium on the stem of the tropical legume Sesbania rostrata. *FEMS Microbiology Letters* 1981, 10(4):313-317.

Eaglesham A, Szalay A: Aerial stem nodules on Aeschynomene spp. *Plant Science Letters* 1983, 29(2-3):265-272.

Elbeltagy A, Nishioka K, Sato T, Suzuki H, Ye B, Hamada T, Isawa T, Mitsui H, Minamisawa K: Endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a Herbaspirillum sp. isolated from wild rice species. *Applied and environmental microbiology* 2001, 67(11):5285-5293.

Fairless D: Biofuel: The little shrub that could - maybe. *Nature* 2007, 449:652-655.

Galloway JN, Townsend AR, Erisman JW, Bekunda M, Cai Z, Freney JR, Martinelli LA, Seitzinger SP, Sutton MA: Transformation of the nitrogen cycle: recent trends, questions, and potential solutions. *Science* 2008, 320(5878):889-892.

Gaydou AM, Menet L, Ravelojaona G, Geneste P: Vegetable energy sources in Madagascar: ethyl alcohol and oil seeds. *Oleagineux* 1982, 37((3)):135-141.

Gottfert M, Rothlisberger S, Kundig C, Beck C, Marty R, Hennecke H: Potential symbiosis-specific genes uncovered by sequencing a 410-kilobase DNA region of the Bradyrhizobium japonicum chromosome. *Journal of bacteriology* 2001, 183(4):1405.

Jourand P, Giraud E, Bena G, Sy A, Willems A, Gillis M, Dreyfus B, de Lajudie P: Methylobacterium nodulans sp. nov., for a group of aerobic, facultatively methylotrophic, legume root-nodule-forming and nitrogen-fixing bacteria. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 2004, 54(6):2269-2273.

Jourand P, Renier A, Rapior S, de Faria SM, Prin Y, Galiana A, Giraud E, Dreyfus B: Role of methylotrophy during symbiosis between Methylobacterium nodulans and Crotalaria podocarpa. *Molecular plant-microbe interactions* 2005, 18(10):1061-1068.

Kaneko T, Nakamura Y, Sato S, Asamizu E, Kato T, Sasamoto S, Watanabe A, Idesawa K, Ishikawa A, Kawashima K: Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium Mesorhizobium loti. *DNA research* 2000, 7(6):331-338.

Kennedy IR, Pereg-Gerk LL, Wood C, Deaker R, Gilchrist K, Katupitiya S: Biological nitrogen fixation in non-leguminous field crops: Facilitating the evolution of an effective association between *Azospirillum* and wheat. *Plant and Soil* 1997, 194(1):65-79.

Liu Y, Wang H, Sun X, Yang H, Wang Y, Song W: Study on mechanisms of colonization of nitrogen-fixing PGPB, *Klebsiella pneumoniae* NG14 on the root surface of rice and the formation of biofilm. *Curr Microbiol* 2011, 62(4):1113-1122.

Long SR: Rhizobium symbiosis: nod factors in perspective. *The Plant Cell* 1996, 8(10):1885.

Madhaiyan M, Poonguzhali S, Senthilkumar M, Seshadri S, Chung HY, Yang JC, Sundaram SP, Sa TM: Growth promotion and induction of systemic resistance in rice cultivar Co-47 (*Oryza sativa* L.) by *Methylobacterium* spp. *Bot Bull Acad Sin* 2004, 45:315-324.

Maxwell CA, Hartwig UA, Joseph CM, Phillips DA: A chalcone and two related flavonoids released from alfalfa roots induce nod genes of *Rhizobium meliloti*. *Plant physiology* 1989, 91(3):842.

Melillo JM, Reilly JM, Kicklighter DW, Gurgel AC, Cronin TW, Paltsev S, Felzer BS, Wang X, Sokolov AP, Schlosser CA: Indirect Emissions from Biofuels: How Important? *Science* 2009, 326(5958):1397-1399.

Moir JWB: Nitrogen cycling in bacteria: molecular analysis: Caister Academic Press; 2011.

Openshaw K: A review of *Jatropha curcas*: an oil plant of unfulfilled promise. *Biomass Bioenergy* 2000, 19(1):1-15.

Pedraza RO: Recent advances in nitrogen-fixing acetic acid bacteria. *Int J Food Microbiol* 2008, 125(1):25-35.

Peters NK, Frost JW, Long SR: A plant flavone, luteolin, induces expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. *Science* 1986, 233(4767):977.

Pinto-Tomás AA, Anderson MA, Suen G, Stevenson DM, Chu FST, Cleland WW, Weimer PJ, Currie CR: Symbiotic Nitrogen Fixation in the Fungus Gardens of Leaf-Cutter Ants. *Science* 2009 326(5956):1120-1123.

Rediers H, Vanderleyden J, De Mot R: *Azotobacter vinelandii*: a *Pseudomonas* in disguise? *Microbiology* 2004, 150(5):1117-1119.

Renier A, De Faria SM, Jourand P, Giraud E, Dreyfus B, Rapior S, Prin Y: Nodulation of *Crotalaria podocarpa* DC. by *Methylobacterium nodulans* displays very unusual features. *Journal of Experimental Botany* 2011, 62(10):3693-3697.

Saravanan VS, Madhaiyan M, Osborne J, Thangaraju M, Sa TM: Ecological occurrence of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and nitrogen-fixing *Acetobacteraceae* members: their possible role in plant growth promotion. *Microb Ecol* 2008, 55(1):130-140.

Senthilkumar M, Madhaiyan M, Sundaram S, Kannaiyan S: Intercellular colonization and growth promoting effects of *Methylobacterium* sp. with plant-growth regulators on rice (*Oryza sativa* L. Cv CO-43). *Microbiological research* 2009, 164(1):92-104.

Stacey G, So JS, Lakshmi SKB, Carlson RW: A lipopolysaccharide mutant of *Bradyrhizobium japonicum* that uncouples plant from bacterial differentiation. *Molecular plant-microbe interactions* 1991, 4(4):332-340.

Wilson, K. (1997). Preparation of genomic DNA from bacteria, p. 2.4.1-2.4.5. In F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith and K. Struhl (ed.), *Current Protocols in Molecular Biology*. J. Wiley & Sons, New York, N.Y.

Whittenbury R, Phillips K, Wilkinson J: Enrichment, isolation and some properties of methane-utilizing bacteria. *Journal of General Microbiology* 1970, 61(2):205.

Widmer F, Shaffer BT, Porteous LA, Seidler RJ: Analysis of *nifH* gene pool complexity in soil and litter at a Douglas fir forest site in the Oregon cascade mountain range. *Appl Environ Microbiol* 1999, 65(2):374-380.

Young J, Johnston A: The evolution of specificity in the legume-Rhizobium symbiosis. *Trends in Ecology & Evolution* 1989, 4(11):341-349.

Zehr JP: Nitrogen fixation by marine cyanobacteria. *Trends in microbiology* 2011, 19(4):162-173.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110>	TEMASEK LIFE SCIENCES LABORATORY LIMITED	
<120>	CHẾ PHẨM VI SINH VÀ PHƯƠNG PHÁP CẢI THIỆN NĂNG SUẤT THỰC VẬT	
<130>	2577-211PCT	
<150>	US 61/613,579	
<151>	2012-03-21	
<160>	19	
<170>	PatentIn version 3.5	
<210>	1	
<211>	26	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Đoạn mỗi oligonucleotit PCR	
<400>	1	
	aaaggygwa tcggyaartc caccac	26
<210>	2	
<211>	26	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Đoạn mỗi oligonucleotit PCR	
<400>	2	
	ttgttsgcsg crtacatsgc catcat	26
<210>	3	
<211>	13163	
<212>	ADN	
<213>	Enterobacter sp R4-368	
<400>	3	
	atgaccatgc gtcaatgcgc catttacggc aaaggtggga tcggcaaatc gaccaccaca	60
	cagaacctgg tcgccgcgct ggcggagatg ggtaaaaaag taatgattgt cggctgcgat	120
	ccgaaagccg actccacgcg tttgatcctg catgcgaaag cgcagaacac cattatggag	180
	atggctgctg aagttggctc cgtggaagac ctggaattag aagacgtgct gcaaatcggt	240
	tacggcgggc tgcgctgcgc agaatccggc ggtccggagc caggcgtggg ttgtgccggt	300
	cgtgggggtg tcaccgcgct taacttcctc gaagaagaag gcgcttacgt gccggatctc	360
	gattttgttt tctacgacgt aatgatccac tttgttcccc gctggtatgc gtggtttcgc catgccgatt	420
	cgtgaaaaca aagcgcagga gatctacatc gtttgcctcgc gcgaaatgat ggcatgtac	480
	gctgccaata acatctccaa aggcacatcgt aagtatgccaa aatccggcaa agtgcgcctc	540
	ggcggggctg tttgtaactc gcgccagacc gaccgtgaag atgagctcat cattgcgctg	600
	gcagaaaaac tcggcagcca aatgatccac tttgttcccc gcgacaacat tgtgcagcgt	660
	gcggaaatcc gccgtatgac ggttatcgaa tatgaccgca cctgcaatca ggcaaatgaa	720
	tatcgagacc ttgacgagca aatcgtcaac aacacccaaa tgggtggcgcc caccctctgc	780
	accatggatg agctggaagc gctgctgatg gagttcggca ttatggatgt ggaagacacc	840
	agcatcattg gtaaaaccgc cgccgaagaa aacggcctct gatcacagga gcacacccat	900
	gagcaatgca acaggcgaac gtaacctgga gataatcgag cagggtgctgg aggttttccc	960
	ggagaagacg cgcaagaac gcagaaaaaca catgatggtg acggaccggc agcaggaaag	1020
	cgctcggtaa tgcatcatct ctaaccgcaa atcgagccgc ggcgtgatga ccgtgcgcgg	1080
	ctgctcggtat gccgatcgca aagggtggtt atttgggcca atcaaggata tggcgcatat	1140
	ctcccacggc ccgatcggtc gcgggcagta ctcccgccgc gggcgacgta actactacac	1200
	cgggctcagc ggctgggaca gcttcggcac gctcaacttc acctccgatt ttcaggagcg	1260
	tgacatcgct tttggcgccg acaaaaagct cgccaaactg attgaagagc tggaagtgtc	1320
	attcccgctg accaaaggca tttcgattca gtcggaatgc ccggctcggc tgattggcga	1380
	tgacattgag gccgtcgcga acgccagtcg taaagccatc aacaaaccgg ttattccggt	1440
	gcggtgcgaa ggctttcgcg gcgtgtcgca atccctcggt caccatattg ctaacgatgt	1500
	gatccgcgac tgggtgctgg agaaccgcga aggcaaacgg ttcgaatcca ccccttacga	1560
	tgtggcgcat atcgccgatt acaacatcgg cggcgatgcc tgggcttcgc gcattttgct	1620
	cgaagagatg ggcttgcggg tgggtggcgca atggtccggc gacggtacgc tgggtggagat	1680
	ggagaacacg ccgttcgtca aactcaacct ggtgcactgc taccgctcaa tgaactacat	1740
	ctcgcgccat atggaggaga agcacggtat tccgtggatg gaatacaact tctttggccc	1800
	gacgaaaatt gcggaatcgc tgcgcaaat cgccgaccag tttgacgaca ccattcgccg	1860
	caacgccgaa gcggtgatcg cccgatacca ggcgcagaac gacgccatta tcgccaaata	1920
	tcgccaccgt ctggagggtc gcaaggtgct gctttatatg ggcgggttgc gtccgcgcca	1980
	tgtgattggc gcctatgaag acctgggaat ggagatcatc gcagccgggt atgagttcgc	2040
	tcataacgat gattacgacc gcaccctgcc ggatctgaaa gagggcacgc tgctgtttga	2100
	tgatgccagc agctatgagc tggaggcatt cgtcaacgcg ctgaaaccgg atctcatcgg	2160
	ttccggcatc aaagagaagt acatctttca gaaaatgggc gtgccgtttc gccagatgca	2220
	ctcctgggat tactccggcc cgtaccacgg ctatgacggc ttcgccatct tcgcccgca	2280
	tatggatagc acgctcaaca accccgcgtg gggccagttg accgcgccgt ggctgaaatc	2340
	cgctgattt ttatcctgtt atcccgtttg ttcaccgatt tgtggcgcgg gaggagaaca	2400
	ccatgagcca gactgctgag aaaatacaga attgccatcc cctgtttgaa caggatgctt	2460
	accagacgct gtttgccggt aaacgggcac tcgaagaggc gcaactcggc gagcgggtgc	2520
	aggaaagttt tcaatgggacc accaccggc aatacgaagc gctgaacttc aaacgcgaag	2580
	cgctgactat cgaccgggca aaagcctgcc agccgctggg cgcggtgctc tgttcgctgg	2640
	ggtttgccaa cacctgcca tatgtgcacg gttcacaagg ttgctgggcc tatttccgta	2700
	catactttaa ccgccaactc aaagaaccgg tggcctcgct gtcggattca atgacggaag	2760
	atgcggccgt ttctggcggg aataacaacc tcaataccgg gctacaaaac gccagcgccg	2820
	tgtataaacc ggagattatc gccgtctcta ccacctgtat ggccggaggta atcgcgcatg	2880
	acttgcaggc ttttatcgcc aacgctaaaa aagatggttt tcttgatgcc gccatccccg	2940
	tgcctacgc gcacaccccc agttttatcg gcagccatat caccggctgg gacaacatgt	3000

ttgaagggtt	tgccgtacc	tttacggcag	accatcaggc	acagcccggt	aaactttcac	3060
gcatcaacct	ggtgaccggg	tttgaacct	atctcggcaa	ttttcgcgtg	ctgaaacgca	3120
tgatggaaca	aatggagggtg	caggcgagtg	tgctctccga	tccatcagaa	gtgctggata	3180
cccctgctaa	cgggcattac	cagatgtacg	cgggcgggac	gacgcagcaa	gagatgcgcg	3240
aggcgccgga	cgctatcgac	acactgctgc	tgcaaccttg	gcaactgggtg	aaaagcaaaa	3300
aagtgggtaca	ggagatgtgg	aatcagcccg	ccaccgaggt	ttctgttccc	gttgggctgg	3360
caggaacgga	tgaactattg	atggcgatca	gtcagttaac	cggcaaggcc	attcccgact	3420
cgctggcgct	ggagcgcggg	cggctggtcg	atatgatgct	cgactcccac	acctggctgc	3480
acggtaaaaa	attcggctcg	tttggcgacc	cggattttgt	catgggattg	acccgtttcc	3540
tgctggagct	gggtgcgaa	ccgaccgtta	tcctctgcc	taacggtaac	aagcgtggc	3600
agaaagcgat	gaagaaaatg	ctcgacgcct	caccgtacgg	ccaggagagc	gaagtattta	3660
tcaactgcga	tttgtggcat	ttccgctcgc	tgatgtttac	ccgccagccg	gactttatga	3720
ttggcaacct	acacggcgac	tttattcagc	gcgacacctt	agccaagggt	gaacagtttg	3780
aagttccgct	gatccgcctc	ggttttcccc	tgttcgaccg	ccaccatctg	caccgccaga	3840
ccacctgggg	ttatgagggc	gccatgagca	ttctcactac	ccttgtgaat	gcggtactgg	3900
agaaagtaga	caaagagacc	atcaagctcg	gcaaaaccga	ctacagcttc	gatcttatcc	3960
gttaacctac	acacgcccgc	cgcacgcgg	ggccagggag	gctctatgcc	ggtcattatt	4020
cttcgccagc	gcggcgcgga	tctctattgc	tatatcgca	aacaggatct	ggaagcccg	4080
gtgttacagg	ttgaacacga	cacgcgcgaa	cactggggcg	gcgcgcttga	acttgaagg	4140
ggacgcccgt	attacgtcaa	tctgcaaccc	ggccgcccgg	cttttccgct	cagcctgcgc	4200
gccaccgcgc	acgcgcgcgc	ataaggaggt	gagcaatgtc	cgacaacgat	acgctgttct	4260
ggcggatgct	ggcgtgttt	cagtgcctgc	cggagctgca	acccgcgcaa	atcatggcct	4320
ggctcaccca	cagttgtgag	gacgtgctga	caccgcagcg	gctggcagca	ctcgaattac	4380
cgcaactgga	agcccggttt	ccgtatgcgg	aagccctgat	gtccagtggc	cgctgggcgc	4440
gggttaaagg	acgcgtccgc	gcgcaactgc	ctgccattt	gcaggtgcag	gaaacccaaa	4500
gccgcgctcc	acaattggtt	gtcgccttct	gctcacagga	tgggctcacc	atcaatggct	4560
atttcggcca	ggggcgactt	ttctttattt	acgggtttga	tgaccagggc	ggctggctcc	4620
atgatttgcg	ccgtaccctt	tctcaccgcg	aaaaccagga	accgaatgaa	atccgcgcgc	4680
agttactcca	cgaactgcct	ttgtgtttt	gtgaagcgat	cggcgcccg	gcagccgcac	4740
ggctaattcg	tcataatatt	caccgcgatga	aagtgtcacc	gggcaatacc	attttgtccc	4800
agtgcgcgcg	catccagaac	ctgctggccg	ggccgttacc	gccgtggctg	gcgaaacggc	4860
tggaaacgcg	taatccgctg	gaagcgcggg	tgttttaaac	cgccccctga	tggggcgctt	4920
ttttggcgtg	ggcattgcgc	caattgtctg	ttttgtcaca	aagcgacaaa	cacttttccc	4980
ttaaaaaatca	atcactattt	tctggcttgc	gatttgacc	attaacacta	acccaaccag	5040
aaaatgaggt	gatgatgaag	gggaacgaca	tcctggccct	gctcgatgaa	ccggcctgtg	5100
agcataacca	taaacagaaa	tccggctgta	gcgcgccaaa	acccggtgcg	actgccggag	5160
gctgcgcctt	cgaaggcgca	cagatcaccc	tgctgccact	ttccgatgtg	gcgcactctg	5220
tacatggccc	gattggctgc	gccggtagct	catgggataa	ccgcggcagc	ctgagttccg	5280
gccacgggat	caaccggctc	ggattcacca	ccgatttgaa	cgagcaggat	gtcatcatgg	5340
ggcgtggcga	gcgtcggtcg	tttcacgcgg	tgccgccacat	tgctcgaccgc	tatcatccgg	5400
cggcggtatt	tatttataac	acctgcgttc	cggcaatgga	aggcgatgat	attgaagccg	5460
tctgccaggc	cgcagcgacc	gccaccggtg	tgcccgtgat	tgccgttgat	gtggccggtt	5520
tttacggtag	caaaaacctg	gggaaccgcc	tgccggcgga	ggtgatgggt	aaaaaagtca	5580
ttggcgggcg	cgaacccgcg	ccgtggccgg	acaatacgcc	ttttgccccg	gcgcaccgtc	5640
atgacattgg	ccgtattggt	gaatttaata	tcgccggcga	gttctggcat	atccagccgc	5700
tgettgtatg	gctgggcatc	gcgtccctgc	gctccctgtc	cggcgacggg	cgctttgccc	5760
agatccagac	gctgcaccgc	gcgcaggtea	atatgctggt	ttgctccaga	gcgctgatta	5820
atgtgcggag	atcgttgga	cagcgttacg	gcacgcccgt	gtttgaaggc	agtttttatg	5880
gcgttcgcgc	cacttctgat	gccctgcgcc	agctggcaac	gctcaccggc	gatagcgatt	5940
taatggcgcg	caccgaacgc	ctaatcacgc	gtgaagaaca	cgcagcagag	caggcgctgg	6000
caccgctgcg	cgaacgttta	cgcggcagga	aagtgttgct	ctataccggt	ggcgttaaat	6060
cctggtcggt	agtttcggca	ctgcaggatc	tcggcatgac	ggttgtggct	accggaacgc	6120
gcaaatccac	cgaagaggat	aaacagcgca	tccgtgaact	gatgggcatg	gacgccatca	6180
tgctggatga	aggcaatgcc	cgcgccctgc	tggtatgggt	ttatcgtctg	aaagccgaca	6240
tgatgatcgc	aggcggtcgc	aacatgtaca	ccgcttataa	agcgcgtctg	ccctttcttg	6300
atatcaacca	ggagcgtgaa	cacgcgtttg	ccggttatcg	cggcatcatt	acccttgccg	6360
aacaactttg	tcagaccctg	gaaagcccgg	tctggccgca	aacgcatgcc	cgcgcgccgt	6420
ggcaataagg	agcgttcaat	ggccgaaatt	cttcgcagta	aaaaaccgct	ggcggtcagc	6480
ccgataaaaa	gcggccagcc	gctggggcg	atcctcgcca	gtctgggggt	cgaacagtgc	6540
ataccgctcg	tacacggcgc	acagggctgt	agcgccttcg	caaagggtgt	ctttattcaa	6600
cattttcagc	acccgatccc	gctgcaatcg	acggcgatgg	atccgacttc	caccattatg	6660
ggtgcgcgat	aaaacatttt	taccgcgctc	aatgttctct	gtcagcgcaa	cgccgcgaaa	6720
gccattgtgc	tgctcagtac	cggcctttca	gaagcccagg	gcagcgacat	ttcgcggtg	6780
gtgcgccagt	ttcgtgatga	ttttccccgg	cataaaggcg	ttgcgctgct	caccgtcaac	6840
accccgagat	tttacggctc	gctggaatac	ggttacagcg	ccgtgctgga	aagcatgatt	6900
gaacagtggg	ttcctgagcc	gccgcgcgcc	agcctgcgca	accgcccgct	caacctgctg	6960
gtcagccatt	tactgacgcc	ggcgatatac	gaactgttgc	gcagttacgt	tgaagccttc	7020
ggactgcaac	cggttaattgt	gccggatctg	tcgctgtcgc	tggacggaca	tctggcaaac	7080
ggtgattttt	cgctgtttac	ccagggggga	acatcgctgc	gcatgattga	acagatgggg	7140
caaaaccttg	ccacctttgt	gattggcaac	tcgctgggtc	tgccggcgcg	gttactggcg	7200
cagcgagccc	gtggcgaggt	gatcgccctg	ccgcactctga	tgacgcttgc	agcctgcgac	7260
acgtttattc	atcgactgaa	aacctctctc	ggcgccgacg	tcgcccgctg	gattgagcgc	7320
cagcgccggc	aagtgcagga	tgcatgatgc	gattgccata	tgtgtttgca	gggcgcggct	7380
atcgccatgc	cagcaagaag	cgatcacctg	gcggcatggt	gcgatttcgc	ccgcagccag	7440
ggcatgctcc	ccggcccgat	tgtcgcgcgc	gtcagccagc	cggggttgca	aaatctgccg	7500
gtggaacacc	tggtcatcgc	cgatctggaa	gatatgcagg	atcagctttg	cgcgacgccc	7560
gccgcgttat	tggtagctaa	ttctcatgcc	gccgatctcg	ccgcgcagtt	tgatctgtcg	7620
cttatcccg	ccgggttccc	ggtgtatgac	cggctgggag	aatcttgcgc	octgcccag	7680
gggtatagcg	gcattcgtga	cacgctgttt	gagctggcga	atgtgatgcg	cgaacgccac	7740
caccgcgttg	caacctaccg	ctcgcgcgctg	cgccagcacg	tcgacaatac	cgttacgcct	7800

ggagatctgt	atgccgcatg	ttaatcgtca	gttcagcacc	atttgccagg	gcgaatggtc	7860
aatgaaagtc	gcctttgcc	gttcggatta	tcaccacgtg	gatcaacact	ttggcgccac	7920
gcccgaagta	gtgatctatg	gcgtgaaaga	gcacgaggtc	acgctgttgc	gggtggtgga	7980
tttttctgtg	ctcgccggac	accagcaaga	gaagctcgat	tgctgcattc	acgcgctgga	8040
agattgcgtc	acgctctact	gcgtggcgat	tgcggaagcg	gtttttcgcc	agcttttgca	8100
aatcggcgta	cgcgcggttc	gcgtgccgca	cgcgaccacc	attgccgggc	tggtgcagga	8160
aattcagcac	tactggtatg	acaaagagca	gcgcaaaagc	gcccgcaatc	cacaacgctt	8220
cgcccgcgat	ctccaggaac	aaacctggca	ggaagaggat	gagcggttagc	cacacgccgt	8280
gtcggttggt	tgacaaagcc	aacataaaat	cgcgacacag	cgccgggttt	tatggtggca	8340
cattaactta	ccccattgaa	atgcaacact	tttcccttct	ggtattgctt	ttgcttgatt	8400
gtcatcacc	gcccgttgatt	gaggcggtga	aatgcgccac	ggcgctttcc	gtcatctctc	8460
ctggggagcca	ggcacatgtg	gaattactcc	gagaaagtga	aagatcattt	ttttaatccc	8520
cgtaacgcgc	agcgtggtga	aaacgcgaac	gccgtgggag	atgtgggctc	gttaagctgt	8580
ggcgatgcgc	tgccgctgat	gctacgcgtg	gatccgcaaa	gtgaaacat	ccttgaagcc	8640
gggtttcaga	cggttggtcg	cgccagcgcg	attgcctcct	cttcgcgct	caccgagctg	8700
attattggcc	gcacgctggc	gcaggccgag	caggtgacca	accagcagat	tgccgattac	8760
cttgatggcc	tgccgcccga	aaaaatgcac	tgctcggtga	tggttcagga	ggcgctgcgg	8820
gcggcgattg	cccactaccg	tgccgaaacg	ctgatcgatg	agcacgaaga	aggcgcgctg	8880
atttgcaaat	gctttggcgt	cgatgaagg	caaattcgcc	ggcggtgct	gagtaacggg	8940
ctgaccaccc	ttgaagaggt	gatcaactac	accaaagcgg	gcggcggtcg	caccgctgct	9000
catgaaaaaa	ttgaactggc	gctggccgat	attctcgccc	ggcaccgcga	ggccgccact	9060
accgtcactg	cggagaaaaga	tcgcgactgg	caggaggtcg	tcgatgcgat	cactgaatta	9120
cgctccgata	tccaggccga	tgccggcgat	atgtcgctgc	ttagcgtaaa	caatcacacc	9180
gtaaccgtca	gcctttccgg	cagttgcagc	ggctgcatga	tgaccgacat	gacgctcgcc	9240
tggtctccagc	aaaaactgat	ggagcgtaac	ggctgttata	tggaactcgt	ggccgctcga	9300
gccaccactt	gtcaaccgat	gtgggagaaa	atatgaagca	ggtctatctg	gacaataacg	9360
ccaccacccg	tatcgaccgg	atggtgctgg	aagcgatgat	gccattctta	actgaacatt	9420
acggcaaccc	tgctgcgatt	cacgactttg	gcacccctc	ccgcgcgctg	cttgaacgcg	9480
cccgcgcagc	agtcgcgcg	ctgtggggg	ccgatcacag	tagcgaatc	attttcacct	9540
cctgcgcgac	cgaggccacc	agcacgcac	tgacgcctg	cggttagctg	atgccggagc	9600
gccgggagat	tattaccacc	gccgttgaac	accgggccac	tctcgccgtg	tgcaaacatc	9660
tggaacgcca	gggtactcct	atccatcgca	ttggtgtgaa	tgccagcggc	gcaactggata	9720
tggaacagta	tgccgcgcg	ctgagcacgc	gtgtggcagc	ggtcagcata	atgtgggcga	9780
ataatgaaac	cggggtgctg	tttccggtga	tcgaaatggc	ggcgatggcg	caggaaatag	9840
gcgcgctggt	tcactgcatg	gcggtacaag	tggtgggcaa	aattccgctg	gatatcgccc	9900
gcacgcagat	cgatatgctc	tcctgtctcg	cgcataaact	gcacgggcca	aaaggtgtgg	9960
ggttgctcta	tttgcgcctt	ggcaccgcct	ttcgtccact	gctgcgcggt	gggcatcagg	10020
agcgcggtcg	ccgcgcggtt	acggagaata	tcgccgggat	tgctcgcatg	gggtcgccat	10080
gcgaactggc	gcagatacac	ctgcccgtga	gcgcgggcat	cgccagcctg	cgcgatcgcc	10140
tgcaagacga	actggtcaaa	caggtaccct	cagtgatggt	gatggcgggc	gatcaacccc	10200
gcgttccgca	cacgggcgaac	ctggcggtcg	aatttatcga	aggggaagcc	attttactgc	10260
tccttaacca	ggcggggatc	gccgcctcca	gcggcagcgc	ctgcaacctc	ggctcgctgg	10320
aaccgtcgca	tgtgatgcgg	gcgatgaaca	ttccctacac	ggcggcgcat	ggcagtatcc	10380
gtttttcact	ctcgcgctat	acgcgggaaa	aggagatcga	ctatgtaatc	gagacgctgc	10440
cagccattat	taccgctctg	cgcgcgcttt	ctccctactg	gcaggatggt	tctgcccccg	10500
ctacctttgc	gcccgtttac	ggctaagcgc	gcgacatgct	cagggttggt	atcaatgaca	10560
ctacgctgcg	cgatggcgaa	cagagccccc	gcgtgcctt	ttgcgccagc	gagaaaaatc	10620
ccattgcccga	agcgtgtgtt	gccgcggggg	tgaccgcgct	ggaagtgcgc	accccgcgca	10680
tgggccgcga	agaacgccag	cggatgcgac	aagttcgcca	gcaactgcct	gacgccacgc	10740
tcattggcctg	gtgtcgcaac	aataccgatg	aaatcaccca	gagcgccgat	ctcgcatga	10800
actgggtgga	tatctcacta	ccggttctg	acaaactgcg	ccagtacaaa	ttgcgtgaac	10860
cgctgccggt	cgctgtggtg	aaactggcca	cgctgattgc	gcaggcgcca	cagcagggat	10920
tgcaaggtctg	tattggttgc	gaagacgcac	cccgcgccag	cgatcggaac	ttagcggaga	10980
ttgccaccgt	cgccgcgcaac	gcaggcgcac	agcgggtgag	ttttgcgat	acccttggcc	11040
tgctcgaccc	tttaccacc	gctcagcgta	tcagcgcgct	gcgtcaaaag	tgcccccgtg	11100
aaatcgaaat	gcacgcccac	aacgatctcg	gtatggcgac	cgccaataac	ctggcgcgcg	11160
ttcgcgccgg	agcaaccagt	gtgaatacga	ccgtgctggg	ccttggcgaa	cgcgccggaa	11220
acgcgcgcgt	ggaaacgcgt	gcgctcgctg	tgagccgctg	tcgtgggtctg	gatacgcgcg	11280
tggttttca	gcaattaccg	atgctctgcc	agcaggtcgc	cgatgccgce	cgcgctccca	11340
ttgacccaca	gcaaccgctg	gtaggcgcg	aggtatttac	ccatgagtc	ggcgtgcgat	11400
tcgctgcctc	gctgcgcgat	cgcgaaagct	accaggccat	tgatccggcg	ctgatcgccc	11460
gcgaataaccg	gtgggtgctc	gtaagcact	ccggtcgta	ggccgtggaa	ggtgtattta	11520
cccgcctggg	ctatcacctt	aatgccctgc	aagtcgacct	gctgctgccc	gccattcgcc	11580
gcgtggcgga	aagcagcaaa	cgacgcgcgc	aagacgatga	actgattgag	ctttacacca	11640
ccttggtggtg	gtcaggcgcc	acacacctgg	cgagggtgta	aagatggaat	ggttttatca	11700
gatccccgctg	gtggtgaaac	tcgacagcgc	cgatctcttt	tttacttttt	tctccgtgcc	11760
ttatgaaccg	ctcacgctgc	gcccgttgctg	cctgccggtg	ctgcgcgaat	ttcacctgcg	11820
cctgcatgat	catgtgcccgc	tgctgtaact	gcttgaagct	acaccccgcg	agccctggct	11880
tctggcgccgc	aggctgctgg	cggaaagcta	cgaacactgt	acaacggagg	cgacatcatg	11940
aaaccaaagt	atgcgttcgg	tgaggaagtt	cgcggttagcc	gcgcccactc	caacgatggc	12000
accatgccgg	gttaccggcg	cgccgatttg	ctggtgcgtc	ggggcagtag	gggttttgct	12060
cgtgaatggg	gcacgttcc	gatggaaaaa	gtgatttata	aaatccactt	tcccgaactgc	12120
ggtttgattg	tggtgctggc	cgagcaggaa	ctgctgcccgc	tttccgcccc	ctggcacgcc	12180
gggcagttcc	agtatggcga	taccgtcgcc	tgccgccaac	cgctggccat	cgccgataac	12240
atcggtggtg	ccgcgggaga	acaaggccag	atcgccgcca	caggccaggg	agacgacgca	12300
gagagttaca	ctgtcacctt	ttccggggcg	tggtttcagg	ttcccgcccc	cgccatgatt	12360
ttgctggaga	cgccacaatg	atgccgtggc	agcgtttcgc	ccgcgcgacg	ttggcgctga	12420
cccgtggcca	ctgcgagccg	gaaaacatcc	cgcatcaca	ccagcaggca	tttgaccgcg	12480
cctggggcgcg	ccagcgccag	ctcgaaactg	cagtggttgc	cattgcgcg	gacgcaaacg	12540
ttactgacga	gctgcgtaat	gccgtggccg	catcgctggc	gccgcagctc	gatgagtgcc	12600

```

ctttttcctc agccgaacgc caggcagtgat ttgcgcacat tgccccgtctg gaaacgcagt 12660
ttgctgaggt tgcacgcaca gccccctccc cggacgaggg gggcgtgctg cgctgggtatc 12720
agcaacatca ggcacaattt atcgccccgg aacagcgctt aacctcgcac ctgctgctga 12780
ccgcagagca aaaccacgcc gggataagaa cacagatcac ccggttttat cagcaaatcc 12840
gtgaccacgc cgcggccttt ccccggtggg cagcgcgcca ttgcactgtg ccagcgcgcg 12900
tggagggggg gcgtctgggc tgggtaagcc gtggcctgct ctttccggaa ctggaaaacg 12960
cgctgtttgc gctgcaaaaca gatgaggtca gccagccggt cgaaacggcg ctgggctggc 13020
atttgtgtgt gtgtgaacag atccgccaac cggcactgat gggaaggca gacgcgtggt 13080
cgaaagcgcg ggagtatttg ttccgtcagt cccaacagca gtggcaacgc cagtggctgg 13140
cgtcattatt acaggcgcgc tga 13163
<210> 4
<211> 14752
<212> ADN
<213> Methylobacterium I2-4
<400> 4
caggcgccgc gccatgacgc cggcgccggt gaaccagggc agccccctct agcagagcgc 60
caccgcggcg ttgccccacc agccgttccg cttcagccgc acgggcccgc ccgagtagac 120
ccaggcgagc gcgagcccca acaggcgccg cccgaggatc caggggccga gggcgccggc 180
caccgccagc gacagggccg tccaggcgag ggcgagtag agcccccagc ggccccggat 240
ccgccccgac gggatcgccc ggtccggctc gttgatcgcg tcgacgtggc ggtcgaacca 300
gtcgttggcg gctgtcgcca cgtttctcgc atcaatacag cagcgggccc gccagcagga tgccgcccgc 360
gatcaccggc cactggccgc tggccggctg gcccgaggag atgacccccg aggcgaaggc 420
ccacatcgcg gcgaaccacg tagcgccgtt cagcagctcg atgactgcgc tcggggcggg 480
cgtagcgggt atggcgggag gctaaccggg cccgccccag tgtcaagcca gatttacacg 540
acgcgaccac ggtgtcgcca cgtttctcgc atcaatacag cggcgcccca gaaatacatt 600
atccgaaaca cctgggaacc gcggcgccgc acccgccccg cgcgggcggg tccccgcgct 660
ccgcgagcgc cccggcgggc ccccgggcgc tcccgcgccc cctcgagcgc gaggacgatt 720
ccgggatcct cgagccactc ggcgcgccgc tcaggcaccc ggttccgggc cgacgcggcg 780
cgcccgccgc ggcgtcgcca agcccgccgc ggggatgaac cggacgggac ccgcgccgcg 840
ccgcgccccg gggcgggggc cgtcaggcct cctcgaccgg gccgtcgagg tcgcccgcgc 900
cgtagcggcg catcttggcg tagaggccct gccggctcag gccagcagtc tcggccggcg 960
aggcccggtt gtcccggtg atccgcagcg ccgcctcgat gcagagcttc tcgatcaggt 1020
ccgtcgtctc gcgcaccagc gtcttcacgc agaccggccc cagagctcgc gtcactgctg 1080
ccaccgagcg gggcacctcc cgaccgaccc cgggtcgctc ctcggcgatc cgcccgggc 1140
ccgaccggat ggcgaagccc aggcaggggc gggccccggc caccgacacg gcggcgacct 1200
ccacgtctc catgcccgcg taggcgcgcg ggacgacggt gggaagcgg cgacgcggcg 1260
cgtggtcgac ggggtcgcca aacagcgct cgcctcggt ctcgtcgcg ccgagccagt 1320
ggtcgagggg gcgcccgcgc gctggcccca cgggtggcgc ctcgcccagc tccaggaagg 1380
cgcggttggc catcaggacc cgcgcgcgcg aatcggtgac cacgaagccc tccggcatcg 1440
cctcgatcac cgcggcggtc ggcgcctcct ggtcgggccc ggccgcccgc gccgcgggt 1500
cggcgccagc cgcgcagcgc gcctcgccgc ccggaacagc gaggccgaga 1560
ccgtgacctc gccgcgcgcc tgcgtgagcg ccgcccggat ctcgcccgcg tgcccgtcg 1620
cccgcagggc ggcgaactgg gctccaggg tccgggtgct ggcggggctg aacagctcga 1680
cggcgctcgt cccggcgatg cgttggccgc ggcgcgccag gaggcgggcg gccgcgggt 1740
tggcctcgcc caccgcgcgc gtgcggcat cgaccacag caccgctcgc ccgagatct 1800
ggaacagcag ccggtagcgc gtctcgccgc cgcggagcgc gtcgtagtc ccgtccaggg 1860
cctgctgggt ctcgaccagc cgcgcgtgca ggcgcgccac cgcccgcatg tcgcccgcga 1920
gcacgaggat cgggcccgcc tccgagggcc ggtcgacgc gttagcggtc ggcaggtcgg 1980
cgccgtcgcg cgggggtggg ttacactggc gccagcggt gatgccctg gtcccggcat 2040
cccgcagcag ggcgtcgatc ttccggcgcc tctccaccgt gacggtgctg atccagcgc 2100
ggcccagcca gccggccacg gtctcgccgc caggttcggc gccgaccgc gcgtcccga 2160
tcaccccgct ggcgtcgatc accagggaga ggtccgcgga cgccgcgacg atgcgccga 2220
ccgcctcgcc ctggaaggag ccggccacct gctgcagggc cgcggggcgc gactgcgggg 2280
agggcggggg ctgaggggtc acggtcacgc caatgtgata gtcggtttga ggccctttca 2340
gcaggccaat gcctgtctgt ccagcaaacg ttccgcccgc gcgggcccga ggcacgcgtc 2400
cgacgcgacg gcacccgccc cgacgatccc cgcctcgccg ccgtggcgcg cgaagaagg 2460
ggcgccgacc agcaaccgga cgtcccgtt gcgcgagtc cggcgacct ccgccacct 2520
cgccgtcagg accggcagca ggacgtcgca ggagagcagc aggcgacca cgtcgaaaca 2580
gtccgaccgc agcaggtcca ggggtcgac ccccgccgcg ggcaccgcgc tggtcacgtc 2640
ccagccggcc tcccgaaga agtcgcgac cagggacagg ccgaagacgt ggggtctcgc 2700
cgggcagggc agcagcagga cgtgcgccc gatggccggg accgatcgc tctccagtc 2760
ggcgagagc cgcgggtca cgcgtggag ccgcccagg gcctcggtca ccgccaggaa 2820
gtcgagggca tctctctccc agaggcgcc gagatgcggc gccgcccggg cgagcaggtc 2880
gaggagcagg cgcgcgagcg gcaggccgcc gtcgcgagc gcgtccacct gggcgtcgag 2940
gtcgaccggg ccggcgccca ggagcaggc gctgaaatcg gcgatctccc gcgcgtcgg 3000
cgcccggtcc cgcgggacgc cgcggccggc gggcggtgg gcgagcatca ggcggggcag 3060
gatctccgcc tcgacgacct tggcgagcgc gtccgggacg ggctgtgca ggtcggaaca 3120
accgagggca gtgtcgcgga acacgggaag accatcgctc acggggctgc agccggccc 3180
ggacggagcc taatcaagac ggcaccgaa atgctccag ttcccatcg gcacctctcc 3240
tgagacgacc ccgcccggga agggccgccc gatccgctcg cctgctcggt gcggcgttgc 3300
tcgcccgtct attcttcgcg tccgccaagt cctggatctg acaagccaaa cgcgccaat 3360
ctctgccgtc tcagttgacg atacgcttcc tggccatctt ggcaatgatc ttattcgaag 3420
aaaaaatac cctccccgtg tcaaaaccaca gaagcgtcaa gcgcacttga cacttccggg 3480
acccccgcgc tagcctctgt caacgacgga gcctctggcg ccgcccagca gcagggagc 3540
gatgatggg tcccagggac cggccggcac gaccgtctc cacgctcgcc gaacggcgcc 3600
ggcgcgattc ctgcacctg accctggctc aggggttct ggcgcccctc cagttcgca 3660
tcttctgat cagtcctgcg ctggtgctgc gtgccctggc caccggtgac ggcgcgcgcg 3720
cggcgagat ctgcgtgctc gtgaagaccg tgccctcta cgcgatcatg gtcaccggtt 3780
cgatctggga gaaggtcgtg ttccgacggt ggtctctcgc acccgcttc ttctgggagg 3840
acgtggtcag catgctggtg ctggccctcc acaccgtcta ctcgcccgc ctcgagcagc 3900

```

gcgccttgag	cgggcaggcg	ctgctgctcc	tcgcgctggc	ggcctacgcg	acctacgtgg	3960
tcaacgcggc	ccagttcctt	ctgaagctcc	gggcccgcgc	cctggagggg	gccggcagcc	4020
gcgcaccgcg	tctcgcggag	gcgctgcat	gaacgcccc	ctggcccacc	cgccgccctg	4080
cggcggcatc	gaactgcgcc	aggagcacgg	ccagcgggcc	gtgttctgcg	gcctcaccgg	4140
catcgtcttg	ctgcaccgga	agatccagga	cgcgttcttc	ctcgtggtcg	gctcgcgcac	4200
ctgcgcgcac	ctgatccagt	cggcggccgg	ggtgatgac	ttcgcgcgagc	cgcgcttcgc	4260
caccgccatc	atcgacgagc	gcgacctcgc	cggcctcgcc	gacgccaaacg	aggagctcga	4320
ccgggtggtg	accgggtga	tcgagcgccg	gcccgcacac	aagcttttgt	tcctcgtggg	4380
ctcctgcccc	tcggaggtga	tcaagctcga	cctgtcccgg	gcggcgcgagc	gcctgtcggg	4440
ccgcctcgcc	cccgctcggg	tgtgaaacta	ttcgggctcc	ggcatcgaga	cgacctttac	4500
gcaaggtgag	gatgcctgcc	tcgcgcgcgt	ggtgcccggac	ctgcccgcgc	aggcagaggc	4560
aaccgcgtcg	tcgctcctga	tcgtcggggc	gctggccgac	gtggtggagg	accagttcct	4620
gcgcatgttc	gcgcgcggg	gcgcgcggg	tgctccggttc	ctgcccgcgc	gccgggcccgc	4680
cgccatgcgc	gcagtcgggc	gcggcacccg	ctacctgctg	gcccagccct	tcctgaccga	4740
gaccgccccg	gcccctcgag	aacgcggcgc	ccgcccgcgc	gcggccccgt	tcctcgctcg	4800
cgccgagggc	accaccggct	ggctgcgggc	cgccgcgcgag	gcgttcggcg	tcctcggggga	4860
ggcggttcgac	agcggcggc	ccggcgccg	ggcccgcgc	gagaccgcgc	tcgcgcggca	4920
ccgcgagaag	ctcggcgcca	agcggtgtgt	cttcttcccc	gactcgcagc	tagagggtgc	4980
gctcgcgccg	ttcctcgccc	gggaactcgg	cgctgagctc	gtggaggtcg	ggacgcccta	5040
cctgcaccgc	ggacatctcg	ccgcccagat	cgagtggctt	cccgcgggca	cacgcgtgac	5100
cgaggggccg	agcctcaacg	accagatgga	ccgctgccgg	gcggcccgcg	cggacctcac	5160
ggctctcgcc	ctcggcctcg	ccaaccgcgt	ggaggcgagg	gggctgtcga	ccaagtggtc	5220
gatcgagttg	ctgttcacgc	cggtgcaggg	ctacgagcag	gccggcgacc	tcgccgagct	5280
gttcgtgcgc	ccgctccgac	gcccgtccct	gctggagggtg	tagcgcctatg	cagctcacc	5340
tctggaccta	cagggcgccg	cctcacatcg	gcgcgatgcg	cgctgcacacg	gcgatgtccg	5400
ggctgcatta	cgctgcgac	gctccgcagg	gcgacaccta	cgccgacctg	ctgttcacca	5460
tgatcgagcg	gcggggcgcc	cgcccgcgcg	tgacttacac	gaccttcctg	gccaggatc	5520
tcggccgcga	caccgcgcgag	ctgttcaagg	aggcggtcgc	cgccgcgcac	gcacggttcc	5580
ggccccagcg	catgatcgtg	ggcgctcct	gcacggccga	gctgatccag	gacgatccgg	5640
gcggcctcgc	caaggccctc	gaccttcga	tcggcggtgat	cccgcgtggag	ctgcgccct	5700
accagaagaa	ggagaactgg	ggcgcgctcg	agaccttcta	ccggctggte	cgcgcgctcg	5760
ccggggctcc	ggccccgcgc	ccggcgcggg	agccccggcg	gcgcccgcgc	tgcaacattc	5820
tggtttcaac	ggcgctgggc	ttccgcac	gggacgacct	gatcgagatc	cgccagctgc	5880
tcgataccct	cgcatcgcc	gtgaatgtcg	tggcgcgcgt	gggggccacg	cccgcgcgac	5940
tgggccggct	ccgggacgcc	gacttcaacg	tcgtgctcta	tcggcgagacg	gcccgcctcg	6000
ctgcggacta	cctgaagaag	gccttcgggc	agccgttcac	gcaaaccatc	ccgatcggcg	6060
tcggcggcac	ccgcgggttc	gtcgaggagg	tgccgggctc	cgccgggatt	gaccgggcgc	6120
cggtgctcga	cgatccggc	tcgcggctgc	cctgttactc	cgctcggttc	gattcgacct	6180
atctcacggg	caagcgctgc	ttcgtgttcg	gcgacgccac	gcacgccatc	ggcatcgccc	6240
gggtcgccgc	gaaggaaactc	ggcttcaccc	tcgtcgggct	cgccacctac	ggccgcgag	6300
tcgcccgcga	ggtccgcgc	gaggcgccg	agcacgggat	cgaggcgctg	gtcaccgacg	6360
actacctcga	cgctcgagcg	gcgatccgcg	cgcccgccgc	ggaaactcgtc	ctcgccaccc	6420
agatggagcg	ccacgtcgcc	aagcggtcgc	gcacccctg	cgcggtgatc	tcggcgccgg	6480
tcacgtcca	ggacttcctg	gcgcgctacg	ccccgcagat	gggcttcgag	ggcgccaacg	6540
tctgtttcga	caccttggtc	catccgctga	tgatgggctc	cgaagagcac	ctcctcgga	6600
tgttccggga	agatccgaa	ttccacgacg	gcgtcgggcc	ctcgcatctc	ggcgccaagt	6660
ccttcgggac	tcggcgggac	gaggcggttcg	aggccgcgga	acggggcgccg	gctgacaccc	6720
ctccgacgcc	ggcgcccggt	ccgatccctgc	ttgagcgggc	ggccgcgacc	gcgtggctgc	6780
ccgaggccga	gaaggagctg	aagaagatcc	cggttctctg	gcggggcaaa	gcacgcacga	6840
acaccgagac	acatcgcgca	gagcggcacc	tcgcgctcat	cacctcagag	acctctacg	6900
atgccaaagc	gcattacggc	cgctaggccg	ccgatccgcg	tcgtcatcgt	cacgctcgac	6960
aatcacttgg	cgagcgcggt	ggagcgggcg	cgcccgccgc	tcggttcgca	gatgcccggg	7020
ctggtgctgg	gcttcacgc	ggccgcggcg	tggaacaacg	atcccgcgac	gctggcgggc	7080
tgctggggcg	acatcgcgca	ggccgcacac	gtgctctcgg	ccatgctgtt	catggacgag	7140
cacgtcgggg	cgatccctgc	ggcgctggcg	gcccgcgcgc	cggcctgcga	cgcgatggte	7200
ggctgcctct	cgcccgcgca	ggtggtgaag	accacgaagc	tcggccgctt	cgacatgagc	7260
ggcaccaagc	gcagcgccct	cgacttctctg	aagaagctgc	ggggcaagcc	gggcccagcag	7320
ggcaatggcg	gcccgcgcg	ggccctgggt	cgcaaaactgc	cgaagatcct	gcgcttcac	7380
ccgggttcgg	cccaggacgt	gcgcgcctat	ttcctgaccc	tgcaatactg	gctggcgggc	7440
tcggacgaga	acgtcgccgc	gctggtgcgc	ttcctcgtgc	accgctacgc	ggccggcgag	7500
cgccgcgcct	ggcgcgaggg	tcggcgggcg	ccggcacccc	tcgattatcc	ggagacaggt	7560
ctctaccacc	cgccctcat	cgttcggatc	ggtgccgacc	cgctcgcggt	gccgcgcctc	7620
acggggcgcca	agggcggggt	cgccctgctg	gtgatgcgca	gctacgtgct	cgccggcaac	7680
accgcccat	acgacggcgt	catcgccgc	ctggagcgcg	ggggcctcga	cgtggtgccg	7740
gccttcgcca	gcggcctcga	caaccgccc	gcggtagagt	ccttctctct	ggaggacggg	7800
cgcccgagca	tcgacggcgt	ggttcgctc	accggcttct	cgtggttcgg	cgccccgc	7860
tacaacgacg	ccgcgcgcgc	cgaggcgatg	ctggcccggc	tcgacgtgcc	ctacctcgcc	7920
gccacggcgc	tggaatttca	gacctggaa	cagtgggagg	cggtgaccg	cgccctgtcg	7980
ccggtcgagg	cgaccatgat	ggtcgcgatc	cccgaactcg	acggcgccac	caccccgacg	8040
gtgttcggcg	gttcgcgcgc	gaattccggc	gccgacaacg	caaggacat	gcgggtccat	8100
cccagcgcg	cgccccggt	cgccgagcgg	gtcgcgcgac	tggtatcgct	ccgcccggacc	8160
gcgaaggccg	agcggaagct	cgccgcgggtg	ctgttcaact	tcggcgccaa	tgccggcgcc	8220
accggcacgg	cgcggttctt	gtcgggtctac	gcctcgtgc	tcaaacgct	gaagggcctg	8280
gcgcgcgga	gtacacggt	cgaagtgcgc	gagagcgtcg	acgcctgcg	cgaaaaaatc	8340
ctcgacggca	atgccaaagc	ctacggcacc	caggccaacg	tcacgcccgc	cattccggcc	8400
gaggaccacc	tcgcgcgcga	gccctacctc	gcggagatcg	aggcccagtg	ggcccccgcg	8460
ccggggcgcc	accagaccaa	cgccgcgcgac	atcttcgtgc	tgggcgcgca	gttcggcaac	8520
gtcttcgctg	gggtccagcc	cgccctcggc	tacgagggcg	accgatgcg	gctgctgttc	8580
gagcgcggt	tcgcaccgac	ccacgcgttc	agcgcttct	accgctacct	gcgcgaggac	8640
ttcagcgccg	acgccgtgct	gcatttcggc	acccacgggg	cgctcgagtt	catgcccgcg	8700

aagcagaccg	gacctgtccga	atcctgtctgg	ccggagcggc	tgatcggggc	gctgccccaa	8760
gtctacctct	acgcggccaa	caaccgctcc	gaggggacgc	tcgccaagcg	gcgctcggcg	8820
gcgacgctgg	tgagctacct	gacccccagc	ctcgcgcgcg	ccggactcta	tcgcggtctg	8880
ctcgacctga	agagctcgat	cgagcgctgg	cgccgctcgc	gccccgaggc	gggcccggag	8940
cggaagacgc	tggcgcgctt	gatccaaagc	cagggcgcg	cggtcgatct	cgctcgccgc	9000
gagccggcct	ggaccggcga	tctggaggct	cggttctccg	gcctctggac	cgcgctgcag	9060
gagctggagc	agaccctgat	cccgcacggc	ctgcacgtgg	tcggcgcggg	cacgcgggaa	9120
gaggagcggg	tcgatctgct	cctggcgctc	gccccagtcg	cgacacggcg	gccccgggag	9180
cgggcgcgga	tcgagccctt	cgccacgggg	cagggcgctc	aggcgcgctt	gacggcttcc	9240
ggcctgcccc	ccgacgacgt	gacccggggc	gcgttcgcaa	gtctggcgga	gaccgaccgg	9300
ctgtctgtcg	gcgaccacga	ggttccggcg	ctgctcgggg	cgctggacgg	ccgcttcgtg	9360
ccgcgggtgg	ccggcgcgga	cctgctgcgc	aaaccggccc	tgctgcccga	aggcccgaac	9420
ctccacggct	tcgatcccta	ccgcctgccc	tcggccttcg	cggtggcgga	cggtgcccgg	9480
caggtggccc	gcacccctga	acgcttcgcc	gcggacggaa	aaacctgccc	ggagagcgct	9540
gccccgtgtc	tggtggggc	cgacaatctc	aagagtggag	gcggcccgat	cgcccagggt	9600
ctggcgctga	tcggcgccgc	gccccgcttc	gacggctacg	ggcgccctag	cgggcgccgag	9660
ctgatcccg	tgagagccct	cgagcgcccg	cggtcgacgc	cggtggtgac	cctctcgggc	9720
atctttcgag	acctgctacc	gctgcagacc	aaactcctgg	cggaagcgct	tttctctgcc	9780
gccaccgccc	acgagccctt	cgaaacagaa	tacgtccgca	agcacgccct	cgcgatccag	9840
gccgagcagg	gctgcgatct	ggagacggcg	gcgctccggg	tcttctccaa	cgccgagggc	9900
gcctacggag	ccaacgtcaa	tcacttggtc	gactcgggca	actgggacga	cgaggccgag	9960
ctctgcgaga	ccttcgcgcg	ccgcaagagt	ttcgccctac	gccgcaccgg	ccgccggcg	10020
ccgcagcggg	cgctgatgca	ggcggtgctc	gcctccgctg	acatggccta	ccagaacctc	10080
gactcggtgc	aggtcggcgt	cacctcggtc	gacctact	tcgacgggct	cgggcgccatg	10140
ggccgcccgg	tgcccgccac	caaggcgag	tcggtgccga	tctacatcag	cgaccagacc	10200
cgccggggagg	ggcgcgctcg	ctccctggag	gagcaggtgg	cgctggagac	gcgcacccgg	10260
atgctcaacc	cgaaatgta	cgagggcctg	ctcgccacgc	gctacgaggg	cgctccggcag	10320
atcgagacgc	atctcaccaa	cacggtcggc	tggtcgggca	ccgcccaacgc	ggtccagccc	10380
tggtatctac	ggcgacccac	cgagacctac	gtcctcgacc	ccgccatgcg	cgagcgcatg	10440
gccgccttga	acccaccgcg	ctccgccaa	gtcgcccgga	ggctgatcga	ggcgacccgc	10500
cgcgcttctt	ggacccccga	cgagcgatg	cgcgacggcc	tcgacccggc	cgaggaggag	10560
ctggaggacc	gcttggaaag	cgtaaccgca	ggagtggcgg	catgaacatc	gcgatccgca	10620
accccgctcg	ggcgcgaaag	gagggaggga	gccttcagg	cgccctcgat	cccgatctga	10680
agatcgagac	cgccaaagtc	ttcgcggtct	acggcaagg	cgggatcggc	aagtccgacca	10740
cctcgtcgaa	cctgctgggt	gccttctcga	agctcgccaa	acgggtgctg	cagatcggtt	10800
gcgacccgaa	gcacgattcg	accttcacgc	tgaccaagcg	cctcgccccc	acggtgatcg	10860
acgcgcttga	cgcggtgaac	ttccactcgg	aggagctgcg	cgctcgagat	ttcggtgctg	10920
agggtctcaa	cggggtgatg	tgcgctgagg	ccggcgccgc	gcccgccggc	accggctgcg	10980
gcggtctacg	ggtcgggccg	acggtgaagc	tcctcaagg	gcaccacctc	ctcgaagaca	11040
ccgatgtcgt	cggtttcgac	gtgctggggc	acgtggtctg	cgcgcgcttc	gcctcgccgc	11100
tcacgacgcg	cgaccggggc	ctgatcgta	ccgcccaacga	cttcgactcg	atcttcgcca	11160
tgaaccggat	cgctcgggcg	atccacggca	agtccaagaa	ttacggcggtg	cgactcgggc	11220
gcgtcatcgc	caaccgctcg	gccaagaccg	acgagatcga	ccggttcaac	gacgcggctc	11280
gcctgaagcg	gctggcgcat	ttccccgacc	tcgacgtggt	ccgcgcgctc	cggtcgaaga	11340
agtcgacctt	ctctgagatg	gagtcctcgc	cgagctcgga	cgccgtgacc	gccgagtaca	11400
tgccgctcgc	cgagacgctc	tgggccggcg	ccgagccctg	cgaggcgag	cccatgaagg	11460
accgcgacct	gttcgagttt	ctgggattcg	actgatggcc	agcgccagct	acgacggccg	11520
ccggggcgag	ctgaccacct	acttcgaccg	caccgcgggtc	gaggcggtgt	cgcgccctgac	11580
ctcggaacgc	cccggtgacc	ggatccgcgc	cacgggtcg	gcccggcgcg	acgccatgcg	11640
ggccaacgct	ctctcctggc	tcccggccga	catgaccggc	ctgcggttgc	tcgatgccc	11700
ctgcggcacc	ggggcgctca	gcgtcgaggc	ggcgccggcg	ggcgccgagg	tggtggcgat	11760
cgacgtctcg	ccgacgctga	tcgggctggc	gcaggagcgg	ctgcggcgga	tcgcccggcg	11820
ggggcgcatc	gatttcgggg	tgggcgacat	gctcgatccc	gggctcgggc	ggttcgatca	11880
cggtgtggcg	atggattcgc	tgatccacta	ccgcgcggcc	gacatcgccc	ggggcgctgg	11940
ggtcctgggt	gcgcgcacgg	acgggtcggt	gctgttcacc	gtggcgccgc	gcacggccct	12000
gctgacgctg	atgcacgcgg	ccggaaaatt	cttcccgcgc	ggcgacggct	cgccctccat	12060
cgctgcgggt	accgaggggt	gattgcggcg	gcggatcgcc	tcggagagcg	ccctggagcg	12120
cttcgcctgg	ccgcagagcc	accggatcaa	cagcggttcc	tacctgtcga	acgcgggtgg	12180
gctgacacgc	acctcgccgc	cccgcgcgga	tcggggcggg	ggcccggtgc	aatccgggat	12240
gcggccatga	ccccaccgcg	caagctcacc	gccgccctga	tgccgctcgg	cccgcggtg	12300
ctgccccttcg	cggaacggcg	caccgcggcg	ctgcccgtcg	ggcggtgctg	ccgcctcgcc	12360
ctgttccagg	tcaccgctcg	catggcccg	gtgctgctga	tcggcaccct	gaaccgggtg	12420
atgatcgctg	agctcgggct	cccggcctgg	atcggtggca	tgatgctggc	gctgcggctg	12480
gtcttcgccc	ccttgcgggc	gctggctggc	ttccgctcgg	acacgcaccg	ctcggtgctg	12540
ggctggcggc	gcgtgcctta	catctggttc	ggcacgctgc	tccagttcgg	cggcctcgcg	12600
atcatgccc	tcgcctgctt	catcctgtcg	ggcgacacga	ccgggcccgt	ctgggtcggc	12660
gacctcgcg	cggcgctcgc	cttctgtctg	gtcggcggcg	gcctgcacac	gacccagacc	12720
gtggggctcg	ccctcgccac	cgacctcgcc	ccgcgccatg	cgaggccgaa	ggtggtggcg	12780
ctgctctgct	cgccctgctt	ggttcggcatg	atggcgagcg	cggtgctgtt	cggcctgttc	12840
ctggcccatt	tcgcccgcgt	ccggctgato	caggtgatcc	aggcgcgggc	cctcgctcac	12900
atcatcctca	acgggttcgc	cctgtggaag	caggagccgc	gcgatccgaa	ccggacggcg	12960
acgcgcgcgc	agcgggactt	ccggtcctcc	tgccggggct	atgcggggca	gggcacggcc	13020
cggcgcggcg	tcgtggcgat	cggttcggc	acggcgggct	tctccatgca	ggacatcctg	13080
ctcgaaacct	acggcgccga	gatcctgca	ctctcggtgg	cgcccaaccac	ggcgctgacc	13140
gccttgctgg	ccgcgggtgg	cggttcggc	ctgctggtcg	cggcgcgctg	gctcgccgcg	13200
ggggcgagcc	cgttccgctg	ctcccggttc	ggcgctcgga	tcgggaccc	cgcggtctcg	13260
gcggtcgtgt	tcgcccggcc	gctcgccctg	gccgacctgt	tcgcccgggg	cgtagccctg	13320
atcggtcctg	ggcgcgccct	gttcgcccac	ggcacccctca	ccgcctcgat	gaaccgggac	13380
ggccccgagg	ataccggggt	cgcgctcggc	gcctggggcg	ccgtgcaggg	gacccgggac	13440
ggcctctcga	tcgcccggag	cgccctcggt	cgcgacgtgg	gcggcgccat	cgcccagtcg	13500

```

ggggtgctgg ggcaggccat gaacgagccg gccatcggtt acctcatcgt ctaccacatc 13560
gagatcgccc tgctgttcgc cgcgtgctc gcgctcgac cgctgtgctg cgaggacgct 13620
cggacagagg atcggaaccg catcgccgac ggccttgccg gccggacggc ctgacattcg 13680
gggaggacag ccattgcaac cgcgccactt acgggttacg tcgacgtcgc ccaggtcgtg 13740
ctctacgcct tcttctctct ctgcgcgga ctggtcttct ggctccgccg cgaggaccgg 13800
cgcgagggtt atcccttga gaacgagggc gtcggccggc gcaaggcggg cgaccggatc 13860
ctgatcccg cgtccaaggc gtttcacctg ccgggcggcg agacgacctt cgcgcgcgag 13920
gcggtgcacg gccgggacga catcgagacc ggcatcccg cccgcaaggc cgagcccttg 13980
ccggggggcg cctacgagcg caggaatcg tcgctccagg ccggcgctcg tcccggctcc 14040
tgggtgctgc ggcacgacgt gcacgaccgg acctgggacg acgagatccg catcgtgcc 14100
ctccgggtgg cgaagaactt cgtcatccac gaggacggc cgaaccgat cgcatgacg 14160
gtgttcggca ccgacagcgc cgtcgccggc gtgatcagcg acgtctgggt cgaccgccc 14220
gagtcgctga tccgctacta caggtcgag tcgccgacgg gcggacggc gctgatgcc 14280
accacgttct gccggggcgg cggtttcacc aagacggtga cgaccgaggc gctgctcgcg 14340
agccagttcg ccgacatccc gaccaccgcg gatcccgaca gcgtaacctt cctggaggag 14400
gagcggatca tctcgtattt cggcgccggc acgctctacg cgacgcccgg ccggcgggag 14460
cccctgatat gagcggcgac ttcttcccgc aaggcacctt gcggggtctg cccggcccgc 14520
tgccgcgggg cgagcgcac ctctggcagg gcgcgccgac caccgcccgg ctgctggtcc 14580
gagtggtcca cgcccgctc gtgatcgctt ggttctcggt ctgcgcctg gccttcggcc 14640
tcgcggcggg ctgcgccgcg gcggcgctga ggggtgtggc gccgacctg gtgatcggcg 14700
ccggcgccgt cgcgtgctc tggctgctcg cctggctcac ccaccggacg ac 14752
<210> 5
<211> 40
<212> ADN
<213> Enterobacter sp R4-368
<400> 5
cgtaaatctc aatttggctc agcatcaaac agtttggat 40
<210> 6
<211> 35
<212> ADN
<213> Enterobacter sp R4-368
<400> 6
gcgttggccc aggggatgtg ctgaacgtaa ccgtg 35
<210> 7
<211> 31
<212> ADN
<213> Enterobacter sp R4-368
<400> 7
ccccgcagg gctgtatcgc tggcgcgcat t 31
<210> 8
<211> 31
<212> ADN
<213> Enterobacter sp R4-368
<400> 8
ctggtgctgc gttcccgcga ggagctgaac c 31
<210> 9
<211> 32
<212> ADN
<213> Enterobacter sp R4-368
<400> 9
cgtctgaacg ttgaatcgcg gcacgacgag ga 32
<210> 10
<211> 1740
<212> ADN
<213> Enterobacter sp R4-368
<400> 10
gcacctgctc ttttaacaatt tatcagacaa tctgtgtggg cactcagggt gactggattc 60
ttgacgtcgc aagacgaaaa atgaatacca agtctcaacg agtgaacacg taattcatta 120
cgaagtttaa ttcatagagc atcaaaacttt taaattgaag agtttgatca tggctcagat 180
tgaacgctgg cggcaggcct aacacatgca agtcgaacgg tagcacagag agcttgctct 240
cgggtgacga gtggcggacg ggtgagtaat gtctgggaaa ctgcctgatg gagggggata 300
actactggaa acggtagcta ataccgcata acgtcgcaag accaaagagg gggaccttcg 360
ggcctcttgc catcagatgt gccagatgg gattagctag taggtggggg aacggctcac 420
ctaggcgacg atccctagct ggtctgagag gatgaccagc cactctggaa ctgagacacg 480
gtccagactc ctacgggagg cagcagtggg gaattattga caatgggcgc aagcctgatg 540
cagccatgcc gcgtgtatga agaaggcctt cgggttgtaa agtactttca gcggggagga 600
aggagtaag gtttaataacc ttattcattg acgttaccgg cagaagaagc accggctaac 660
tccgtgccag cagccggcgt aatacggagg gtgcaacgct taatcggaat tactggcggt 720
aaagcgcacg caggcggctt gtcaagtcgg atgtgaaac cccgggctca acctgggaac 780
tgcatccgaa actgggaggt ttgagctctg tagaggagg tagaattcca ggtgtagcgg 840
tgaaatgcgt agagatctgg aggaataccg gtggcgaagg cggcctctct gacgaagact 900
gacgctcagg tgcgaaagcg tggggagcaa acaggattag ataccctggt agtccacgcc 960
gtaaacgatg tctatttga ggttgtgccc ttgaggcgtg gcttccggag ctaacgcgtt 1020
aaatagaccg cctggggagt acggccgcaa ggttaaaact caaatgaatt gacgggggcc 1080
cgcacaagcg gtggagcatg tggtttaatt cgtatgcaac cgaagaacct tacctggtct 1140
tgacatccac agaactttcc agagatggat tgggtgcctc gggaactgtg agacagggtc 1200
tgcatggctg tcgtcagctc gtgttgtgaa atgttgggtt aagtcccgcg acgagcgcaa 1260
cccttatcct ttgttgccag cgttagggcc gggaactcaa aggagactgc cagtataaaa 1320
ctggaggaag gtggggatga cgtcaagtca tcatggccct tacgaccagg gctacacacg 1380
tgctacaatg gcgcatacaa agagaagcga cctcgcgaga gcaagcggac ctcataaagt 1440

```

gcgtcgtagt ccggatttga gtctgcaact cgactccatg aagtcggaat cgctagtaat 1500
 cgtggatcag aatgccacgg tgaatacgtt cccgggcctt gtacacaccg cccgtcacac 1560
 catgggagtg ggttgcaaaa gaagtaggta gcttaacctt cgggagggcg cttaccactt 1620
 tgtgattcat gactgggggtg aagtcgtaac aaggtaacgg taggggaacc tgcggttga 1680
 tcacctcctt accttaaaaga acctgcctct gcagtgtcca cacagattgt ctgatgaaaa 1740
 <210> 11
 <211> 1443
 <212> ADN
 <213> Pleomorphomonas jatrophae R5-392
 <220>
 <221> Trình tự lõi
 <222> (603)..(603)
 <223> n là a, c, g, hoặc t
 <400> 11
 gagtttgatc ctggctcaga acgaacgctg gcggcaggct taacacatgc aagtcgaacg 60
 ctgcagcaa tgcgggagtg gcagacgggt gagtaacgag tgggaacata ccttttggtt 120
 cggaataact gagagaaatt tcagctaata cgggatgtgc cctatggttg aaagatttat 180
 cgccaaagga ttggcccgcg tctgattagc tagttgttga ggtaacggct caccaaggcg 240
 acgatcagta gctggtctga gaggatgatc agccacactg ggactgagac acggcccaga 300
 ctccctacggg aggcagcagt ggggaatatt ggacaatggg ggcaaccctg atccagccat 360
 gccgcgtgag tgatgaaggc cttagggttg taaagctctt tcgtcaggga agataatgac 420
 ggtacctgaa gaagaagccc cggctaactt cgtgccagca gccgcggtaa tacgaagggg 480
 gctagcgttg ttcggaatta ctgggcgtaa agcgacagta ggcggacatt taagtcaggg 540
 gtgaaatccc agggctcaac cctggaactg cctttgatac tgggtgtctt gactacgaga 600
 gantgtgagt gaattccgag ttagaggtg aaattcgtag atattcggaa gaacaccagt 660
 ggcgaaggcg gctcactggc tcgtaactga cgtgaggtg cgaaagcgtg gggagcaaac 720
 aggattagat acctggttag tccacgctgt aaacgatgaa tgccagccgt tggcgacgt 780
 gtcgttcagt ggcgcagcta acgctttaag cattcccgct ggggagtacg gtcgcaagat 840
 taaaactcaa agcaatttgc gggggccgcg acaagcgggt tagcatgttg ttttaattcga 900
 agcaacgcgc agaaccctac cagcccttga catccgtcgá cccgttgaga gatccatttt 960
 gcccttcggg gccggcgaga caggtgctgc atggctgtcg tcagctcgtg tcgtgagatg 1020
 ttgggttaag tcccgcacag agcgcaaccc tcgccttcag ttgccagcat ttggttgggc 1080
 actctggagg gactgccggt gataagccgg aggaaggttg ggatgacgtc aagtcctcat 1140
 ggccttacg ggctgggcta cacacgtgct acaatggcgg tgacaatgag cagcgacttc 1200
 gcgaggagaa gctaattctca aaaagccgtc tcagttcgga ttgactctg caactcgagt 1260
 gcatgaagtc ggaatcgcta gtaatcgctt aacagcatga cgcggtgaat acgttcccgg 1320
 gccttgatca caccgccgtg cacaccatgg gacttggtt taccgaagg tagtgcgcta 1380
 accgcaagga ggcagctaac cacggtaggg tcagcgactg gggatgaagtc gtaacaagg 1440
 aac 1443
 <210> 12
 <211> 1414
 <212> ADN
 <213> Sphingomonas sp. S6-274
 <400> 12
 acgaacgctg gcggcatgcc taacacatgc aagtcgaacg agagcttcgg ctctagtggc 60
 gcacgggtgc gtaacgcgtg ggaatctgcc cttgggttcg gaataacagt tggaaacgac 120
 tgctaatacc ggatgacgtc gataagacca aagattatc gcccgaggat gagcccgct 180
 cggattagct agttggtggg gtaaaaggcct accaaggcga cgatccgtag ctggtctgag 240
 aggatgatca gccacactgg gactgagaca cggcccagac toctacggga ggcagcagt 300
 gggaaatattg gacaatgggc gcaagcctga tccagcaatg ccgctgtagt gatgaaggcc 360
 ttaggggttg aaagctcttt taccgggaa gataatgact gtaccgggag aataagcccc 420
 gggctaactc cgtgccagca gcccggttaa tacggagggg gctagcgttg ttcggaatta 480
 ctggcgctaa agcgacgtgta gcggcctttg taagtcaggg gtgaaagcct ggagctcaac 540
 tccagaactg cctttgagac tgcactgctt gaatccggga gaggtgagt gaattccgag 600
 ttagaggtg aaattcgtag atattcggaa gaacaccagt ggcgaaggcg gctcactgga 660
 ccggtattga cgtgaggtg cgaaagcgtg gggagcaaac aggattagat acctggttag 720
 tccacgccgt aaacgatgat aactagctgt ccgggaactt ggtttttggg tggcgacgt 780
 aacgcattaa gttatccgcc tggggagtac ggccgcaagg ttaaaactca aaggaaattga 840
 cggggggcct gcacaagcg tggagcatgt ggtttaattc gaagcaacgc gcagaacctt 900
 accagcgttt gacatgtccg gacgattccc agagatgggt ctcttccctt cggggactgg 960
 aacacaggtg gtcgatggct gtcgtcagct cgtgtcgtga gatgttgggt taagtcccgc 1020
 aacgagcgca acctcgctt ttagttacca tcattgagtt gggactctta aaggaaaccgc 1080
 cggtgataag ccggagggaag gtggggatga cgtcaagtcc tcatggccct tacgcgctgg 1140
 gctacacacg tgcataatg gcgactacag tgggtctgaa tcccgcgagg gtgagcta 1200
 ctccaaaagt cgtctcagtt cggattgttc tctgcaactc gagagcatga aggcggaatc 1260
 gctagtaatc gcggtacgc atgcccggtt gaatacgttc ccaggccttg tacacaccgc 1320
 ccgtcacacc atgggagttg ggttcacccg aaggcgttgc gctaactcag caatgagagg 1380
 caggcgacca cgggtggcct agcgactggg gtga 1414
 <210> 13
 <211> 1409
 <212> ADN
 <213> Methylobacterium L2-4
 <400> 13
 agatcaatct cttcaacgtg agagtttgat cctggctcag agcgaacgct ggccggcaggc 60
 ttaacacatg caagtcgagc gggcccttcg gggtcagcgg cggacgggtg agtaacgcgt 120
 gggaaacgtg cttctggttc ggaataaccc tgggaaacta gggctaatac cggatacggc 180
 cttttgggga aaggtttact gccggaagat cggcccgctg ctgattagct agttggtggg 240
 gtaacggcct accaagcgca cgatcagtag cttggtctgag aggatgatca gccacactgg 300
 gactgagaca cggcccagac tcctacggga ggcagcagtg gggaatattg gacaatgggc 360
 gcaagcctga tccagccatg ccgcgtgagt gatgaaggcc ttagggttgt aaagctcttt 420

```

tattccgggac gataatgacg gtaccggagg aataagcccc ggctaacttc gtgccagcag 480
ccgcggtaat acgaaggggg ctagcgttgc tcggaatcac tgggcgtaaa gggcgcgtag 540
gcggcggttt aagtcggggg tgaagcctg tggtcaacc acagaatggc cttcgatact 600
gggacgcttg agtatggtag aggttgggtg aactgcgagt gtagaggtga aattcgtaga 660
tattcgcaag aacacccgtg gcgaaggcgg ccaactggac cattactgac gctgaggcgc 720
gaaagcgtgg ggagcaaaaca ggattagata ccctggtagt ccacgccgta aacgatgaat 780
gccagctgtt ggggtgcttg caccgcagta gcgcagctaa cgctttgagc attccgcctg 840
gggagtgacg tcgcaagatt aaaactcaaa ggaattgacg ggggcccgca caagcgggtg 900
agcatgtggt ttaattcgaa gcaacgcgca gaaccttacc atcctttgac atggcggtgt 960
acccagagag atctggggtc cccttcgggg gcgcgcacac aggtgctgca tggctgtcgt 1020
cagctcgtgt cgtgagatgt tgggttaagt cccgcaacga gcgcaaccca cgtccttagt 1080
tgccatcatt acttggggca ctctaggagg actgccggtg ataagccgag aggaaggtgt 1140
ggatgacgtc aagtcctcat ggcctttacg ggaatgggcta cacacgtgct acaatggcgg 1200
tgacagtggg aggcgaagga gcgatctgga gcaaattccc aaaagccgtc tcagttcgga 1260
ttgcaactctg caactcgagt gcatgaaggc ggaatcgcta gtaatcgtag atcagcatgc 1320
cacggtgaat acgttcccgg gccttgata caccgccgtg cacaccatgg gagttggtct 1380
taccgcagcg cgctgcgcca accgcaagg 1409
<210> 14
<211> 1339
<212> ADN
<213> Methylobacterium L2-76
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (56)..(56)
<223> n là a, c, g, hoặc t
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (60)..(60)
<223> n là a, c, g, hoặc t
<400> 14
tgcagtcgaa cgggcttctt cggaagtcag tggcagacgg gtgagtaaca cgtggnaacn 60
tgcccttcgg ttcggaataa ctcagggaac cttgagctaa taccggatac gcccttatgg 120
ggaaaagggtt actgccgaag gatcgcccg cgtctgatta gcttgttggg ggggtaacgg 180
cctaccaagg cgacgatcag tagctgtgtc gagaggatga tcagccacac tgggactgag 240
acacggccca gactcctacg ggaggcagca gtggggaata ttggacaatg ggcgcaagcc 300
tgatccagcc atgccgcgtg agtgaatga gccttagggt tgtaaagctc ttttgtccgg 360
gacgataatg acggtaccgg aagaataaag cccggctaac ttcgtgccag cagccgcgtg 420
aatacgaagg gggctagcgt tgctcggaat cactgggcgt aaagggcgcg taggcggccg 480
attaagtcgg ggggtgaaagc ctgtggctca accacagaat tgcccttcgat actggttggc 540
ttgagaccgg aagaggacag cggaaactgc agtgaatagg tgaaattcgt agatattcgc 600
aagaacacca ctggcgaag cggctgtctg gtccggttct gacgctgagg cgcgaaagcg 660
tggggagcaa acaggattag ataccctggt agtccacgcc gtaaaccgat aatgccagcc 720
gttgccctgc ttgcaggtca gtggcgccgc taacgcatta agcattccgc ctggggagta 780
cggtcgcaag attaaaactc aaaggaattg acgggggccc gcacaagcgg tggagcatgt 840
ggtttaattc gaagcaacgc gcgaacactt accatccctt gacatggcat gttacctcga 900
gagatcgggg atcctcttcg gaggcgtgca cacaggtgct gcatggctgt cgtcagctcg 960
tgtcgtgaga tggttgggta agtcccgcaa cgagcgcaac ccacgtcctt agttgccatc 1020
attcagttgg gcaactctag gagactgccg gtgataagcc gcgaggaagg tgtggatgac 1080
gtcaaagtcct catggccctt acgggatggg ctacacacgt gctacaatgg cggtgacagt 1140
gggacgcgaa accgcgaggt tgagcaaatc cccaaaagcc gtctcagttc ggattgcact 1200
ctgcaactcg ggtgcatgaa ggcggaatcg ctagtaatcg tggatcagca cgccacgggtg 1260
aatacgttcc cgggccttgt acacaccgcc cgtcacacca tgggagttgg tcttaccgca 1320
cggcgctgcg ccaaccgca 1339
<210> 15
<211> 18
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi đặc hiệu gen ARN ribosom 16S
<400> 15
agagtttgat cmtggctc 18
<210> 16
<211> 16
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi đặc hiệu gen ARN ribosom 16S
<400> 16
taccttggtta cgactt 16
<210> 17
<211> 18
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi đặc hiệu gen ARN ribosom 16S
<400> 17
ggattagata ccctggta 18
<210> 18
<211> 19
<212> ADN

```

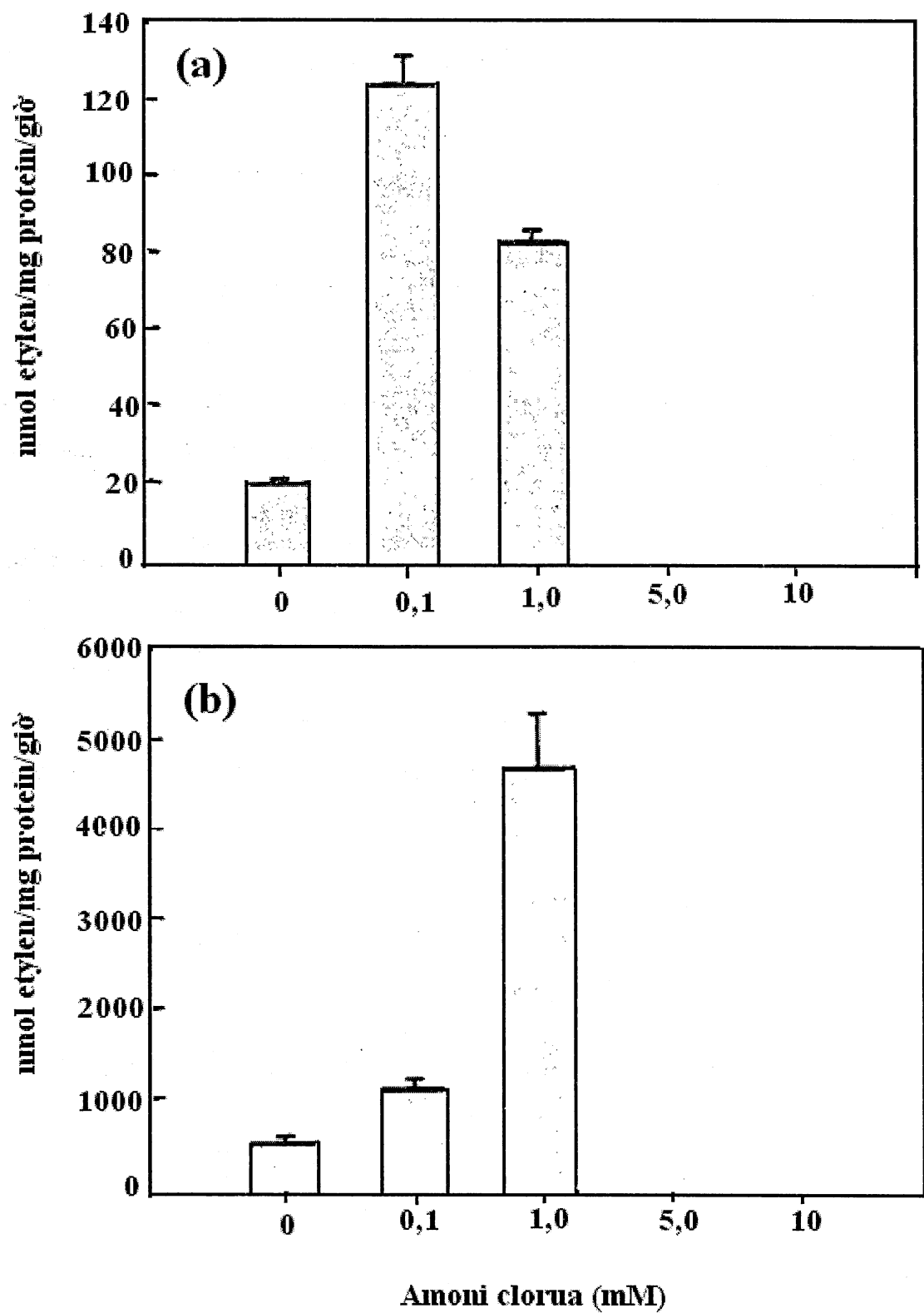
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi đặc hiệu gen ARN ribosom 16S
<400> 18
gtattaccgc ggctgctgg 19
<210> 19
<211> 15
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi đặc hiệu gen ARN ribosom 16S
<400> 19
gggttgcgct cgttg 15

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm vi sinh để bón cho thực vật, chứa lượng hữu hiệu dịch cấy vi khuẩn thuần khiết sinh học chứa ít nhất một loài vi khuẩn, các ion kim loại vi lượng và chất mang, trong đó: các ion kim loại vi lượng được chọn từ nhóm bao gồm ion molybden (Mo^{2+}), ion sắt (Fe^{2+}), ion mangan (Mn^{2+}) hoặc hỗn hợp bất kỳ của chúng; chất mang được chọn từ nhóm bao gồm polyme sinh học, đường, sữa động vật, vật liệu thực vật và chất mang hóa học trơ xốp; ít nhất một loài vi khuẩn là loài *Enterobacter* R4-368 (NRRL B-50631); và các loài vi khuẩn này có tác dụng khử axetylen thành etylen hoặc nitơ trong không khí (N_2) thành amoniac (NH_3) và cải thiện năng suất thực vật khi chế phẩm vi sinh này được bón cho thực vật.
2. Chế phẩm vi sinh theo điểm 1, trong đó quá trình khử này diễn ra ở bề mặt lá, bên trong bề mặt lá, bên trong mô rễ hoặc trên bề mặt hệ rễ.
3. Chế phẩm vi sinh theo điểm 1, trong đó quá trình khử này diễn ra ở thực vật được chọn từ các loài thuộc chi dầu mè (*Jatropha*), lúa miến (*Sorghum*), bông (*Gossypium*), cọ dầu (*Elaeis*), thầu dầu (*Ricinus*), lúa (*Oryza*) và sắn (*Manihot*).
4. Chế phẩm vi sinh theo điểm 1, trong đó chế phẩm vi sinh này còn chứa các loài vi khuẩn được chọn từ nhóm bao gồm *Pleomorphomonas jatrophae* R5-392 (NRRL B-50630); *Methylobacterium* sp. L2-4 (NRRL B-50628); *Methylobacterium* sp. L2-76 (NRRL B-50629); *Sphingomonas* sp. S6-274 (NRRL B-50632) và hỗn hợp bất kỳ của chúng.
5. Chế phẩm vi sinh theo điểm 4, trong đó chế phẩm vi sinh này chứa các ion kim loại vi lượng với hàm lượng nằm trong khoảng từ 0,1mM đến 50mM.
6. Chế phẩm vi sinh theo điểm 1, trong đó các loài vi khuẩn này tiết ra polysacarit ngoại bào (exopolysaccharide - EPS) hoặc endoglucanaza.
7. Chế phẩm vi sinh theo điểm 1, trong đó chế phẩm vi sinh này chứa các ion kim loại vi lượng với hàm lượng nằm trong khoảng từ 0,1mM đến 50mM.
8. Phương pháp cải thiện năng suất thực vật, bao gồm bước bón lượng hữu hiệu của chế phẩm vi sinh theo điểm 1 cho thực vật.
9. Phương pháp theo điểm 8, trong đó chế phẩm vi sinh này được phun lên phần trên mặt đất của thực vật.

10. Phương pháp theo điểm 8, trong đó chế phẩm vi sinh này được bón bằng cách bón lót vào các luống gieo hạt, tưới vào hệ rễ của thực vật trong đất, nhúng rễ vào chế phẩm vi sinh này hoặc ủ với hạt giống.
11. Phương pháp theo điểm 8, trong đó chế phẩm vi sinh này chứa các ion kim loại vi lượng với hàm lượng nằm trong khoảng từ 0,1mM đến 50mM.
12. Phương pháp theo điểm 11, trong đó chế phẩm vi sinh này được phun lên phần trên mặt đất của thực vật.
13. Phương pháp theo điểm 8, trong đó năng suất thực vật bao gồm sự tăng trưởng thực vật, duy trì hàm lượng chất diệp lục cao trong lá, tăng sản lượng quả hoặc hạt, tăng trọng lượng quả hoặc hạt hoặc tổ hợp bất kỳ của các đặc tính này.
14. Phương pháp theo điểm 8, trong đó thực vật này là các loài thuộc chi dầu mè (*Jatropha*), lúa miến (*Sorghum*), bông (*Gossypium*), cọ dầu (*Elaeis*), thầu dầu (*Ricinus*), lúa (*Oryza*) hoặc sắn (*Manihot*).
15. Phương pháp theo điểm 11, trong đó năng suất thực vật bao gồm sự tăng trưởng thực vật, duy trì hàm lượng chất diệp lục cao trong lá, tăng sản lượng quả hoặc hạt, tăng trọng lượng quả hoặc hạt hoặc tổ hợp bất kỳ của các đặc tính này.
16. Phương pháp theo điểm 11, trong đó thực vật này là các loài thuộc chi dầu mè (*Jatropha*), lúa miến (*Sorghum*), bông (*Gossypium*), cọ dầu (*Elaeis*), thầu dầu (*Ricinus*), lúa (*Oryza*) hoặc sắn (*Manihot*).
17. Phương pháp cải thiện năng suất thực vật, bao gồm bước bón lượng hữu hiệu của chế phẩm vi sinh theo điểm 4 cho thực vật.
18. Phương pháp theo điểm 17, trong đó năng suất thực vật bao gồm sự tăng trưởng thực vật, duy trì hàm lượng chất diệp lục cao trong lá, tăng sản lượng quả hoặc hạt, tăng trọng lượng quả hoặc hạt hoặc tổ hợp bất kỳ của các đặc tính này.
19. Phương pháp theo điểm 17, trong đó thực vật này là các loài thuộc chi dầu mè (*Jatropha*), lúa miến (*Sorghum*), bông (*Gossypium*), cọ dầu (*Elaeis*), thầu dầu (*Ricinus*), lúa (*Oryza*) hoặc sắn (*Manihot*).
20. Phương pháp theo điểm 17, trong đó chế phẩm vi sinh này được phun lên phần trên mặt đất của thực vật.

21. Phương pháp theo điểm 17, trong đó chế phẩm vi sinh này được bón bằng cách bón lót vào các luống gieo hạt, tưới vào hệ rễ của thực vật trong đất, nhúng rễ vào chế phẩm vi sinh này hoặc ủ với hạt giống.
22. Phương pháp theo điểm 17, trong đó chế phẩm vi sinh này chứa các ion kim loại vi lượng với hàm lượng nằm trong khoảng từ 0,1mM đến 50mM.
23. Phương pháp theo điểm 22, trong đó chế phẩm vi sinh này được phun lên phần trên mặt đất của thực vật.
24. Phương pháp theo điểm 22, trong đó năng suất thực vật bao gồm sự tăng trưởng thực vật, duy trì hàm lượng chất diệp lục cao trong lá, tăng sản lượng quả hoặc hạt, tăng trọng lượng quả hoặc hạt hoặc tổ hợp bất kỳ của các đặc tính này.
25. Phương pháp theo điểm 22, trong đó thực vật này là các loài thuộc chi dầu mè (*Jatropha*), lúa miến (*Sorghum*), bông (*Gossypium*), cọ dầu (*Elaeis*), thầu dầu (*Ricinus*), lúa (*Oryza*) hoặc sắn (*Manihot*).
26. Phương pháp theo điểm 22, trong đó chế phẩm vi sinh này được bón bằng cách bón lót vào các luống gieo hạt, tưới vào hệ rễ của thực vật trong đất, nhúng rễ vào chế phẩm vi sinh này hoặc ủ với hạt giống.

**Fig.1**

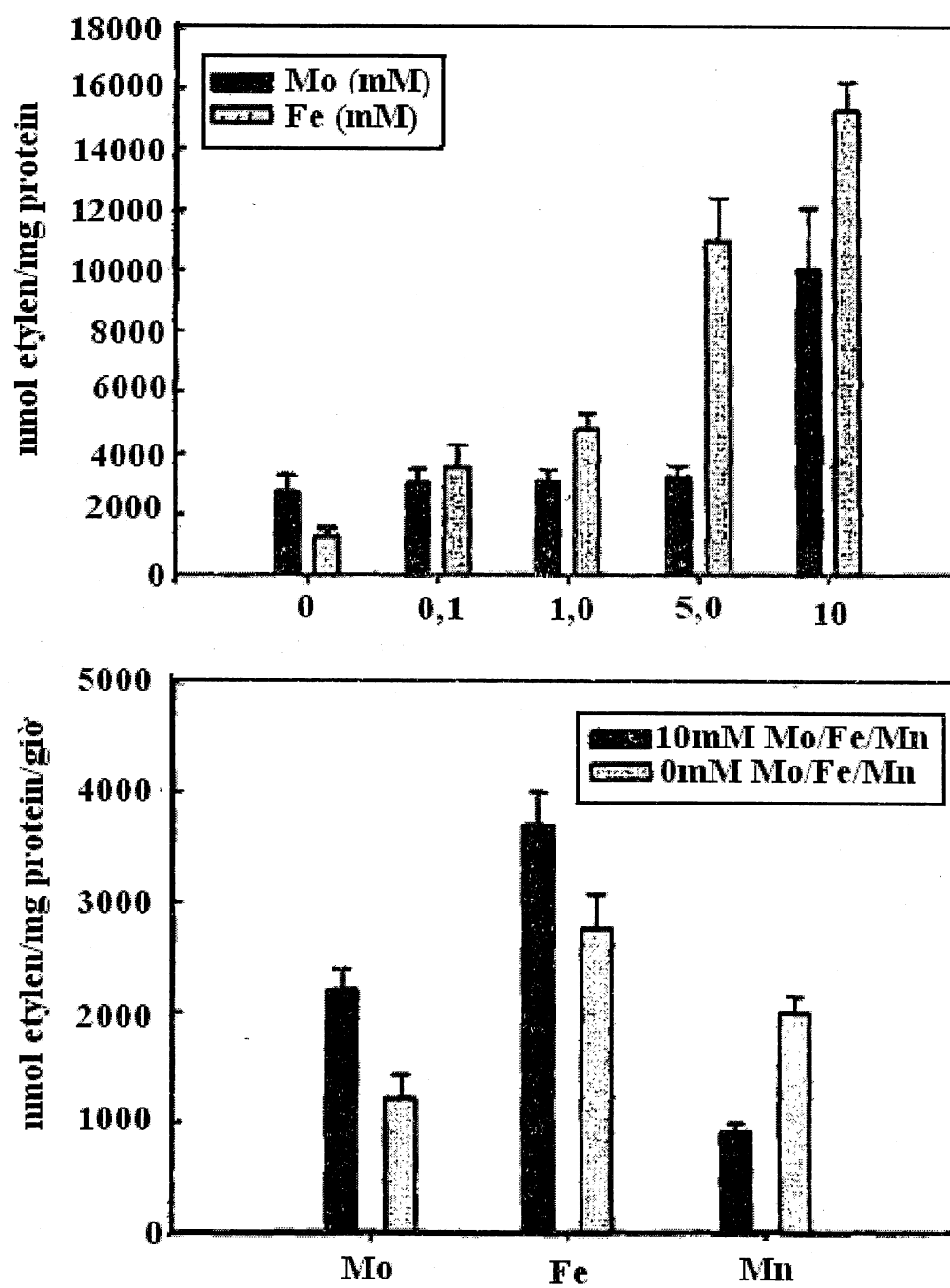


Fig.2

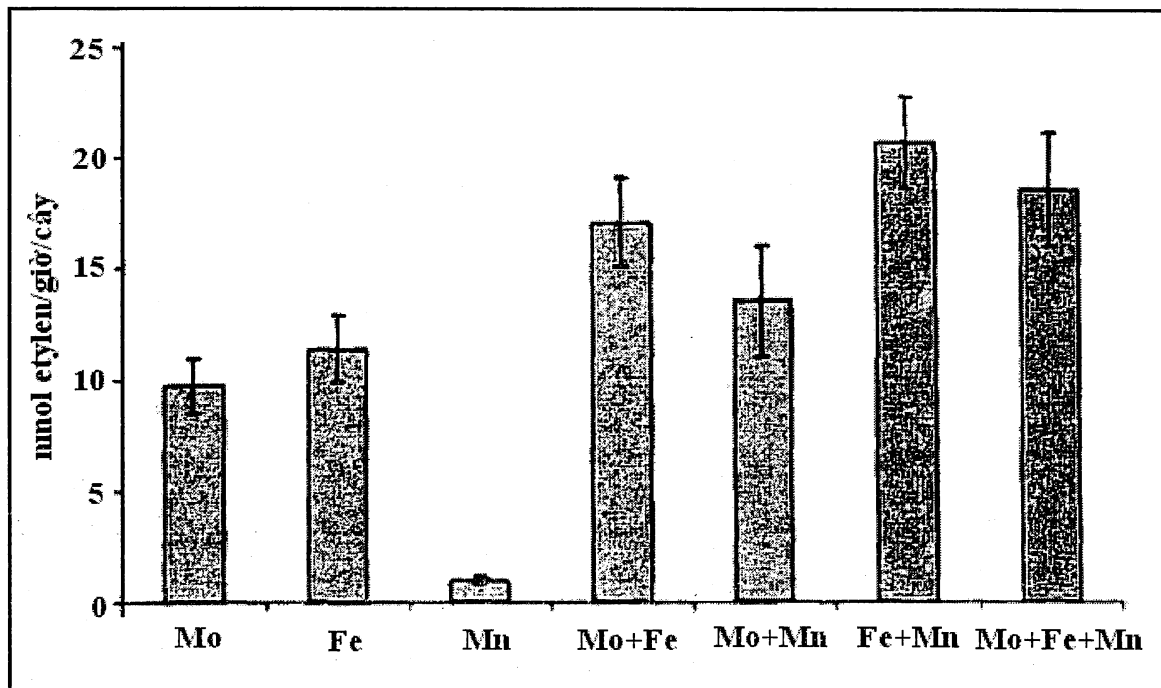
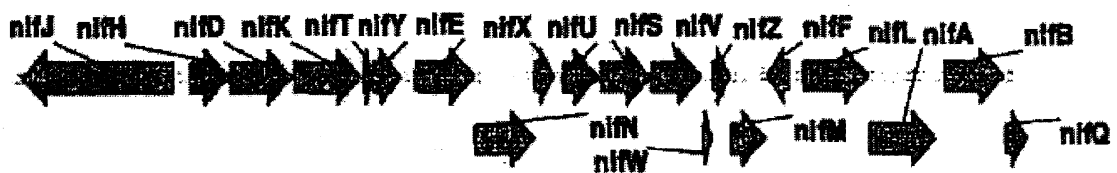
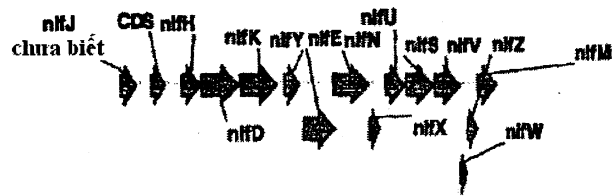


Fig.3



X13303
24206 cặp bazơ

Fig.4a



Cụm gen Nif liên hệ R4-368
31707 cặp bazơ

Fig.4b

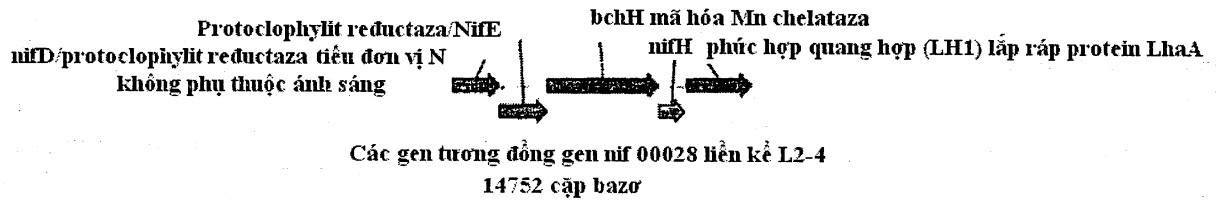


Fig.5

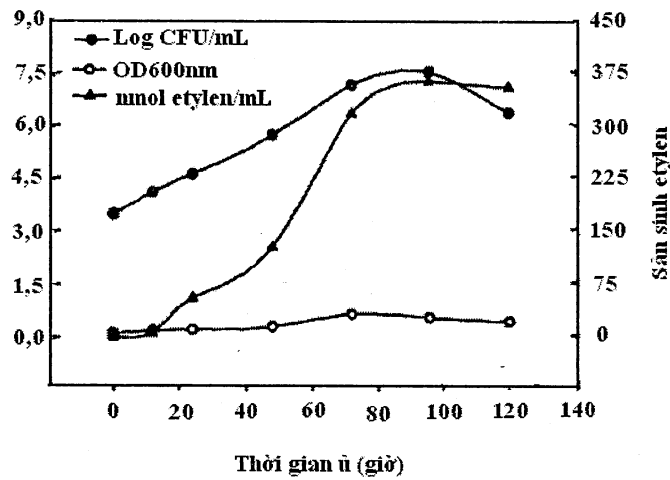
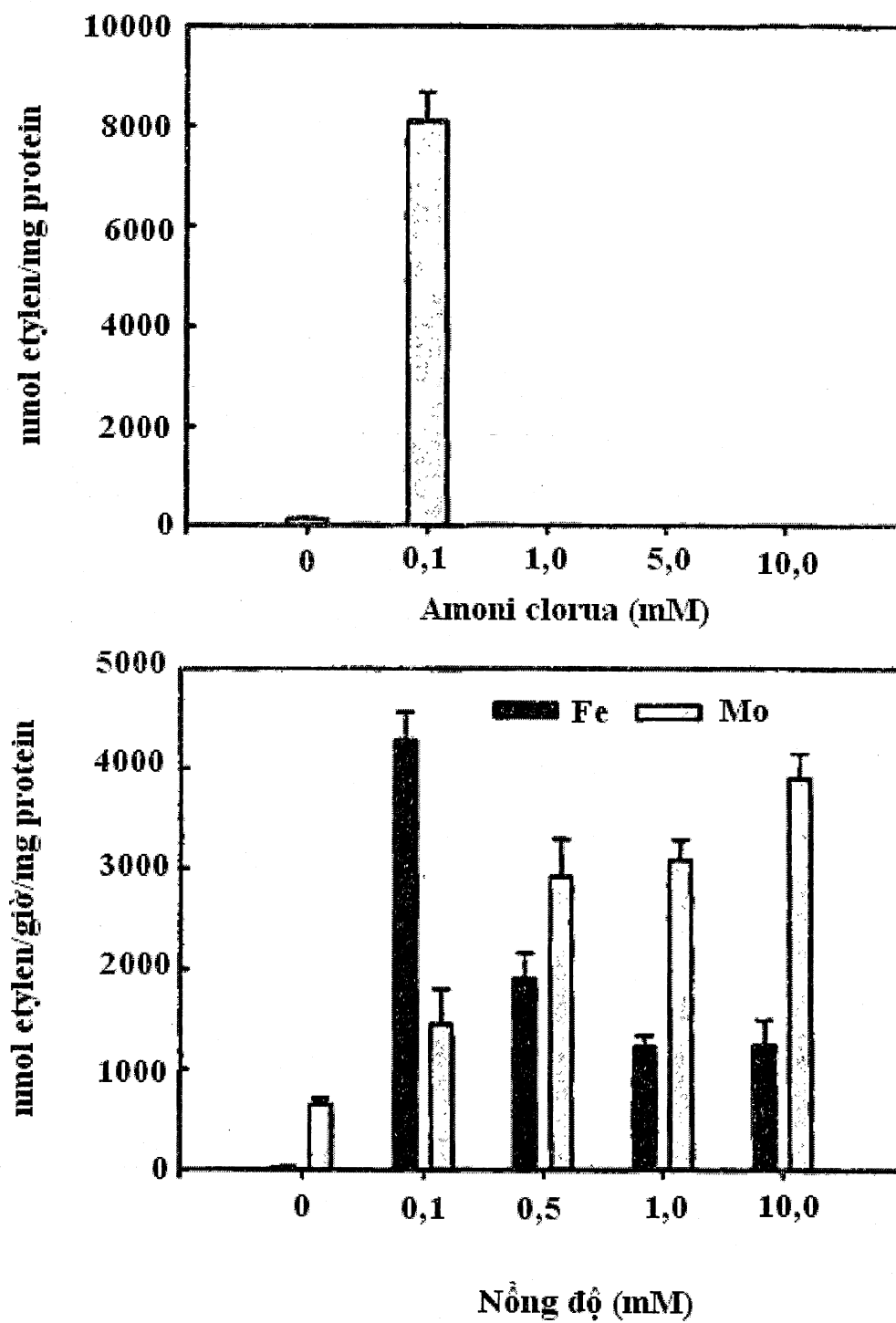


Fig.6a

**Fig.6b**