



(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)



1-0030865

(51)⁸ A01H 1/00; A01H 3/04; A01H 1/02

(13) B

(21) 1-2018-00276

(22) 14/07/2016

(86) PCT/US2016/042217 14/07/2016

(87) WO2017/015043 26/01/2017

(30) 62/195,546 22/07/2015 US

(45) 25/01/2022 406

(43) 25/06/2018 363A

(73) MONSANTO TECHNOLOGY LLC (US)

800 North Lindbergh Blvd., St. Louis, MO 63167, United States of America

(72) HUANG, Jintai (US); QI, Youlin (US); YANG, Heping (CN); ZHANG, Yuanji (US).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) PHÂN TỬ ADN TÁI TỔ HỢP CHỨA YẾU TỐ ĐÍCH MTS-SIARN, PHƯƠNG PHÁP TẠO RA PHÂN TỬ ADN NÀY VÀ PHƯƠNG PHÁP ĐIỀU HÒA CHỌN LỌC SỰ BIỂU HIỆN CỦA PROTEIN TRONG MÔ SINH SẢN ĐỰC CỦA CÂY CHUYỂN GEN CHỨA PHÂN TỬ ADN NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến các phân tử ADN tái tổ hợp mới, chế phẩm và phương pháp điều hòa chọn lọc sự biểu hiện của phân tử polynucleotit có khả năng phiên mã hoặc protein tái tổ hợp trong mô sinh sản đực của cây chuyển gen. Sáng chế cũng đề cập đến các cây chuyển gen, tế bào cây, bộ phận cây, hạt, và sản phẩm hàng hóa chứa phân tử ADN và chế phẩm này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Nói chung, sáng chế đề cập đến lĩnh vực nông nghiệp, nhân giống cây trồng và sinh học phân tử. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến các phương pháp và chế phẩm để điều hòa chọn lọc sự biểu hiện protein trong mô sinh sản đực của các cây chuyển gen và sử dụng chúng.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Hạt lai được tạo ra bằng cách lai hoặc thụ phấn chéo các cây có quan hệ gần và có thể được phát triển thành cây lai con mang tổ hợp các tính trạng mong muốn không có ở cây bố mẹ. Cây lai có thể thể hiện các đặc điểm nông học tốt hơn như cải thiện về kích thước cây, sản lượng, thành phần dinh dưỡng, khả năng kháng bệnh, kháng thuốc diệt cỏ, khả năng chịu được áp lực, khả năng thích nghi với khí hậu, và các tính trạng mong muốn khác. Để đạt được sản lượng hạt lai cao đòi hỏi phần hoa của một cây không được phép tự thụ phấn với chính cây đó. Hạn chế lớn nhất đối với quá trình sản xuất hạt lai ở nhiều loại cây trồng là thiếu các phương pháp đơn giản, đáng tin cậy và kinh tế để tạo ra các cây bắt thụ đực và không có khả năng tự thụ phấn.

Trong quá trình sản xuất hạt lai, sự tạo thành phần hoa và sự phát tán phần hoa có thể được ngăn chặn ở cây đực để tạo điều kiện cho sự thụ phấn chéo của cây đực chứ không phải là sự tự thụ phấn. Có thể tiến hành ngăn chặn bằng cách loại bỏ bằng tay các tổ chức chứa phần hoa chẳng hạn (ví dụ, bằng cách loại bỏ cụm hoa bằng tay hoặc bằng máy ở cây ngô), sử dụng biện pháp di truyền kiểm soát quá trình thụ phấn (ví dụ, bằng cách sử dụng công nghệ bắt thụ đực tế bào chất hoặc bắt thụ đực nhân), sử dụng tác nhân hóa học, hoặc tổ hợp bất kỳ các biện pháp này. Đây có thể là một quy trình cần nhiều nhân công và do đó chi phí sẽ đắt. Ở cây ngô, ví dụ, việc loại bỏ cụm hoa thường được tiến hành bằng hai bước: loại bỏ cụm hoa bằng máy sau đó loại bỏ cụm hoa bằng tay. Việc sản xuất thương mại hạt lai chỉ sử dụng các chất diệt giao tử hóa học chủ yếu bị hạn chế bởi tình trạng thiếu chung sự chọn lọc giao tử và tác động của chúng đến các bộ phận khác của cây trồng. Do đó, các phương pháp cải thiện năng suất của quá trình sản xuất hạt lai vẫn có nhu cầu cao.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Nói chung, sáng chế đề cập đến việc cải tiến phương pháp điều hòa chọn lọc sự biểu hiện protein trong mô sinh sản đực của các cây chuyển gen, các phân tử ADN tái tổ hợp hữu dụng trong các phương pháp này, cũng như là các cây chuyển gen, các tế bào và hạt chứa các phân tử ADN tái tổ hợp này. Sáng chế đề cập đến sự cải tiến so với giải pháp kỹ thuật đã biết bằng cách tạo ra các yếu tố đích mts-siARN đặc hiệu mô đực (mts-siARN) có khả năng tạo ra sự điều hòa chọn lọc tốt hơn sự biểu hiện của protein được mã hóa bởi phân tử polynucleotit có khả năng phiên mã và sáng chế cũng đề cập đến các phân tử ADN tái tổ hợp và chế phẩm chứa các yếu tố đích mts-siARN này và phương pháp sử dụng các yếu tố đích mts-siARN này để tạo ra tính bất thụ đực ở các cây chuyển gen để sản xuất hạt lai.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến phân tử ADN tái tổ hợp chứa yếu tố đích mts-siARN được liên kết chức năng với phân tử polynucleotit có khả năng phiên mã khác nguồn gốc. Theo một phương án, yếu tố đích mts-siARN được bao gồm trong vùng không được dịch mã 3' được liên kết chức năng với phân tử polynucleotit có khả năng phiên mã khác nguồn gốc. Theo một phương án khác, yếu tố đích mts-siARN được đặt vào vị trí giữa phân tử polynucleotit có khả năng phiên mã khác nguồn gốc và trình tự polyadenyl hóa được liên kết chức năng mà là một phần của vùng không được dịch mã 3'. Theo một phương án, yếu tố đích mts-siARN bao gồm trình tự được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 1-16, 23-92, và các trình tự bổ sung của chúng. Theo một phương án khác, phân tử polynucleotit có khả năng phiên mã khác nguồn gốc tạo ra tính kháng thuốc diệt cỏ, ví dụ tính kháng thuốc diệt cỏ sinh dưỡng, cho cây trồng. Theo một phương án khác, phân tử polynucleotit có khả năng phiên mã khác nguồn gốc không tạo ra tính kháng thuốc diệt cỏ sinh sản đực cho cây trồng. Theo một phương án khác, phân tử polynucleotit có khả năng phiên mã khác nguồn gốc là 5-enolpyruvyl shikimat 3-phosphat syntaza (EPSPS) kháng glyphosat.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến cấu trúc ADN tái tổ hợp chứa yếu tố đích mts-siARN theo sáng chế được liên kết chức năng với phân tử polynucleotit có khả năng phiên mã khác nguồn gốc.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp tổng hợp phân tử ADN tái tổ hợp bao gồm liên kết chức năng ít nhất một yếu tố đích mts-siARN với phân tử polynucleotit có khả năng phiên mã khác nguồn gốc. Theo một phương án, yếu tố đích

mts-siARN bao gồm trình tự được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 1-16, 23-92, và các trình tự bổ sung của chúng.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến cây chuyển gen chứa yếu tố đích mts-siARN theo sáng chế. Theo một phương án, cây chuyển gen chứa yếu tố đích mts-siARN được liên kết chức năng với phân tử polynucleotit có khả năng phiên mã khác nguồn gốc. Theo một phương án khác, yếu tố đích mts-siARN bao gồm trình tự được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 1-16, 23-92, và các trình tự bổ sung của chúng. Theo một phương án khác nữa, cây chuyển gen được tạo ra bằng cách biến nạp phân tử ADN tái tổ hợp hoặc cấu trúc ADN chứa ít nhất một yếu tố đích mts-siARN được liên kết chức năng với phân tử polynucleotit có khả năng phiên mã khác nguồn gốc vào cây. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến hạt, tế bào hoặc bộ phận của cây chuyển gen này. Theo một phương án, cây này là cây một lá mầm. Theo một phương án khác, cây này là cây ngô (*Zea mays*).

Theo một khía cạnh khác, sáng chế cũng đề cập đến phương pháp điều hòa chọn lọc sự biểu hiện protein trong mô sinh sản đực của cây chuyển gen bằng cách biểu hiện phân tử ADN tái tổ hợp chứa yếu tố đích mts-siARN được liên kết chức năng với phân tử polynucleotit có khả năng phiên mã khác nguồn gốc trong cây chuyển gen. Theo một phương án, yếu tố đích mts-siARN bao gồm trình tự được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 1-16, 23-92, và các trình tự bổ sung của chúng. Theo một phương án khác, phân tử polynucleotit có khả năng phiên mã khác nguồn gốc tạo ra tính kháng thuốc diệt cỏ, ví dụ tính kháng thuốc diệt cỏ sinh dưỡng, cho cây trồng. Theo một phương án khác, phân tử polynucleotit có khả năng phiên mã khác nguồn gốc không tạo ra tính kháng thuốc diệt cỏ sinh sản đực cho cây trồng. Theo một phương án khác, phân tử polynucleotit có khả năng phiên mã khác nguồn gốc là EPSPS kháng glyphosat.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề cập đến phương pháp tạo ra tính bất thụ đực ở cây chuyển gen, bao gồm bước phun thuốc diệt cỏ lên cây chuyển gen mà có phân tử ADN tái tổ hợp chứa yếu tố đích mts-siARN được liên kết chức năng với phân tử polynucleotit có khả năng phiên mã khác nguồn gốc trong bộ gen của nó mà tạo ra tính kháng ít nhất một thuốc diệt cỏ thứ nhất cho cây chuyển gen, trong đó thuốc diệt cỏ được phun trước hoặc đồng thời với sự phát triển mô sinh sản đực của cây chuyển gen, nhờ đó tạo ra tính bất thụ đực ở cây chuyển gen. Theo một phương án, phân tử polynucleotit có khả năng phiên mã khác nguồn gốc tạo ra tính kháng thuốc diệt cỏ sinh dưỡng, nhưng

không tạo ra tính kháng thuốc diệt cỏ sinh sản đực cho cây chuyển gen. Theo một phương án khác, cây chuyển gen là cây ngô. Theo một phương án khác, việc phun thuốc diệt cỏ ít nhất ngăn chặn sự phát triển phần hoa, sự phát tán phần hoa, hoặc sự nhô ra của bao phấn ở cây chuyển gen được xử lý. Theo một phương án khác, giai đoạn phát triển của mô sinh sản đực khi phun thuốc diệt cỏ là giai đoạn được chọn từ nhóm gồm giai đoạn V4, V5, V6, V7, V8, V9, V10, V11, V12, V13 và V14 của sự phát triển cây ngô. Theo một phương án khác, thuốc diệt cỏ này được chọn từ nhóm gồm các chất ức chế axetyl coenzym A carboxylaza (ACCaza), chất ức chế axetolactat synthaza (ALS), chất ức chế hệ thống quang II (PSII), chất ức chế protoporphyrinogen oxidaza (PPO), chất ức chế 4-hydroxyphenyl dioxygenaza (HPPD), chất ức chế 5-enolpyruvyl shikimat 3-phosphat synthaza (EPSPS), chất ức chế glutamin synthetaza (GS), và auxin tổng hợp. Theo một phương án khác, thuốc diệt cỏ là glyphosat và polynucleotit có khả năng phiên mã khác nguồn gốc mã hóa EPSPS kháng glyphosat.

Theo một khía cạnh, sáng chế cũng đề cập đến phương pháp sản xuất hạt lai bao gồm phun một lượng hữu hiệu thuốc diệt cỏ lên cây chuyển gen chứa phân tử ADN tái tổ hợp chứa yếu tố đích mts-siARN được liên kết chức năng với phân tử polynucleotit có khả năng phiên mã khác nguồn gốc trong bộ gen của nó, trong đó thuốc diệt cỏ được phun trước hoặc đồng thời với giai đoạn phát triển mô sinh sản đực của cây chuyển gen, nhờ đó tạo ra tính bất thụ đực ở cây chuyển gen; thụ phấn cây chuyển gen với phần hoa của một cây thứ hai; và để cây chuyển gen tạo hạt lai. Theo một phương án, cây chuyển gen là cây ngô. Theo một phương án khác, thuốc diệt cỏ là glyphosat và phân tử polynucleotit có khả năng phiên mã khác nguồn gốc là EPSPS kháng glyphosat. Theo một phương án khác, glyphosat được phun đồng thời với sự phát triển cây với lượng hữu hiệu nằm trong khoảng từ 0,125 pao (0,06kg) đương lượng axit trên mỗi mẫu Anh (0,4ha) (ae/acre) đến 8 pao (3,63kg) đương lượng axit trên mỗi mẫu Anh (0,4ha). Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến hạt lai được sản xuất bằng phương pháp này. Theo một phương án, hạt lai chứa phân tử ADN tái tổ hợp.

Các phương án cụ thể khác theo sáng chế được bộc lộ trong phần mô tả chi tiết dưới đây. Trong phần mô tả và yêu cầu bảo hộ, trừ khi được quy định theo cách khác, thuật ngữ “chứa” và các thuật ngữ biến thể của nó, như “chứa” và “việc chứa”, sẽ được hiểu là bao gồm số nguyên, yếu tố, hoặc bước hoặc nhóm số nguyên, yếu tố hoặc bước

được nêu, nhưng không loại trừ số nguyên, yếu tố, hoặc bước hoặc nhóm số nguyên, yếu tố hoặc bước khác bất kỳ.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Fig.1. Thể hiện các giai đoạn phát triển cụm hoa V7 ở T2, V8/V9 ở T4, V10/V11 ở T5, V12 ở T6, và VT ở T7 thể hiện kích thước và hình thái cụm hoa trong đó các ảnh panô phía dưới thể hiện mặt cắt ngang của bao phấn thể hiện giai đoạn phát triển phấn hoa. Các giai đoạn trước đó (V10/V11 và V12) được sử dụng trong giải pháp đã biết để phân lập các phân tử ARN nhỏ để xác định các phân tử mts-siARN được thể hiện bằng ô nét liền; các giai đoạn (V7, V8/V9, V10/V11 và V12) được mô tả ở đây để phân lập các phân tử ARN nhỏ được thể hiện bằng ô nét đứt.

Fig.2. Thể hiện bằng sơ đồ sự sắp thẳng hàng các trình tự mts-siARN trên trình tự cADN được đề cập ở dạng SEQ ID NO: 17. Trình tự cADN được thể hiện từ nucleotit 1 đến 1826, và các đường ngắn thể hiện sự sắp thẳng hàng của mạch bổ sung của từng trình tự mts-siARN, hoặc các trình tự đuôi của các trình tự mts-siARN liền kề hoặc các trình tự mts-siARN chồng lợp (các đường dài hơn tương ứng) so với trình tự cADN. Các trình tự mts-siARN mà mạch giống cADN không được thể hiện. Mức biểu hiện tương đối được chuẩn hóa của mts-siARN được thể hiện ở bên trái. Vùng được đóng khung là vùng của trình tự cADN giàu các phân tử đích mts-siARN.

Fig.3. Biểu đồ thể hiện mts-siARN mạch kép, mts-siARN mạch đơn, trình tự đích mts-siARN trong mARN, và một vùng của mARN có số trình tự đích mts-siARN cao hữu dụng làm yếu tố đích mts-siARN.

Fig.4. Thể hiện ảnh của cụm hoa ngô R0 và phấn hoa từ các cây chuyển gen mang hai bản sao chứa phân tử ADN tái tổ hợp chứa gen chuyển mã hóa protein EPSPS kháng glyphosat được liên kết chức năng với yếu tố đích mts-siARN (SEQ ID NO: 2) được nhuộm bằng thuốc nhuộm Alexandar. Các sự kiện 1 đến 4 được phun 0,75lb ae/acre thuốc diệt cỏ glyphosat ở giai đoạn V5 sau đó là giai đoạn V8 và thể hiện các cụm hoa có tính bất thụ đực hoàn toàn như được xác định bởi sự không nở hoa và các hạt phấn hoa không có sức sống hoặc không thấy có hạt phấn trong bao phấn. Các cây đối chứng không được phun glyphosat và có thời kì ra hoa và sự phát tán phấn hoa bình thường và quan sát dưới kính hiển vi phát hiện thấy các hạt phấn hoa bình thường.

Mô tả vắn tắt các trình tự

SEQ ID NO: 1 - Trình tự yếu tố đích mts-siARN có 95% trình tự đồng nhất với các vị trí nucleotit 1429 đến 1628 của trình tự cADN được thể hiện ở đây dưới dạng SEQ ID NO: 17.

SEQ ID NO: 2 - Trình tự yếu tố đích mts-siARN có 95% trình tự đồng nhất với các vị trí nucleotit 1429 đến 1628 của trình tự cADN được thể hiện ở đây dưới dạng SEQ ID NO: 17 và có thay đổi một nucleotit (T69A) so với SEQ ID NO: 1.

SEQ ID NO: 3 - Trình tự yếu tố đích mts-siARN tương ứng với các vị trí nucleotit 239 đến 433 của trình tự cADN được thể hiện ở đây dưới dạng SEQ ID NO: 18.

SEQ ID NO: 4 - Trình tự yếu tố đích mts-siARN tương ứng với các vị trí nucleotit 477 đến 697 của trình tự cADN được thể hiện ở đây dưới dạng SEQ ID NO: 18.

SEQ ID NO: 5 - Trình tự yếu tố đích mts-siARN tương ứng với các vị trí nucleotit 239 đến 433 của trình tự cADN được thể hiện ở đây dưới dạng SEQ ID NO: 19.

SEQ ID NO: 6 - Trình tự yếu tố đích mts-siARN tương ứng với các vị trí nucleotit 370 đến 477 của trình tự cADN được thể hiện ở đây dưới dạng SEQ ID NO: 19.

SEQ ID NO: 7 - Trình tự yếu tố đích mts-siARN tương ứng với các vị trí nucleotit 1357 đến 1562 của trình tự cADN được thể hiện ở đây dưới dạng SEQ ID NO: 20.

SEQ ID NO: 8 - Trình tự yếu tố đích mts-siARN tương ứng với các vị trí nucleotit 247 đến 441 của trình tự cADN được thể hiện ở đây dưới dạng SEQ ID NO: 21.

SEQ ID NO: 9 - Mạch bổ sung ngược của trình tự yếu tố đích mts-siARN có 99% trình tự đồng nhất với các vị trí nucleotit 191 đến 490 của trình tự cADN được thể hiện ở đây dưới dạng SEQ ID NO: 22 với ba nucleotit bất cặp nhằm (C314A, A350G, và G408A).

SEQ ID NO: 10-16 - Các trình tự yếu tố đích mts-siARN tái tổ hợp.

SEQ ID NO: 17 - trình tự cADN chứa ít nhất một vùng giàu trình tự đích mts-siARN. Chứa các trình tự yếu tố đích mts-siARN được thể hiện bởi SEQ ID NO: 1 và SEQ ID NO: 2 và sắp thẳng hàng với các trình tự mts-siARN SEQ ID NO: 23-31.

SEQ ID NO: 18 - trình tự cADN chứa ít nhất một vùng giàu trình tự đích mts-siARN. Chứa các trình tự yếu tố đích mts-siARN được thể hiện bởi SEQ ID NO: 3 và SEQ ID NO: 4 và sắp thẳng hàng với các trình tự mts-siARN SEQ ID NO: 32-42.

SEQ ID NO: 19 - trình tự cADN chứa ít nhất một vùng giàu trình tự đích mts-siARN. Chứa các trình tự yếu tố đích mts-siARN được thể hiện bởi SEQ ID NO: 5 và SEQ ID NO: 6 và sắp thẳng hàng với các trình tự mts-siARN SEQ ID NO: 43-52.

SEQ ID NO: 20 - trình tự cADN chứa ít nhất một vùng giàu trình tự đích mts-siARN. Chứa trình tự yếu tố đích mts-siARN được thể hiện bởi SEQ ID NO: 7 và sắp thẳng hàng với các trình tự mts-siARN SEQ ID NO: 53-60.

SEQ ID NO: 21 - trình tự cADN chứa ít nhất một vùng giàu trình tự đích mts-siARN. Chứa trình tự yếu tố đích mts-siARN được thể hiện bởi SEQ ID NO: 8 và sắp thẳng hàng với các trình tự mts-siARN SEQ ID NO: 61-69.

SEQ ID NO: 22 - trình tự cADN chứa ít nhất một vùng giàu trình tự đích mts-siARN. Chứa trình tự yếu tố đích mts-siARN được thể hiện bởi SEQ ID NO: 9 và sắp thẳng hàng với các trình tự mts-siARN SEQ ID NO: 70-87.

SEQ ID NO: 23-92 – các trình tự ADN tương ứng với các trình tự mts-siARN theo sáng chế, mà sắp thẳng hàng với các trình tự cADN được thể hiện ở đây dưới dạng SEQ ID NO: 17-22.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến các phân tử ADN tái tổ hợp, chế phẩm và phương pháp điều hòa chọn lọc sự biểu hiện protein, ví dụ biểu hiện phân tử polynucleotit có khả năng phiên mã khác nguồn gốc, trong mô sinh sản đực của cây chuyển gen và sử dụng chúng. Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến phân tử ADN tái tổ hợp mà chứa yếu tố đích ARN can thiệp nhỏ đặc hiệu mô đực (male tissue-specific small interfering RNA-mts-siARN) được liên kết chức năng với polynucleotit có khả năng phiên mã khác nguồn gốc. Các phân tử ADN tái tổ hợp như vậy là hữu dụng để điều hòa chọn lọc sự biểu hiện polynucleotit có khả năng phiên mã khác nguồn gốc trong mô sinh sản đực của cây chuyển gen. Các trình tự axit nucleic có thể được đề cập ở dạng ADN hoặc ở dạng ARN, như được chỉ rõ; việc mô tả một phân tử tất yếu cũng mô tả phân tử còn lại, là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này. Hơn nữa, việc mô tả trình tự axit nucleic nhất định nhất thiết phải xác định và bao gồm trình tự bổ sung của trình tự đó, như đã biết đối với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này.

ARN can thiệp nhỏ (Small interfering RNA-siARN) là một lớp các phân tử ARN có chiều dài gồm 18-26 nucleotit (nt) (ví dụ, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, hoặc 26 nt). Trình tự siARN có thể được thể hiện bằng trình tự nucleotit ARN gồm guanin (G), xytosin (C), adenin (A), và uraxil (U) hoặc bằng trình tự nucleotit ADN tương đương gồm guanin (G), xytosin (C), adenin (A), và thymine (T). Các chức năng của siARN trong phức hợp làm câm được cảm ứng bởi ARN (RNA-induced silencing complex-RISC) là

gây ra sự thoái biến ARN thông tin (mARN) đặc hiệu trình tự, mà dẫn đến làm gián đoạn sự biểu hiện gen và điều hòa giảm sự biểu hiện protein được mã hóa bởi gen.

“siARN đặc hiệu mô đực” hay “mts-siARN” là một siARN được làm giàu hoặc được biểu hiện đặc hiệu trong (các) mô sinh sản đực (ví dụ, cụm hoa đực) của cây trồng do đó có kiểu biểu hiện đặc hiệu mô đực. SiARN đặc hiệu mô đực đã được xác định ở các cây trồng và có thể được phát hiện bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, như phân tích bắc trọng lượng phân tử thấp. “Trình tự mts-siARN” là trình tự axit nucleic của mts-siARN. Các trình tự mts-siARN được lấy làm ví dụ ở dạng trình tự ADN tương ứng của phân tử mts-siARN mạch kép được thể hiện ở đây dưới dạng SEQ ID NO: 23-92.

Trình tự ADN mà là trình tự bổ sung với trình tự mts-siARN được dùng để chỉ ở đây là “đích mts-siARN”. Đích mts-siARN được chứa trong trình tự ADN của một gen và được phiên mã thành trình tự ARN của phân tử mARN tương ứng. Một mạch của phân tử mts-siARN mạch kép sau đó có thể gắn kết hoặc lai với đích mts-siARN trong phân tử mARN trong các điều kiện sinh lý điển hình. Xem Fig.3. Trình tự axit nucleic bổ sung với trình tự mts-siARN nếu sắp thẳng hàng hai trình tự axit nucleic thu được sự bắt cặp chính xác (không có bắt cặp nhầm tức là, bổ sung hoàn toàn), một gốc bắt cặp nhầm, hai gốc bắt cặp nhầm, hoặc ba gốc bắt cặp nhầm trên chiều dài của trình tự mts-siARN. Các trình tự bổ sung có thể bắt cặp bazơ với nhau theo các quy tắc bổ sung chuẩn của Watson-Crick (tức là, guanin bắt cặp với xytosin (G:C) và adenin bắt cặp với thymin (A:T) hoặc uraxil (A:U). “Trình tự đích mts-siARN” là trình tự axit nucleic của đích mts-siARN. Các trình tự đích mts-siARN được lấy làm ví dụ được thể hiện ở đây dưới dạng SEQ ID NO: 23-92.

Nhiều hơn một đích mts-siARN có thể được tạo cụm với nhau hoặc thậm chí chồng lợp lên nhau trong một phân tử ADN. Phân tử ADN chứa nhiều hơn một đích mts-siARN được dùng để chỉ ở đây là “yếu tố đích mts-siARN”. Yếu tố đích mts-siARN chứa ít nhất hai hoặc nhiều hơn hai đích mts-siARN trong cửa sổ trình tự 500 nucleotit. Yếu tố đích mts-siARN có thể có chiều dài bất kỳ, như khoảng 30 nucleotit (nt), khoảng 40 nt, khoảng 50 nt, khoảng 60 nt, khoảng 70 nt, khoảng 80 nt, khoảng 90 nt, khoảng 100 nt, khoảng 150 nt, khoảng 200 nt, khoảng 250 nt, khoảng 300 nt, khoảng 350 nt, khoảng 400 nt, khoảng 450 nt, hoặc khoảng 500 nt. “Trình tự yếu tố đích mts-siARN” là trình tự axit

nucleic của yếu tố đích mts-siARN. Các trình tự yếu tố đích mts-siARN được lấy làm ví dụ được thể hiện ở đây dưới dạng SEQ ID NO: 1-16.

Như được sử dụng ở đây, phân tử ADN, polypeptit, protein, tế bào, hoặc vi sinh vật “tái tổ hợp” có thể không có nguồn gốc trong tự nhiên hoặc được tạo ra bởi con người bằng cách sử dụng các công cụ kỹ thuật di truyền và vì thế là sản phẩm hoạt động của con người và nói cách khác thường sẽ không có nguồn gốc trong tự nhiên. “Phân tử ADN tái tổ hợp” được dùng để chỉ phân tử ADN chứa một tổ hợp các phân tử hoặc các trình tự ADN mà không có nguồn gốc trong tự nhiên trừ phi có sự can thiệp của con người. Ví dụ, phân tử ADN tái tổ hợp có thể là phân tử ADN mà bao gồm ít nhất hai phân tử ADN khác nguồn gốc với nhau, một phân tử ADN chứa trình tự ADN mà có nguồn gốc từ các trình tự ADN tồn tại trong tự nhiên, hoặc một phân tử ADN được kết hợp vào ADN của tế bào chủ bằng các biến nạp di truyền. Theo một phương án, phân tử ADN tái tổ hợp theo sáng chế là phân tử ADN chứa yếu tố đích mts-siARN được liên kết chức năng với ít nhất một phân tử polynucleotit có khả năng phiên mã, ví dụ, trong đó phân tử polynucleotit có khả năng phiên mã này là khác nguồn gốc với yếu tố đích mts-siARN. Như được sử dụng ở đây phân tử hoặc tế bào hoặc vi sinh vật “tái tổ hợp” có thể được coi là được tạo ra bởi con người.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “khác nguồn gốc” được dùng để chỉ tổ hợp gồm hai hoặc nhiều phân tử ADN hoặc protein nếu tổ hợp này thường không được tìm thấy trong tự nhiên hoặc nếu tổ hợp này được tạo ra theo hướng hoặc thứ tự khác với hướng và thứ tự được tìm thấy trong tự nhiên. Ví dụ, hai phân tử ADN có thể được thu từ các loài khác nhau hoặc được tạo ra bằng cách tổng hợp và/hoặc hai phân tử ADN có thể được thu từ các gen khác nhau, ví dụ, các gen khác nhau từ cùng một loài hoặc các gen giống nhau từ các loài khác nhau. Theo một ví dụ, yếu tố điều hòa hoặc yếu tố đích mts-siARN có thể khác nguồn gốc với phân tử polynucleotit có khả năng phiên mã được liên kết chức năng nếu tổ hợp này thường không được tìm thấy trong tự nhiên, tức là, phân tử polynucleotit có khả năng phiên mã không có trong tự nhiên được liên kết chức năng với yếu tố điều hòa hoặc yếu tố đích mts-siARN. Theo một phương án, tổ hợp khác nguồn gốc như vậy có thể chứa yếu tố đích mts-siARN mà có thể thu được từ thực vật hoặc được tổng hợp hóa học và có thể được liên kết chức năng với phân tử polynucleotit có khả năng phiên mã, như gen chuyển của vi khuẩn mã hóa protein có tính kháng thuốc diệt cỏ, như *cp4-EPSPS* (ví dụ như được thể hiện ở đây dưới dạng SEQ ID NO: 93). Ngoài ra,

một trình tự cụ thể có thể “khác nguồn gốc” với tế bào hoặc vi sinh vật mà nó được đưa vào (ví dụ, trình tự mà không có nguồn gốc trong tự nhiên trong tế bào hoặc vi sinh vật đó).

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “phân lập” có nghĩa là được tách ra khỏi các phân tử khác thường có liên quan đến nó trong trạng thái tự nhiên của nó. Ví dụ, phân tử ADN phân lập là phân tử mà có mặt một mình hoặc cùng với các thành phần khác, nhưng không có mặt trong trạng thái hoặc vị trí trong bộ gen tự nhiên của nó. Theo một phương án, thuật ngữ “phân lập” được dùng để chỉ phân tử ADN được tách ra khỏi các axit nucleic mà thường nằm cạnh phân tử ADN này ở trạng thái tự nhiên của nó. Ví dụ, phân tử ADN phân lập có thể là phân tử ADN mà bao gồm ít nhất hai phân tử ADN khác nguồn gốc với nhau. Theo một ví dụ khác, phân tử ADN phân lập có thể là phân tử ADN mà được kết hợp vào một vị trí bộ gen mới trong tế bào chủ bằng cách biến nạp di truyền. Do đó, phân tử ADN được dung hợp với hoặc được liên kết chức năng với một hoặc nhiều phân tử ADN khác mà không được kết hợp trong tự nhiên, ví dụ bằng cách sử dụng các kỹ thuật ADN tái tổ hợp hoặc biến nạp thực vật, ở đây được coi là phân lập. Các phân tử như vậy được coi là phân lập ngay cả khi được kết hợp vào nhiễm sắc thể của tế bào chủ hoặc có mặt trong dung dịch axit nucleic với các phân tử ADN khác.

Thuật ngữ “được liên kết chức năng” được dùng để chỉ ít nhất hai phân tử nucleotit được sắp xếp hoặc được liên kết theo cách sao cho một phân tử có thể tác động đến chức năng của phân tử còn lại. Hai phân tử nucleotit có thể là một phần của một phân tử nucleotit kế tiếp và có thể nằm cạnh hoặc cách nhau. Ví dụ, yếu tố đích mts-siARN có thể được liên kết chức năng với phân tử polynucleotit có khả năng phiên mã. Theo một phương án, phân tử mts-siARN được liên kết chức năng có thể tác động đến quá trình phiên mã, dịch mã hoặc biểu hiện của phân tử polynucleotit có khả năng phiên mã. Ví dụ, yếu tố đích mts-siARN được liên kết chức năng với phân tử polynucleotit có khả năng phiên mã nếu, sau khi phiên mã trong tế bào mô sinh sản đực, sự có mặt của yếu tố đích mts-siARN trong phân tử mRNA dẫn đến điều hòa sự biểu hiện của phân tử polynucleotit có khả năng phiên mã trong tế bào được cảm ứng bởi mts-siARN nội bào và con đường RISC. Việc liên kết chức năng của yếu tố đích mts-siARN và phân tử polynucleotit có khả năng phiên mã có thể được thực hiện, ví dụ, bằng cách kết hợp yếu tố đích mts-siARN sát cạnh phân tử polynucleotit có khả năng phiên mã (như được đặt vào vị trí 5' hoặc 3' so với phân tử polynucleotit có khả năng phiên mã, nhưng không nhất thiết phải

là liên kết kế tiếp), hoặc sát cạnh vùng không được dịch mã (untranslated region-UTR) của phân tử polynucleotit (như được đặt vào vị trí hoặc sát cạnh 5' UTR hoặc 3' UTR), và/hoặc 3' so với phân tử polynucleotit có khả năng phiên mã và 5' so với tín hiệu polyadenyl hóa. Theo một phương án, yếu tố đích mts-siARN được đặt vào vị trí giữa phân tử polynucleotit có khả năng phiên mã và trình tự polyadenyl hóa, mà là 3' so với và sát cạnh phân tử polynucleotit có khả năng phiên mã. Theo một phương án khác, yếu tố đích mts-siARN được đặt vào vị trí giữa codon kết thúc của phân tử polynucleotit có khả năng phiên mã và trình tự polyadenyl hóa. Theo một phương án khác, yếu tố đích mts-siARN được đặt vào vị trí trong trình tự 3' UTR sát cạnh phân tử polynucleotit có khả năng phiên mã.

Ví dụ về việc xác định mts-siARN, các đích mts-siARN, và yếu tố đích mts-siARN được đề cập ở đây và có thể được xác định bằng các phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ bằng cách phân tích tin sinh học các thư viện sARN và cADN cây trồng. Cụ thể là, mts-siARN có thể được xác định từ các thư viện sARN và được giải trình tự. Các trình tự mts-siARN xác định được có thể được so sánh với cADN và/hoặc các bộ sưu tập trình tự bộ gen để xác định các đích mts-siARN và yếu tố đích mts-siARN hữu dụng để tạo ra các phân tử ADN tái tổ hợp và các cấu trúc như được mô tả ở đây.

Theo một vài phương án, yếu tố đích mts-siARN được tạo ra, được tổng hợp, hoặc được cải biến *in vitro*. Ví dụ, yếu tố đích mts-siARN có thể được cải biến để chứa nhiều hơn, ít hơn, hoặc các trình tự đích mts-siARN khác nhau hoặc để sắp xếp lại vị trí tương đối của một hoặc nhiều trình tự đích mts-siARN. Theo một vài phương án, cải biến như vậy có thể có lợi trong việc làm tăng hoặc làm giảm tác động của yếu tố đích mts-siARN. Các phương pháp tạo ra, tổng hợp hoặc cải biến *in vitro* yếu tố đích mts-siARN và xác định sự biến đổi tối ưu để đạt được mức điều hòa mong muốn là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này. Các yếu tố đích mts-siARN tái tổ hợp được lấy làm ví dụ có thể được tạo ra bằng cách kết hợp các trình tự ADN, hoặc các đoạn của nó, của hai hoặc nhiều đích mts-siARN, hai hoặc nhiều yếu tố đích mts-siARN, hai hoặc nhiều vùng cADN giàu đích mts-siARN, hoặc một hoặc nhiều đích mts-siARN và các đoạn của hai hoặc nhiều vùng cADN giàu đích mts-siARN, như bằng cách kết hợp tất cả hoặc các đoạn của hai hoặc nhiều yếu tố đích mts-siARN được thể hiện ở đây dưới dạng SEQ ID NO: 1-9, bằng cách kết hợp hai hoặc nhiều trình tự mts-siARN được thể hiện ở

đây dưới dạng SEQ ID NO: 23-92, hoặc bằng cách kết hợp tất cả hoặc các đoạn của hai hoặc nhiều yếu tố đích mts-siARN được thể hiện ở đây dưới dạng SEQ ID NO: 1-9 với một hoặc nhiều trình tự mts-siARN được thể hiện ở đây dưới dạng SEQ ID NO: 23-92. Yếu tố đích mts-siARN tái tổ hợp được lấy làm ví dụ như vậy được thể hiện ở đây dưới dạng SEQ ID NO: 10-16.

Trình tự ADN của yếu tố đích mts-siARN cũng có thể được biến đổi bằng cách tạo ra 1-3 nucleotit bất cặp nhằm trong trình tự đích mts-siARN (so với trình tự mts-siARN nhất định). Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến các phân tử ADN tái tổ hợp hoặc yếu tố đích mts-siARN có ít nhất khoảng 80% (phần trăm) tính đồng nhất trình tự, khoảng 85% tính đồng nhất trình tự, khoảng 90% tính đồng nhất trình tự, khoảng 91% tính đồng nhất trình tự, khoảng 92% tính đồng nhất trình tự, khoảng 93% tính đồng nhất trình tự, khoảng 94% tính đồng nhất trình tự, khoảng 95% tính đồng nhất trình tự, khoảng 96% tính đồng nhất trình tự, khoảng 97% tính đồng nhất trình tự, khoảng 98% tính đồng nhất trình tự, và khoảng 99% tính đồng nhất trình tự so với phân tử bất kỳ trong số các phân tử ADN, yếu tố đích mts-siARN (như SEQ ID NO: 1-9), yếu tố đích mts-siARN tái tổ hợp (như SEQ ID NO: 10-16), hoặc trình tự cADN (như SEQ ID NO: 17-22) theo sáng chế.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến các đoạn của phân tử ADN được mô tả ở đây. Các đoạn này có thể là hữu dụng làm yếu tố đích mts-siARN hoặc có thể được kết hợp với các yếu tố đích mts-siARN khác, các trình tự mt-siARN, hoặc các đoạn của chúng để tạo ra các yếu tố đích mts-siARN tái tổ hợp, như được mô tả trên đây. Theo các phương án cụ thể, các đoạn này có thể chứa ít nhất khoảng 20, ít nhất khoảng 30, ít nhất khoảng 40, ít nhất khoảng 50, ít nhất khoảng 60, ít nhất khoảng 70, ít nhất khoảng 80, ít nhất khoảng 90, ít nhất khoảng 100, ít nhất khoảng 110, ít nhất khoảng 120, ít nhất khoảng 130, ít nhất khoảng 140, ít nhất khoảng 150, ít nhất khoảng 160, ít nhất khoảng 170, ít nhất khoảng 180, ít nhất khoảng 190, ít nhất khoảng 200, ít nhất khoảng 210, ít nhất khoảng 220, ít nhất khoảng 230, ít nhất khoảng 240, ít nhất khoảng 250, ít nhất khoảng 260, ít nhất khoảng 270, ít nhất khoảng 280, ít nhất khoảng 290, ít nhất khoảng 300, ít nhất khoảng 350, ít nhất khoảng 400, ít nhất khoảng 450, ít nhất khoảng 500 nucleotit kế tiếp, hoặc nhiều hơn, của phân tử ADN được mô tả ở đây, như yếu tố đích mts-siARN hoặc trình tự cADN như được mô tả ở đây. Các phương pháp để tạo ra các đoạn này từ phân tử ADN ban đầu là đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Hiệu quả của các cải biến, lắp đoạn, mất đoạn hoặc sắp xếp lại được mô tả ở đây trên các khía cạnh biểu hiện mong muốn của một phân tử polynucleotit cụ thể có khả năng phiên mã có thể được thử nghiệm theo kinh nghiệm trong các thử nghiệm thực vật ổn định và tạm thời, như các thử nghiệm được mô tả trong các ví dụ thực hiện ở đây, để đánh giá các kết quả, mà có thể khác nhau tùy thuộc vào các thay đổi được tạo ra và mục đích của sự thay đổi này trong phân tử ADN ban đầu.

Đích mts-siARN và yếu tố đích mts-siARN có thể thực hiện chức năng theo một trong hai hướng, nghĩa là không định hướng, và vì thế có thể được sử dụng theo hướng 5' đến 3' hoặc theo hướng 3' đến 5' trong phân tử ADN tái tổ hợp hoặc cấu trúc ADN.

Như được sử dụng ở đây, “sự biểu hiện của phân tử polynucleotit có khả năng phiên mã” hoặc “sự biểu hiện của protein” được dùng để chỉ việc tổng hợp protein từ một phân tử polynucleotit có khả năng phiên mã và sản phẩm phiên mã thu được (mARN) trong tế bào. Do đó, thuật ngữ “sự biểu hiện protein” được dùng để chỉ kiểu dịch mã bất kỳ của phân tử ARN được phiên mã thành phân tử protein. Sự biểu hiện protein có thể được đặc trưng bởi chất lượng thời gian, không gian, phát triển hoặc hình thái học của nó, cũng như là bởi các chỉ số định tính hoặc định lượng. Theo một phương án, các phân tử ADN tái tổ hợp theo sáng chế có thể được sử dụng để điều hòa chọn lọc sự biểu hiện của protein hoặc phân tử polynucleotit có khả năng phiên mã trong mô sinh sản được của cây chuyển gen. Theo phương án này, việc biểu hiện phân tử ADN tái tổ hợp trong cây chuyển gen có thể dẫn đến sự biểu hiện của phân tử polynucleotit có khả năng phiên mã được liên kết chức năng ít nhất ở các mô thực vật nhưng không biểu hiện trong các mô sinh sản được. Theo các phương án nhất định, việc điều hòa sự biểu hiện protein như vậy được dùng để chỉ việc ức chế hoặc làm giảm; ví dụ, ức chế hoặc làm giảm lượng protein được tổng hợp trong tế bào, ví dụ thông qua sự điều hòa gen sau phiên mã qua trung gian ARNi.

Điều hòa chọn lọc sự biểu hiện protein như được sử dụng ở đây được dùng để chỉ việc làm giảm sự tổng hợp protein trong tế bào hoặc mô so với tế bào hoặc mô đối chứng ít nhất khoảng 75%, ít nhất khoảng 80%, ít nhất khoảng 85%, ít nhất khoảng 90%, ít nhất khoảng 95%, ít nhất khoảng 99%, hoặc 100% (tức là giảm hoàn toàn). Tế bào hoặc mô đối chứng có thể là, ví dụ, tế bào hoặc mô thực vật từ cùng một cây chuyển gen hoặc từ cây chuyển gen tương tự biểu hiện protein hoặc tế bào hoặc mô từ cây chuyển gen có gen chuyển tương tự mã hóa protein này nhưng không có yếu tố đích mts-siARN được liên

kết chức năng. Điều hòa sự biểu hiện protein có thể được xác định bằng cách sử dụng kỹ thuật bất kỳ đã biết đối với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này, như bằng cách đo trực tiếp mức kết tụ protein trong mẫu mô hoặc tế bào bằng sử dụng kỹ thuật như ELISA hoặc phân tích thẩm tách tây, bằng cách đo hoạt tính enzym của protein, hoặc bằng cách xác định sự biểu hiện protein về kiểu hình. Theo một phương án, điều hòa chọn lọc sự biểu hiện protein được dùng để chỉ việc làm giảm đáng kể sự biểu hiện protein có khả năng tạo ra tính kháng thuốc diệt cỏ trong mô thực của cây chuyển gen để tạo ra kiểu hình dễ phát hiện của tính bất thụ được đã thay đổi ở cây chuyển gen mà thuốc diệt cỏ được phun là thuốc phun gây ra tính bất thụ. Do đó, việc phát hiện tính bất thụ được đã thay đổi ở cây chuyển gen như vậy chứng tỏ việc điều hòa chọn lọc sự biểu hiện protein.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “gen chuyển mã hóa protein tái tổ hợp” hoặc “phân tử polynucleotit có khả năng phiên mã” được dùng để chỉ phân tử nucleotit bất kỳ có khả năng được phiên mã thành phân tử ARN, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, các phân tử có trình tự nucleotit mã hóa trình tự polypeptit. Tùy thuộc vào các điều kiện, trình tự nucleotit có thể được hoặc không được dịch mã thực sự thành phân tử polypeptit trong tế bào. Ranh giới của gen chuyển hoặc phân tử polynucleotit có khả năng phiên mã thường được xác định bởi codon khởi đầu dịch mã ở đầu 5' và codon kết thúc dịch mã ở đầu 3'.

Thuật ngữ “gen chuyển” được dùng để chỉ phân tử ADN được kết hợp nhân tạo vào bộ gen của vi sinh vật hoặc tế bào chủ, ở thể hệ hiện tại hoặc thể hệ trước bất kỳ của vi sinh vật hoặc tế bào này, như là kết quả của sự can thiệp của con người, như bằng các phương pháp biến nạp thực vật. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “chuyển gen” có nghĩa là bao gồm gen chuyển, ví dụ “cây chuyển gen” được dùng để chỉ cây chứa gen chuyển trong bộ gen của nó và “tính trạng chuyển gen” được dùng để chỉ đặc điểm hoặc kiểu hình được bộc lộ hoặc được tạo ra bởi sự có mặt của gen chuyển được kết hợp vào bộ gen của cây trồng. Kết quả của việc thay đổi bộ gen như vậy là cây chuyển gen có sự khác biệt khá rõ ràng so với cây kiểu đại có liên quan và tính trạng chuyển gen là tính trạng không được tìm thấy trong tự nhiên ở cây kiểu đại. Các cây chuyển gen theo sáng chế chứa phân tử ADN tái tổ hợp được đề xuất bởi sáng chế.

Gen chuyển hoặc phân tử polynucleotit có khả năng phiên mã theo sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở gen chuyển hoặc phân tử polynucleotit có khả năng

phiên mã mà tạo ra đặc điểm mong muốn có liên quan đến hình thái học, sinh lý học, sự tăng trưởng, sự phát triển, sản lượng, các đặc tính dinh dưỡng, khả năng kháng bệnh, kháng côn trùng, kháng thuốc diệt cỏ, khả năng chịu được áp lực, khả năng chịu được áp lực môi trường, hoặc kháng hóa chất của cây trồng. Theo một phương án, phân tử polynucleotit có khả năng phiên mã theo sáng chế mã hóa protein mà nếu được biểu hiện ở cây chuyển gen tạo ra tính kháng thuốc diệt cỏ ít nhất ở tế bào và/hoặc mô nơi mà xuất hiện protein được biểu hiện; việc điều hòa chọn lọc protein kháng thuốc diệt cỏ ở mô sinh sản đực của cây chuyển gen kết hợp việc phun thuốc diệt cỏ đúng lúc ít nhất sẽ tạo ra tính bất thụ đực bị giảm được cảm ứng hoặc tính bất thụ đực được cảm ứng.

Tính bất thụ đực dễ cảm ứng như vậy kết hợp với tính kháng thuốc diệt cỏ sinh dưỡng có thể được sử dụng để làm tăng sản lượng hạt lai, ví dụ bằng cách loại trừ hoặc làm giảm nhu cầu làm mất khả năng sinh sản một cách tự nhiên ở cây ngô được sử dụng làm cây cái trong quá trình lai chéo nhất định khi sản xuất hạt lai. Các hệ bất thụ đực được cảm ứng bởi thuốc diệt cỏ đã được mô tả, ví dụ trong patent Mỹ số 6,762,344; patent Mỹ số 8,618,358; và công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2013/0007908. Ví dụ về các thuốc diệt cỏ hữu dụng để thực hiện sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các chất ức chế axetyl coenzym A carboxylaza (ACCaza) (ví dụ, fop và dim), chất ức chế axetolactat synthaza (ALS) (ví dụ, sulfonylure (SU) và imidazolinon (IMI)), các chất ức chế hệ thống quang II (PSII) (ví dụ, triazin và phenyl ete), chất ức chế protoporphyrinogen oxidaza (PPO) (ví dụ, flumioxazin và fomesafen), chất ức chế 4-hydroxyphenyl pyruvat dioxygenaza (HPPD) (ví dụ, isoxaflutol và triketon như mesotrion), chất ức chế 5-enolpyruvyl shikimat 3-phosphat synthaza (EPSPS) (ví dụ, glyphosat), chất ức chế glutamin synthetaza (GS) (ví dụ, glufosinat và phosphinothrixin), auxin tổng hợp (ví dụ, 2,4-D và dicamba). Ví dụ về các gen chuyển hoặc phân tử polynucleotit có khả năng phiên mã dùng để thực hiện sáng chế bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở các gen mã hóa protein tạo ra tính kháng các chất ức chế HPPD (như HPPD nhạy với thuốc diệt cỏ), các gen mã hóa protein tạo ra tính kháng glufosinat (như pat và bar), các gen mã hóa protein tạo ra tính kháng glyphosat (như EPSPS kháng glyphosat, như *cp4-epsps*, được thể hiện ở đây dưới dạng SEQ ID NO: 93), và các gen mã hóa protein tạo ra tính kháng auxin tổng hợp như dicamba (như dicamba monooxygenaza (DMO)) và 2,4-D (như gen (*R*)-dichlorprop dioxygenaza (*rdpA*)).

Các cấu trúc ADN tái tổ hợp theo sáng chế có thể bao gồm các phân tử ADN tái tổ hợp theo sáng chế và được tạo ra bằng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và theo các phương án khác được bao gồm trong các vectơ biến nạp thực vật, plasmit, hoặc ADN plastit. Các cấu trúc ADN tái tổ hợp như vậy là hữu dụng để tạo ra các tế bào và/hoặc các cây chuyển gen và vì thế cũng có thể được chứa trong ADN bộ gen của cây chuyển gen, hạt, tế bào, hoặc bộ phận cây. Do đó, sáng chế đề cập đến các phương án, trong đó cấu trúc ADN tái tổ hợp được đặt vào trong vectơ biến nạp thực vật, hoặc trên hạt bắn phá sinh học để biến nạp vào tế bào cây trồng, hoặc trong nhiễm sắc thể hoặc plastit của tế bào cây chuyển gen, hoặc trong tế bào chuyển gen, mô cây chuyển gen, hạt cây chuyển gen, hạt phấn hoa chuyển gen, hoặc cây chuyển gen hoặc được chuyển gen một phần (ví dụ, cây được ghép). Vectơ là phân tử ADN bất kỳ mà có thể được sử dụng nhằm mục đích biến nạp thực vật, tức là đưa ADN vào tế bào. Các cấu trúc ADN tái tổ hợp theo sáng chế có thể, ví dụ, được cài vào vectơ biến nạp thực vật và được sử dụng để biến nạp thực vật để tạo ra các cây chuyển gen, hạt, và tế bào. Các phương pháp tạo ra vectơ biến nạp thực vật là đã biết rõ trong lĩnh vực này. Vectơ biến nạp thực vật theo sáng chế thường bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở: trình tự khởi đầu thích hợp để biểu hiện ADN được liên kết chức năng, cấu trúc ADN tái tổ hợp được liên kết chức năng, và trình tự tín hiệu polyadenyl hóa (mà có thể được bao gồm trong trình tự 3'UTR). Các trình tự khởi đầu hữu dụng để thực hiện sáng chế bao gồm các trình tự mà thực hiện chức năng trong cây trồng để biểu hiện polynucleotit được liên kết chức năng. Các trình tự khởi đầu như vậy được làm biến đổi và đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này và bao gồm các trình tự mà dễ cảm ứng, của virus, tổng hợp, cơ định, được điều hòa về mặt thời gian, được điều hòa về mặt không gian, và/hoặc được điều hòa cả về không gian và thời gian. Các thành phần tùy ý khác bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, một hoặc nhiều đích sau: 5' UTR, trình tự tăng cường, đích tác động cis, intron, trình tự tín hiệu, trình tự peptit chuyển tiếp, và một hoặc nhiều gen chỉ thị chọn lọc. Theo một phương án, vectơ biến nạp thực vật chứa cấu trúc ADN tái tổ hợp.

Các cấu trúc ADN tái tổ hợp và vectơ biến nạp thực vật theo sáng chế được tạo ra bằng phương pháp bất kỳ thích hợp với ứng dụng dự định, có tính đến, ví dụ, kiểu biểu hiện mong muốn, gen chuyển hoặc phân tử polynucleotit có khả năng phiên mã mong muốn, và sự tiện dụng ở cây trồng trong đó cấu trúc ADN tái tổ hợp được biểu hiện. Các phương pháp chung hữu dụng để thao tác các phân tử ADN để tạo ra và sử dụng các cấu

trúc ADN tái tổ hợp và vectơ biến nạp thực vật là đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này và được mô tả chi tiết trong, ví dụ, các sổ tay hướng dẫn và sách hướng dẫn thí nghiệm bao gồm Michael R. Green và Joseph Sambrook, “Molecular Cloning: A Laboratory Manual” (Fourth Edition) ISBN:978-1-936113-42-2, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY (2012).

Các phân tử ADN tái tổ hợp và các cấu trúc theo sáng chế có thể được cải biến bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, hoàn toàn hoặc một phần, ví dụ, để làm tăng sự tiện lợi của việc thao tác ADN (như các vị trí nhận diện enzym giới hạn hoặc các vị trí tách dòng trên cơ sở tái tổ hợp), hoặc để bao gồm các trình tự được ưu tiên cho thực vật (như các trình tự sử dụng codon thực vật hoặc trình tự liên ứng Kozak), hoặc để bao gồm các trình tự hữu dụng cho việc thiết kế phân tử và cấu trúc ADN tái tổ hợp (như các trình tự đệm hoặc liên kết). Theo các phương án nhất định, trình tự ADN của phân tử và cấu trúc ADN tái tổ hợp bao gồm trình tự ADN mà được làm tối ưu hóa codon cho cây trồng trong đó phân tử hoặc cấu trúc ADN tái tổ hợp được biểu hiện. Ví dụ, phân tử hoặc cấu trúc ADN tái tổ hợp được biểu hiện ở cây trồng có thể có tất cả hoặc các phần của trình tự của nó được làm tối ưu hóa codon để biểu hiện ở cây trồng bằng các phương pháp đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các phân tử hoặc cấu trúc ADN tái tổ hợp theo sáng chế có thể được xếp chồng với các phân tử ADN tái tổ hợp khác hoặc các sự kiện chuyển gen để tạo ra các tính trạng khác (ví dụ, trong trường hợp các cây được biến nạp, các tính trạng bao gồm tính kháng thuốc diệt cỏ, tính kháng côn trùng, tính chịu lạnh để nảy mầm, tính chịu hạn) ví dụ, bằng cách biểu hiện hoặc điều hòa các gen khác.

Một khía cạnh theo sáng chế đề cập đến các tế bào cây chuyển gen, các mô cây chuyển gen, và các cây chuyển gen hoặc hạt mà chứa phân tử ADN tái tổ hợp theo sáng chế. Một khía cạnh khác theo sáng chế đề cập đến nhiễm sắc thể cây trồng tái tổ hợp hoặc nhân tạo mà chứa phân tử ADN tái tổ hợp theo sáng chế. Các phương pháp thích hợp để biến nạp các tế bào cây chủ để sử dụng trong sáng chế thực ra bao gồm phương pháp bất kỳ mà qua đó ADN có thể được đưa vào tế bào (ví dụ, trong đó phân tử ADN tái tổ hợp được kết hợp ổn định vào nhiễm sắc thể của cây trồng) và đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Một phương pháp được sử dụng rộng rãi và được lấy làm ví dụ để đưa phân tử ADN tái tổ hợp vào cây trồng là hệ biến nạp *Agrobacterium*, mà đã biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này. Một phương pháp được lấy làm ví dụ khác để đưa phân tử ADN tái tổ hợp vào cây trồng là cài phân tử ADN tái tổ hợp vào bộ

gen của cây trồng ở một vị trí tiền định bằng các phương pháp hòa nhập trực tiếp vị trí. Hòa nhập trực tiếp vị trí có thể được tiến hành bằng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, bằng cách sử dụng nucleaza ngón tay kềm, meganucleaza nguyên thể hoặc được thao tác di truyền, TALE-endonucleaza, hoặc endonucleaza định hướng ARN (ví dụ hệ CRISPR/Cas9). Các cây chuyển gen có thể được tái sinh từ tế bào cây trồng đã biến nạp bằng các phương pháp nuôi cấy tế bào thực vật. Cây chuyển gen đồng hợp tử với gen chuyển có thể được tạo ra bằng cách lai hữu tính (tự phối) cây chuyển gen phân ly độc lập chứa một trình tự gen ngoại sinh với chính nó, ví dụ cây R0 hoặc F0, để sản xuất ra hạt R1 hoặc F1. Một phần tư số hạt R1 hoặc F1 được sản xuất ra sẽ đồng hợp tử với gen chuyển. Các cây được trồng bằng cách làm nảy mầm hạt R1 hoặc F1 có thể được thử nghiệm tính dị hợp tử, thường bằng cách sử dụng thử nghiệm SNP hoặc thử nghiệm khuếch đại bằng nhiệt mà cho phép phân biệt giữa thể dị hợp tử và thể đồng hợp tử (tức là, thử nghiệm hợp tử).

Sáng chế đề cập đến cây chuyển gen có phân tử ADN tái tổ hợp theo sáng chế trong bộ gen của nó, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, cỏ linh lăng, cây bông, cây ngô, cây cải dầu, cây lúa, cây đậu tương, và cây lúa mì, trong số các cây khác. Sáng chế cũng đề cập đến tế bào, các bộ phận của cây chuyển gen, và cây con của cây chuyển gen. Như được sử dụng ở đây “cây con” bao gồm cây bất kỳ, hạt, tế bào cây, và/hoặc bộ phận của cây được tạo ra từ hoặc được tái sinh từ cây, hạt, tế bào cây, và/hoặc bộ phận cây mà chứa phân tử ADN tái tổ hợp theo sáng chế. Các cây chuyển gen, tế bào, bộ phận, cây con, và hạt được tạo ra từ các cây này có thể đồng hợp tử hoặc dị hợp tử với phân tử ADN tái tổ hợp theo sáng chế. Bộ phận cây theo sáng chế có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, lá, thân, rễ, hạt, nội nhũ, nõn, và phần hoa. Bộ phận cây theo sáng chế có thể có sức sống, không có sức sống, có thể tái sinh, hoặc không tái sinh. Sáng chế cũng bao gồm và đề xuất tế bào cây trồng được biến nạp chứa phân tử ADN theo sáng chế. Tế bào cây chuyển gen hoặc được biến nạp theo sáng chế bao gồm các tế bào cây trồng có thể tái sinh và không thể tái sinh.

Sáng chế còn bao gồm các phương án trong đó phân tử ADN tái tổ hợp nằm trong sản phẩm hàng hóa thu được từ cây chuyển gen, hạt, hoặc bộ phận cây theo sáng chế; sản phẩm hàng hóa như vậy bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở các bộ phận cây được thu hoạch, nguyên hạt hoặc hạt đã nghiền hoặc hạt của cây, hoặc thực phẩm bất kỳ hoặc sản phẩm không phải thực phẩm chứa phân tử ADN tái tổ hợp theo sáng chế.

Sáng chế đề cập đến phương pháp tạo ra tính bất thụ đực ở cây chuyển gen bao gồm (a) trồng cây chuyển gen chứa phân tử ADN tái tổ hợp mà chứa phân tử polynucleotit có khả năng phiên mã khác nguồn gốc tạo ra tính kháng thuốc diệt cỏ được liên kết chức năng với yếu tố đích mts-siARN và (b) phun một lượng hữu hiệu thuốc diệt cỏ lên cây chuyển gen để tạo ra tính bất thụ đực. Một lượng hữu hiệu của thuốc diệt cỏ là lượng đủ để làm cho cây chuyển gen chứa phân tử ADN tái tổ hợp theo sáng chế bất thụ đực. Theo một phương án, một lượng hữu hiệu glyphosat là lượng nằm trong khoảng từ 0,125 pao (0,06 kg) đương lượng axit mỗi mẫu Anh (0,4 ha) đến 8 pao (3,63 kg) đương lượng axit mỗi mẫu Anh (0,4 ha). Việc phun thuốc diệt cỏ có thể được tiến hành trước hoặc trong khi phát triển mô sinh sản đực, như ở giai đoạn được chọn từ nhóm gồm giai đoạn V4, V5, V6, V7, V8, V9, V10, V11, V12, V13 và V14 của sự phát triển cây ngô và có thể ngăn ngừa ít nhất sự phát triển của phần hoa, sự phát tán phần hoa, hoặc sự nhô ra của bao phấn.

Theo một phương án, việc ngăn ngừa sự phát triển phần hoa, sự phát tán phần hoa, hoặc sự nhô ra của bao phấn có thể do tính bất thụ đực và do đó việc không có sự phát triển phần hoa, sự phát tán phần hoa hoặc sự nhô ra của bao phấn có thể là dấu hiệu của tính bất thụ đực. Tuy nhiên, trong một vài trường hợp, các cây bất thụ đực có thể vẫn phát triển một lượng nhỏ phần hoa. Do đó, theo các phương án nhất định, sự có mặt của một lượng nhỏ phần hoa không nhất thiết chứng tỏ cây bất thụ đực hoặc không có tính bất thụ đực.

Sự phát triển cây thường được xác định bởi thang giai đoạn dựa trên sự phát triển cây. Đối với cây ngô, thang phát triển cây thông thường được sử dụng trong lĩnh vực kỹ thuật này được biết đến là các giai đoạn V. Các giai đoạn V được xác định theo lá trên cùng trong đó đã trông thấy cỏ lá. VE tương ứng với giai đoạn nhú lá, V1 tương ứng với lá thứ nhất, V2 tương ứng với lá thứ hai, V3 tương ứng với lá thứ ba, V(n) tương ứng với lá thứ n. VT xảy ra khi trông thấy nhánh cuối cùng của cụm hoa nhưng trước khi phun râu. Khi chuyển ra cánh đồng ngô, mỗi giai đoạn V cụ thể chỉ được xác định khi 50% hoặc nhiều hơn 50% số cây trên cánh đồng đang trong giai đoạn đó hoặc vượt quá giai đoạn đó. Các thang phát triển khác là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này và có thể được sử dụng với các phương pháp theo sáng chế.

Công cụ phổ biến khác để dự đoán và xác định các giai đoạn sinh trưởng và phát triển của cây ngô là các đơn vị mức độ tăng trưởng (Growing Degree Unit-GDU). Một

nhân tố trong quá trình phát triển và tăng trưởng của cây ngô là nhiệt. Nhiệt thường được đo ở một thời điểm và được thể hiện ở dạng nhiệt độ, nhưng cũng có thể được đo trong một khoảng thời gian và được thể hiện ở dạng các đơn vị nhiệt. Các đơn vị nhiệt này thường được dùng để chỉ là GDU. GDU có thể được xác định là sự chênh lệch nhiệt độ giữa nhiệt độ hằng ngày trung bình và nhiệt độ cơ sở được chọn trong các giới hạn nhất định. GDU được tính toán bằng cách sử dụng công thức sau: đơn vị mức độ tăng trưởng = $\{ (H + L) / 2 \} - B$ trong đó H là nhiệt độ cao hằng ngày (nhưng không cao hơn 86°F), L là nhiệt độ thấp hằng ngày (nhưng không thấp hơn 50°F), và B là nhiệt độ cơ sở bằng 50°F. Bởi vì sự tăng trưởng của cây ngô là nhỏ khi nhiệt độ lớn hơn 86°F hoặc nhỏ hơn 50°F, các giới hạn được đặt ra trên các nhiệt độ thấp và cao hằng ngày được sử dụng trong công thức. Việc giới hạn nhiệt độ hằng ngày thấp hơn cũng ngăn ngừa việc tính toán các giá trị âm. Do đó, nếu nhiệt độ cao hằng ngày vượt quá 86°F, thì nhiệt độ cao hằng ngày được sử dụng trong công thức GDU sẽ được đặt ở 86°F. Ngược lại, nếu nhiệt độ thấp hằng ngày hạ xuống dưới 50°F, thì nhiệt độ thấp hằng ngày được sử dụng trong công thức GDU sẽ được đặt ở nhiệt độ 50°F. Nếu nhiệt độ cao hằng ngày không vượt quá 50°F, thì không có GDU được ghi nhận vào ngày đó. GDU tối đa của cây ngô có thể tích lũy trong một ngày bằng 36, GDU tối thiểu bằng 0. Đánh giá sự trưởng thành của cây ngô được xác định bằng tổng các giá trị GDU hằng ngày qua một khoảng thời gian cụ thể. Khoảng thời gian mà hầu hết các nhà sản xuất hạt ngô sử dụng là từ thời điểm trồng đến khi trưởng thành về mặt sinh lý hoặc thời điểm mà tại đó hạt được điền đầy đủ một cách thực sự. Ở hầu hết các bang của Mỹ, ví dụ, GDU được tích lũy được duy trì ở hầu hết các khu vực địa lý và sẵn có từ dịch vụ báo cáo mùa màng USDA hoặc dịch vụ mở rộng bang. Ngoài ra, dụng cụ để thu được thông tin GDU ở một vị trí cụ thể cũng được bộc lộ trong Patent Mỹ số 6,967,656, mà được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Phương pháp khác để dự đoán sự phát triển cụm hoa để xác định thời điểm phun thuốc diệt cỏ để gây ra tính bất thụ được mô tả trong patent Mỹ số 8,618,358, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Các thuốc diệt cỏ sử dụng trong sáng chế bao gồm thuốc diệt cỏ bất kỳ bao gồm các thuốc diệt cỏ có hoạt tính chống lại axetyl coenzym A carboxylaza (ACCa), các chất ức chế axetolactat synthaza (ALS), chất ức chế hệ thống quang II (PSII), các chất ức chế protoporphyrinogen oxidaza (PPO), các chất ức chế 4-hydroxyphenyl pyruvat dioxygenaza (HPPD), chất ức chế 5-enolpyruvyl shikimat 3-phosphat synthaza

(EPSPS), chất ức chế glutamin synthetaza (GS), và auxin tổng hợp. Các thuốc diệt cỏ là đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này và được mô tả trong tài liệu, ví dụ, “Modern Crop Protection Compounds, Volumes 1 (xuất bản lần thứ hai), được biên soạn bởi Wolfgang Krämer, Ulrich Schirmer, Peter Jeschke, Matthias Witschel, ISBN: 9783527329656, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Germany (2012). Theo một phương án, thuốc diệt cỏ là glyphosat.

Hạt lai có thể được sản xuất bằng cách sử dụng phương pháp bao gồm (a) phun thuốc diệt cỏ lên cây chuyển gen chứa phân tử ADN tái tổ hợp bao gồm phân tử polynucleotit có khả năng phiên mã khác nguồn gốc tạo ra tính kháng thuốc diệt cỏ được liên kết chức năng với yếu tố đích mts-siARN, trong đó việc phun thuốc diệt cỏ được tiến hành trong quá trình phát triển mô sinh sản đực của cây chuyển gen nhờ đó tạo ra tính bất thụ đực ở cây chuyển gen; (b) thụ phấn cây chuyển gen với phấn hoa thu được từ một cây thứ hai; và (c) thu hoạch hạt lai từ cây chuyển gen. Theo một phương án, cây chuyển gen là cây ngô. Theo một phương án, thuốc diệt cỏ là glyphosat và protein được mã hóa bởi phân tử polynucleotit có khả năng phiên mã khác nguồn gốc là EPSPS kháng glyphosat. Theo một phương án, glyphosat được phun trong quá trình phát triển với lượng hữu hiệu nằm trong khoảng từ 0,125 pao (0,06 kg) đương lượng axit trên mỗi mẫu Anh (0,4 ha) đến 8 pao (3,63 kg) đương lượng axit trên mỗi mẫu Anh (0,4 ha). Theo một phương án khác, bước thụ phấn có thể được tiến hành bằng cách để thụ phấn tự nhiên, ví dụ thụ phấn nhờ gió, hoặc có thể bao gồm thụ phấn bằng tay hoặc bằng máy.

Hạt lai có thể được thu hoạch từ cây chuyển gen bất thụ đực mà được thụ phấn với phấn hoa từ một cây thứ hai, trong đó cây chuyển gen bất thụ đực chứa phân tử ADN tái tổ hợp bao gồm polynucleotit có khả năng phiên mã khác nguồn gốc mà tạo ra tính kháng thuốc diệt cỏ được liên kết chức năng với yếu tố đích mts-siARN, và trong đó cây chuyển gen đã được làm cho bất thụ đực bằng cách phun một lượng hữu hiệu thuốc diệt cỏ trong quá trình phát triển mô sinh sản đực. Theo một ví dụ, thuốc diệt cỏ là glyphosat và được phun trong quá trình phát triển với lượng hữu hiệu nằm trong khoảng từ 0,125 pao (0,06kg) đương lượng axit trên mỗi mẫu Anh (0,4ha) đến 8 pao (3,63kg) đương lượng axit trên mỗi mẫu Anh (0,4ha) và ít nhất ngăn chặn sự phát triển phấn hoa, sự phát tán phấn hoa, hoặc sự nhô ra của bao phấn.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ dưới đây mô tả các yếu tố cải tiến sản lượng hạt lai so với giải pháp kỹ thuật đã biết. Các yếu tố cải tiến như vậy bao gồm các đích mts-siARN mới và các yếu tố đích mts-siARN để sử dụng trong các phân tử ADN tái tổ hợp và các cây chuyển gen để kìm hãm sự phát triển phân hoa ở giai đoạn sớm, dẫn đến không có các hạt phân hoa có sức sống ở nhiều chất mầm, và các phương pháp sử dụng có liên quan. Các ví dụ dưới đây được đề xuất để chứng minh các phương án theo sáng chế.

Ví dụ 1: Xác định các đích mts-siARN

ARN nhỏ được phân lập từ bốn giai đoạn tăng trưởng riêng biệt của cụm hoa ngô và ba giai đoạn tăng trưởng riêng biệt của bắp ngô. Xem bảng 1. ARN nhỏ giàu trong cụm hoa được phân lập ở các giai đoạn phát triển rất sớm của cụm hoa (V7, V8/V9, V10/V11, và V12) (xem Fig.1). ARN nhỏ được tạo ra từ các mô được non hơn so với các mô được sử dụng trước đó trong giải pháp kỹ thuật đã biết để tạo ra các trình tự ARN nhỏ được làm giàu trong cụm hoa.

Các thư viện ARN nhỏ được tạo ra bằng cách sử dụng ARN nhỏ được phân lập, và giải trình tự ARN nhỏ công suất cao được tiến hành trên các thư viện. Phân tích tin sinh học được sử dụng để so sánh các trình tự trong các thư viện cụm hoa và bắp ngô với các trình tự trong thư viện ARN nhỏ được tạo ra từ các mô ngô khác bao gồm lá được lấy ở các giai đoạn tăng trưởng khác nhau, nguyên hạt, rễ được lấy ở các giai đoạn tăng trưởng khác nhau, nội nhũ, và hạt. Phân tích tin sinh học khác biệt này đã xác định được hàng nghìn trình tự ARN nhỏ được làm giàu trong cụm hoa với sự biểu hiện được chuẩn hóa nằm trong khoảng từ 10 đến 665 bản sao mỗi một phần tư triệu (transcripts per quarter - tpq). Các trình tự ARN nhỏ được làm giàu trong cụm hoa xác định có thể là siARN do chiều dài của chúng (18-26 nucleotit) và nguồn gốc kỳ vọng của chúng từ tiền dsARN. Do tính đặc hiệu mô được, các ARN nhỏ được làm giàu trong cụm hoa được dùng để chỉ ở đây là siARN đặc hiệu mô được (mts-siARN).

Bảng 1. Mô tả thư viện ARN nhỏ của cụm hoa và bắp ngô

Giai đoạn cụm hoa/bắp	Kích thước cụm hoa/bắp
Cụm hoa ở giai đoạn tế bào mẹ hạt phấn (cây ở giai đoạn V7-V8)	<1cm
Cụm hoa ở giai đoạn tế bào mẹ hạt phấn-trước giảm phân (cây ở giai đoạn V8-V9)	1-3cm
Cụm hoa ở giai đoạn không có hạt phấn – giảm phân sớm (cây ở giai đoạn V9-V10)	3-17cm

Cụm hoa ở giai đoạn sau – hạt phấn đơn nhân (cây ở giai đoạn V12-VT)	>17cm
Bấp ở giai đoạn túi phôi chưa chín 4 nhân trước giảm phân (cây ở giai đoạn VT)	2-3cm
Bấp ở giai đoạn túi phôi chưa chín 8 nhân đến giai đoạn sau với tối đa 10 tế bào đối cực (cây ở giai đoạn VT)	4-5cm
Bấp ở giai đoạn thụ phấn (cây ở giai đoạn VT-R1)	9-10cm

Phương pháp PCR thời gian thực được sử dụng để xác định và khẳng định rằng các trình tự mts-siARN được biểu hiện đặc hiệu trong cụm hoa. ARN tổng số, kể cả ARN nhỏ được làm giàu, được chiết từ các mô được thể hiện trong bảng 1 và được sử dụng để tổng hợp cADN với các đoạn môi phiên mã ngược gồm 8 nt bổ sung với các trình tự mts-siARN ở đầu 3' và trình tự phổ biến có 35 nt ở đầu 5'. Sau khi tổng hợp cADN, PCR thời gian thực được tiến hành nếu trình tự (14 đến 18 nt) của một trong số các đoạn môi xuôi giống với đầu 5' của trình tự mts-siARN và đoạn môi ngược là đoạn môi phổ biến. ARN 18S được khuếch đại và được sử dụng làm đối chứng nội để chuẩn hóa lượng mts-siARN. Số liệu thu được từ phương pháp PCR thời gian thực được sử dụng để thu hẹp số trình tự mts-siARN mà được làm giàu trong cụm hoa.

Thử nghiệm vi dàn xác định đặc điểm siARN được tiến hành bằng cách sử dụng các chip μ Paraflo® Microfluidics do LC Sciences LLC cung cấp (Houston, Texas, USA) với 1.200 trình tự được chọn từ hàng nghìn trình tự mts-siARN được xác định từ phân tích tin sinh học khác biệt. Các chip vi dàn chứa ba mẫu dò có trình tự bổ sung với mỗi trình tự trong số 1.200 trình tự mts-siARN. ARN tổng số được tinh chế từ 26 nguồn mô ngô (nguồn mô gấp đôi hoặc gấp ba) từ các cây nội phôi LH244 (số đăng ký ATCC PTA-1173) hoặc 01DKD2 (I294213) (số đăng ký ATCC PTA-7859). Xem bảng 2. Mỗi mẫu trong số 26 mẫu ARN được lai với các chip vi dàn mà chứa các mẫu dò cho 1.200 mts-siARN. Các hình ảnh lai được chụp bằng cách sử dụng máy quét laze GenePix® 4000B (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) và được số hóa bằng cách sử dụng phần mềm phân tích hình ảnh Array-Pro® Analyzer (Media Cybernetics, Rockville, MD). Các giá trị tín hiệu tương đối được rút ra bằng phép trừ nền và tiêu chuẩn hóa. Các tín hiệu được biểu hiện khác nhau được xác định bằng kiểm định t với $p < 0,05$. Từ phân tích vi dàn, 500 mts-siARN từ 1.200 trình tự được xác định là rất đặc hiệu cụm hoa. Bảng 2. Mô tả các mẫu mô được sử dụng trong thử nghiệm vi dàn.

Số chip	Kiểu gen	Loại mô	Các mẫu được lấy từ 3 cây	Giai đoạn
1	LH244	Bấp non	Được lấy lúc <5cm	VT
2	LH244	Bấp già	Được lấy lúc >5cm	VT-R1
3	LH244	Cụm hoa non	Được lấy lúc 2-7cm	V8-V9
4	LH244	Cụm hoa già	Được lấy >7cm	V10-V12
5	LH244	lá	Được lấy ở giai đoạn V4	V4
6	LH244	lá	Được lấy ở giai đoạn V12	V12
7	LH244	rễ	Được lấy ở giai đoạn V4	V4
8	LH244	thân	Được lấy ở giai đoạn V4	V4
9	LH244	Bấp non	Được lấy lúc <5cm	VT
10	LH244	Bấp già	Được lấy lúc >5cm	VT-R1
11	LH244	Cụm hoa non	Được lấy lúc 2-7cm	V8-V9
12	LH244	Cụm hoa già	Được lấy lúc >7cm	V10-V12
13	LH244	lá	Được lấy ở giai đoạn V4	V4
14	LH244	lá	Được lấy ở giai đoạn V12	V12
15	LH244	rễ	Được lấy ở giai đoạn V4	V4
16	LH244	rễ	Được lấy ở giai đoạn V4	V4
17	01DKD2	Bấp non	Được lấy lúc <5cm	VT
18	01DKD2	Bấp già	Được lấy lúc >5cm	VT-R1
19	01DKD2	Bấp già	Được lấy lúc >5cm	VT-R1
20	01DKD2	Cụm hoa non	Được lấy lúc 2-7cm	V8-V9
21	01DKD2	Cụm hoa non	Được lấy lúc 2-7cm	V8-V9
22	01DKD2	Cụm hoa già	Được lấy lúc >7cm	V10-V12
23	01DKD2	Cụm hoa già	Được lấy lúc >7cm	V10-V12
24	01DKD2	Lá	Được lấy ở giai đoạn V4	V4
25	LH244	lá	Được lấy ở giai đoạn V4	V4
26	LH244	lá	Được lấy ở giai đoạn V12	V12

Sau đó, phân tích tin sinh học được tiến hành bằng cách sử dụng các công cụ sắp thẳng hàng trình tự như công cụ tìm kiếm sắp thẳng hàng cục bộ cơ bản (Basic Local Alignment Search Tool-BLAST) hoặc gói lập bản đồ đọc rút gọn (SHRiMP) (Rumble, 2009) để so sánh 500 trình tự mts-siARN được xác định là rất đặc hiệu cụm hoa so với bộ

su tập unigen của các trình tự cADN của cây ngô. Phân tích BLAST này đã cho thấy các trình tự cADN của cây ngô mà nhiều trình tự mts-siARN sắp thẳng hàng tạo ra các vùng trình tự ADN dễ xác định có các đoạn sắp thẳng hàng tạo cụm, chồng lợp của nhiều trình tự mts-siARN với mức bắt cặp hoàn toàn hoặc gần như hoàn toàn. Sáu trình tự cADN được xác định từ phân tích này là chứa một hoặc nhiều vùng giàu các trình tự đích mts-siARN. Sáu trình tự cADN này được thể hiện ở đây dưới dạng SEQ ID NO: 17; SEQ ID NO: 18; SEQ ID NO: 19; SEQ ID NO: 20; SEQ ID NO: 21; và SEQ ID NO: 22. Như một ví dụ, Fig.2 thể hiện biểu đồ sắp thẳng hàng nhiều trình tự mts-siARN trên cADN được thể hiện dưới dạng SEQ ID NO: 17. Các đường ngắn thể hiện vị trí tương đối của các trình tự đích mts-siARN (và nhờ đó định vị được vị trí gắn kết của mts-siARN trong phân tử mARN được phiên mã) mà sắp thẳng hàng với cADN. Trục Y thể hiện mức biểu hiện được chuẩn hóa của mts-siARN ở các mô được như được phát hiện trong phân tích vi đàn. Khung thể hiện vùng cADN SEQ ID NO: 17 tương ứng với các trình tự yếu tố đích mts-siARN SEQ ID NO: 1 và SEQ ID NO: 2.

Các trình tự mts-siARN được chọn sắp thẳng hàng với một trong số sáu trình tự cADN được sử dụng cho phân tích vi đàn tiếp theo để xác định sự biểu hiện khác nhau qua các mô ngô. Phân tích vi đàn các trình tự mts-siARN có các giá trị tín hiệu đã được chuẩn hóa đối với cụm hoa ở giai đoạn V8-V9, cụm hoa ở giai đoạn V10-V12, hoặc các tín hiệu kết hợp từ mô khác của chất mầm ngô LH244 và 01DKD2 được thể hiện trong các bảng 3-10. Mỗi bảng thể hiện tập con các trình tự mts-siARN được xác định là sắp thẳng hàng với một trong số sáu trình tự cADN được thể hiện ở đây dưới dạng SEQ ID NO: 17; SEQ ID NO: 18; SEQ ID NO: 19; SEQ ID NO: 20; SEQ ID NO: 21; và SEQ ID NO: 22. Các kết quả của giá trị tín hiệu được đo là các giá trị tín hiệu tương đối và sai số chuẩn ($p < 0,05$) được thể hiện bởi (STDR). Các kết quả thu được từ phân tích vi đàn đã cho thấy các trình tự mts-siARN tiêu biểu có tín hiệu cao ở cụm hoa (V8-V9 và V10-V12) và tín hiệu thấp ở mô khác điều này chứng tỏ là sự biểu hiện nội sinh của các mts-siARN này được làm giàu trong cụm hoa. Trình tự mts-siARN tương ứng với mạch có nghĩa và đối nghĩa của trình tự đích mts-siARN tương ứng trong trình tự cADN. Trình tự mts-siARN có thể có một nucleotit, hai nucleotit, hoặc ba nucleotit bắt cặp nhằm với phần được sắp thẳng hàng của trình tự cADN, và trình tự mts-siARN có thể sắp thẳng hàng với mạch có nghĩa hoặc đối nghĩa của trình tự cADN. Trình tự mts-siARN được đề cập ở đây được phát hiện thấy ở các chất mầm ngô khác nhau.

Bảng 3 thể hiện các kết quả tín hiệu vi dàn tương đối của các trình tự mts-siARN tiêu biểu (được thể hiện ở đây dưới dạng SEQ ID NO: 23 – 31) mà sắp thẳng hàng với trình tự cADN được thể hiện ở đây dưới dạng SEQ ID NO: 17, mà chứa các trình tự yếu tố đích mts-siARN được thể hiện bởi SEQ ID NO: 1 và SEQ ID NO: 2. Đối với cả hai chất mầm LH244 và 01DKD2, các tín hiệu của các trình tự mts-siARN này trong cụm hoa ở giai đoạn V8-V9 và cụm hoa ở giai đoạn V10-V12 là cao hơn tín hiệu của các trình tự mts-siARN này ở các mẫu mô khác. Các kết quả của phân tích vi dàn được thể hiện trong bảng 3 cho thấy rằng trình tự cADN được thể hiện ở đây dưới dạng SEQ ID NO: 17 có thể được sử dụng làm nguồn để thiết kế các yếu tố đích mts-siARN cho các phân tử ADN tái tổ hợp.

Bảng 3. Các kết quả của phân tích vi dàn đối với cADN nêu trong SEQ ID NO: 17

	LH244			01DKD2		
SEQ ID NO:	Cụm hoa ở giai đoạn V8-V9 (STDR)	Cụm hoa ở giai đoạn V10-V12 (STDR)	Mô khác (STDR)	Cụm hoa ở giai đoạn V8-V9 (STDR)	Cụm hoa ở giai đoạn V10-V12 (STDR)	Mô khác (STDR)
23	183,5 (36,9)	514 (105,2)	2,6 (0,6)	27 (2)	318 (46,5)	4,3 (1,5)
24	104,5 (40,9)	322 (77,5)	7,7 (3,5)	16 (1)	174 (32,3)	3 (0,7)
25	289 (99)	824,3 (146,6)	2,6 (0,7)	56 (9,1)	440 (14,1)	2,3 (1,1)
26	55,5 (4,5)	175,7 (41,2)	3,8 (1,1)	10 (7,1)	104 (26,3)	3,8 (1,8)
27	377,5 (60,1)	581,7 (76,8)	1,1 (0,3)	73 (10,1)	405,5 (3,5)	1 (0,4)
28	126,5 (32,8)	248 (46,1)	2,4 (1,4)	29 (11,1)	134,5 (31,8)	3,8 (1)
29	292,5 (25,8)	886,7 (99,7)	2,2 (0,7)	86 (11,1)	535,5 (20,7)	4 (1,2)
30	173,5 (52)	495,7 (80,9)	4,2 (1,1)	32 (1)	282 (20,2)	6,5 (1,9)
31	8 (3)	49 (15,8)	1,2 (0,4)	0 (0)	26,5 (6,6)	2,8 (0,6)

Bảng 4 thể hiện các kết quả tín hiệu vi dàn tương đối của các trình tự mts-siARN tiêu biểu (được thể hiện ở đây dưới dạng SEQ ID NO: 32 – 38) mà sắp thẳng hàng với trình tự cADN được thể hiện ở đây dưới dạng SEQ ID NO: 18, trình tự này chứa trình tự yếu tố đích mts-siARN được thể hiện bởi SEQ ID NO: 3. Đối với chất mầm LH244, các tín hiệu của các trình tự mts-siARN này ở cụm hoa ở giai đoạn V8-V9 và cụm hoa ở giai đoạn V10-V12 là cao hơn so với các tín hiệu của các trình tự mts-siARN ở các mẫu mô khác. Đối với chất mầm 01DKD2, các tín hiệu của các trình tự mts-siARN này là cao hơn ở cụm hoa ở giai đoạn V10-V12 so với các tín hiệu của các trình tự mts-siARN này ở cụm hoa ở giai đoạn V8-V9 hoặc các mẫu mô khác.

Bảng 4. Các kết quả của phân tích vi dàn đối với cADN nêu trong SEQ ID NO: 18

SEQ ID NO:	LH244			01DKD2		
	Cụm hoa ở giai đoạn V8-V9 (STDR)	Cụm hoa ở giai đoạn V10-V12 (STDR)	Mô khác (STDR)	Cụm hoa ở giai đoạn V8-V9 (STDR)	Cụm hoa ở giai đoạn V10-V12 (STDR)	Mô khác (STDR)
32	376,5 (320,7)	118 (30,8)	2 (0,6)	7,5 (3,5)	516 (307,1)	2,8 (0,9)
33	111,5 (12,6)	1032,7 (26,8)	17,8 (13,1)	4,5 (2,5)	648,5 (174,3)	2,8 (1)
34	848,5 (675,3)	572,7 (211,3)	3 (0,6)	8,5 (0,5)	982 (389,9)	3,5 (1,3)
35	437 (370,7)	117,7 (22,8)	1,6 (0,6)	4 (3)	519 (319,2)	2,8 (0,5)
36	906,5 (668,2)	606,7 (231,5)	2,2 (0,7)	15,5 (1,5)	1225,5 (480,3)	4,3 (1,5)
37	554 (370,7)	553 (48,5)	1,5 (0,4)	9,5 (1,5)	1224,5 (153)	3,3 (1,4)
38	768,5 (480,3)	1442,7 (17,2)	1,4 (0,5)	8,5 (2,5)	1305,5 (10,6)	3 (1,5)

Bảng 5 thể hiện các kết quả tín hiệu vi dàn tương đối của các trình tự mts-siARN tiêu biểu (được thể hiện ở đây dưới dạng SEQ ID NO: 39 – 42) mà sắp thẳng hàng với trình tự cADN được thể hiện ở đây dưới dạng SEQ ID NO: 18, trình tự này chứa trình tự

yếu tố đích mts-siARN được thể hiện bởi SEQ ID NO: 4. Đối với chất mầm LH244, các tín hiệu của trình tự mts-siARN ở cụm hoa ở giai đoạn V8-V9 và cụm hoa ở giai đoạn V10-V12 là cao hơn so với tín hiệu của các trình tự mts-siARN này ở các mẫu mô khác. Đối với chất mầm 01DKD2, các tín hiệu của trình tự mts-siARN là cao hơn ở cụm hoa ở giai đoạn V10-V12 so với tín hiệu của các trình tự mts-siARN này ở cụm hoa ở giai đoạn V8-V9 hoặc các mẫu mô khác. Các kết quả của phân tích vi dàn được thể hiện trong bảng 4 và bảng 5 cho thấy rằng trình tự cADN được thể hiện ở đây dưới dạng SEQ ID NO: 18 có thể được sử dụng làm nguồn để thiết kế các yếu tố đích mts-siARN cho các phân tử ADN tái tổ hợp.

Bảng 5. Các kết quả của phân tích vi dàn đối với cADN nêu trong SEQ ID NO:18

SEQ ID NO:	LH244			01DKD2		
	Cụm hoa ở giai đoạn V8-V9 (STDR)	Cụm hoa ở giai đoạn V10-V12 (STDR)	Mô khác (STDR)	Cụm hoa ở giai đoạn V8-V9 (STDR)	Cụm hoa ở giai đoạn V10-V12 (STDR)	Mô khác (STDR)
39	442,5 (242,9)	2157,3 (1059,3)	0,6 (0,2)	16 (12,1)	1514,5 (525,8)	1,5 (1,5)
40	119 (2)	448,7 (125,1)	1,5 (0,5)	7,5 (0,5)	452 (97)	2,8 (0,9)
41	185,5 (19,7)	702,7 (195,2)	0,9 (0,3)	5 (1)	752 (225,3)	3 (1,5)
42	143,5 (7,6)	564,3 (154,3)	2,6 (0,8)	6 (1)	588 (163,6)	5,3 (1,5)

Bảng 6 thể hiện các kết quả tín hiệu vi dàn tương đối của các trình tự mts-siARN tiêu biểu (được thể hiện ở đây dưới dạng SEQ ID NO: 43 – 46) mà sắp thẳng hàng với trình tự cADN được thể hiện ở đây dưới dạng SEQ ID NO: 19, trình tự này chứa trình tự yếu tố đích mts-siARN được thể hiện bởi SEQ ID NO: 5. Đối với chất mầm LH244, các tín hiệu của các trình tự mts-siARN ở cụm hoa ở giai đoạn V8-V9 và cụm hoa ở giai đoạn V10-V12 là cao hơn so với tín hiệu của các trình tự mts-siARN này ở các mẫu mô khác. Đối với chất mầm 01DKD2, tín hiệu của các trình tự mts-siARN (SEQ ID NO: 43 – 44) là cao hơn ở cụm hoa ở giai đoạn V10-V12 so với tín hiệu của các trình tự mts-siARN này ở cụm hoa ở giai đoạn V8-V9 hoặc các mẫu mô khác; và các tín hiệu của các trình tự mts-siARN (SEQ ID NO: 45 – 46) là cao hơn so với tín hiệu của các trình tự mts-

siARN này ở cả cụm hoa ở giai đoạn V8-V9 và cụm hoa ở giai đoạn V10-V12 so với mẫu mô khác.

Bảng 6. Các kết quả của phân tích vi đàn đối với cADN nêu trong SEQ ID NO: 19

SEQ ID NO:	LH244			01DKD2		
	Cụm hoa ở giai đoạn V8-V9 (STDR)	Cụm hoa ở giai đoạn V10-V12 (STDR)	Mô khác (STDR)	Cụm hoa ở giai đoạn V8-V9 (STDR)	Cụm hoa ở giai đoạn V10-V12 (STDR)	Mô khác (STDR)
43	52,5 (29,8)	147,3 (13,2)	1 (0,3)	4 (0)	190,5 (2,5)	4,3 (2,4)
44	756 (548,5)	1340 (75)	1,8 (0,5)	15,5 (1,5)	1443,5 (85,4)	6,3 (1,7)
45	7901 (1803,1)	9982,3 (2999)	8,2 (5,4)	253 (11,1)	7195,5 (759,1)	5,8 (4,1)
46	4502,5 (424,8)	8663,3 (1595,4)	8,4 (6,2)	252 (9,1)	6778 (124,2)	6,8 (3,8)

Bảng 7 thể hiện các kết quả tín hiệu vi đàn tương đối của các trình tự mts-siARN tiêu biểu (được thể hiện ở đây dưới dạng SEQ ID NO: 47 – 52) mà sắp thẳng hàng với trình tự cADN được thể hiện ở đây dưới dạng SEQ ID NO: 19, trình tự này chứa trình tự yếu tố đích mts-siARN được thể hiện bởi SEQ ID NO: 6. Đối với chất mầm LH244, các tín hiệu của các trình tự mts-siARN ở cụm hoa ở giai đoạn V8-V9 và cụm hoa ở giai đoạn V10-V12 là cao hơn so với tín hiệu của các trình tự mts-siARN này ở các mẫu mô khác. Đối với chất mầm 01DKD2, tín hiệu của trình tự mts-siARN là cao hơn ở cụm hoa ở giai đoạn V10-V12 so với tín hiệu của các trình tự mts-siARN này ở cụm hoa ở giai đoạn V8-V9 hoặc các mẫu mô khác; tín hiệu của các trình tự mts-siARN (SEQ ID NO: 47 và SEQ ID NO: 48) là cao hơn nhiều ở cụm hoa ở giai đoạn V8-V9 so với tín hiệu của các trình tự mts-siARN này ở mẫu mô khác; tín hiệu của trình tự mts-siARN (SEQ ID NO: 52) là cao hơn đáng kể ở cụm hoa ở giai đoạn V8-V9 so với tín hiệu của trình tự mts-siARN này ở mẫu mô khác; và các tín hiệu của các trình tự mts-siARN (SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, và SEQ ID NO: 51) là không khác đáng kể so với tín hiệu của các

trình tự mts-siARN này ở các mẫu mô khác. Các kết quả của phân tích vi dàn được thể hiện trong bảng 6 và bảng 7 cho thấy rằng trình tự cADN được thể hiện ở đây dưới dạng SEQ ID NO: 19 có thể được sử dụng làm nguồn để thiết kế các yếu tố đích mts-siARN cho các phân tử ADN tái tổ hợp.

Bảng 7. Các kết quả của phân tích vi dàn đối với cADN nêu trong SEQ ID NO: 19

SEQ ID NO:	LH244			01DKD2		
	Cụm hoa ở giai đoạn V8-V9 (STDR)	Cụm hoa ở giai đoạn V10-V12 (STDR)	Mô khác (STDR)	Cụm hoa ở giai đoạn V8-V9 (STDR)	Cụm hoa ở giai đoạn V10-V12 (STDR)	Mô khác (STDR)
47	157,5 (5,6)	900,7 (51,8)	15,5 (7,4)	12,5 (1,5)	1051,5 (199,5)	4 (0,7)
48	221 (106,1)	720,3 (251,7)	4,8 (2,7)	9,5 (6,6)	470,5 (57,1)	1 (0,4)
49	340 (239,4)	1241,7 (105,7)	16,3 (5,4)	57,5 (10,6)	867 (117,2)	55,3 (11,6)
50	296 (228,3)	722 (267,2)	0 (0)	5,5 (5,6)	326 (262,6)	1,8 (1,8)
51	158 (78,8)	287 (46)	34,3 (6,5)	24,5 (0,5)	275,5 (20,7)	40 (3,1)
52	4080 (1829,4)	3629,7 (1327,5)	5,5 (3,5)	234 (11,1)	3286,5 (33,8)	3,5 (2,1)

Bảng 8 thể hiện các kết quả tín hiệu vi dàn tương đối của các trình tự mts-siARN tiêu biểu (được thể hiện ở đây dưới dạng SEQ ID NO: 53 – 60) mà sắp thẳng hàng với trình tự cADN được thể hiện ở đây dưới dạng SEQ ID NO: 20, trình tự này chứa trình tự yếu tố đích mts-siARN được thể hiện bởi SEQ ID NO: 7. Đối với cả hai chất mầm LH244 và 01DKD2, các tín hiệu của các trình tự mts-siARN này ở cụm hoa ở giai đoạn V8-V9 và cụm hoa ở giai đoạn V10-V12 là cao hơn tín hiệu của các trình tự mts-siARN này ở các mẫu mô khác. Các kết quả của phân tích vi dàn được thể hiện trong bảng 8 cho thấy rằng trình tự cADN được thể hiện ở đây dưới dạng SEQ ID NO: 20 có thể được sử dụng làm nguồn để thiết kế các yếu tố đích mts-siARN cho các phân tử ADN tái tổ hợp.

Bảng 8. Các kết quả của phân tích vi dàn đối với cADN nêu trong SEQ ID NO: 20

SEQ ID NO:	LH244			01DKD2		
	Cụm hoa ở giai đoạn V8-V9 (STDR)	Cụm hoa ở giai đoạn V10-V12 (STDR)	Mô khác (STDR)	Cụm hoa ở giai đoạn V8-V9 (STDR)	Cụm hoa ở giai đoạn V10-V12 (STDR)	Mô khác (STDR)
53	76,5 (1,5)	145 (19,4)	2,2 (0,8)	16 (2)	84 (1)	1,5 (0,5)
54	100,5 (3,5)	172 (21,6)	14,2 (6,2)	56 (22,2)	231 (79,8)	19,5 (4,7)
55	377,5 (60,1)	581,7 (76,8)	1,1 (0,3)	73 (10,1)	405,5 (3,5)	1 (0,4)
56	261 (1)	692 (59,7)	49,5 (30,4)	138,5 (29,8)	599,5 (41,9)	19,3 (4,8)
57	126,5 (32,8)	248 (46,1)	2,4 (1,4)	29 (11,1)	134,5 (31,8)	3,8 (1)
58	215,5 (14,6)	349 (29,1)	0,7 (0,3)	88,5 (2,5)	327 (31,3)	2 (0,9)
59	789 (97)	1262,7 (169,2)	4,1 (2,6)	202 (24,2)	811,5 (115,7)	0,3 (0,3)
60	141,5 (9,6)	265,7 (30,1)	5,8 (1,2)	75,5 (5,6)	303 (37,4)	9,3 (1,8)

Bảng 9 thể hiện các kết quả tín hiệu vi dàn tương đối của các trình tự mts-siARN tiêu biểu (được thể hiện ở đây dưới dạng SEQ ID NO: 61 – 69) mà sắp thẳng hàng với trình tự cADN được thể hiện ở đây dưới dạng SEQ ID NO: 21, trình tự này chứa trình tự yếu tố đích mts-siARN được thể hiện bởi SEQ ID NO: 8. Đối với cả hai chất mầm LH244 và 01DKD2, các tín hiệu của các trình tự mts-siARN ở cụm hoa ở giai đoạn V8-V9 và cụm hoa ở giai đoạn V10-V12 là cao hơn tín hiệu của các trình tự mts-siARN này ở các mẫu mô khác. Các kết quả của phân tích vi dàn được thể hiện trong bảng 9 cho thấy rằng trình tự cADN được thể hiện ở đây dưới dạng SEQ ID NO: 21 có thể được sử dụng làm nguồn để thiết kế các yếu tố đích mts-siARN cho các phân tử ADN tái tổ hợp.

Bảng 9. Các kết quả của phân tích vi dàn đối với cADN nêu trong SEQ ID NO: 21

SEQ ID NO:	LH244			01DKD2		
	Cụm hoa ở giai đoạn V8-V9 (STDR)	Cụm hoa ở giai đoạn V10-V12 (STDR)	Mô khác (STDR)	Cụm hoa ở giai đoạn V8-V9 (STDR)	Cụm hoa ở giai đoạn V10-V12 (STDR)	Mô khác (STDR)
61	850,5 (8,6)	334,7 (222,3)	9,4 (3,4)	461 (154,6)	454 (1)	8 (5)
62	44,5 (5,6)	11,3 (3,9)	1,8 (0,7)	13,5 (5,6)	15,5 (6,6)	1 (1)
63	34,5 (4,5)	11,7 (2,2)	3,2 (1)	14,5 (1,5)	18 (1)	1,5 (0,5)
64	23 (8,1)	13,7 (4,6)	1,8 (1)	13,5 (13,6)	9 (8,1)	1,3 (0,9)
65	811,5 (169,2)	260,3 (103,2)	5,8 (2,7)	444,5 (4,5)	454,5 (45)	12 (8,4)
66	199,5 (54)	48 (20,6)	1,9 (0,7)	61 (44,4)	55,5 (34,9)	2,8 (1,8)
67	216 (18,2)	62 (16,6)	3,3 (2)	123,5 (0,5)	107 (17,2)	4,3 (2,6)
68	265 (86,9)	85,3 (20,4)	5 (2,3)	98 (62,6)	96 (56,6)	2,5 (2,2)
69	516 (82,8)	185 (82,1)	11,2 (4,1)	309,5 (19,7)	282,5 (2,5)	9,8 (5,5)

Bảng 10 thể hiện các kết quả tín hiệu vi dàn tương đối của các trình tự mts-siARN tiêu biểu (được thể hiện ở đây dưới dạng SEQ ID NO: 70 – 87) mà sắp thẳng hàng với trình tự cADN được thể hiện ở đây dưới dạng SEQ ID NO: 22, trình tự này chứa trình tự yếu tố đích mts-siARN được thể hiện bởi SEQ ID NO: 9. Đối với chất mầm LH244, tín hiệu của các trình tự mts-siARN (SEQ ID NO: 70, 71, 73, 75 – 81, 83-87) ở cụm hoa ở giai đoạn V8-V9 và cụm hoa ở giai đoạn V10-V12 là cao hơn tín hiệu của các trình tự mts-siARN này ở các mẫu mô khác; và tín hiệu của các trình tự mts-siARN (SEQ ID NO: 72, 74, 82) ở mô khác là cao hơn so với tín hiệu của các trình tự mts-siARN này ở cụm hoa ở giai đoạn V8-V9 hoặc cụm hoa ở giai đoạn V10-V12. Đối với chất mầm 01DKD2, tín hiệu của các trình tự mts-siARN (SEQ ID NO: 70 – 87) là cao hơn ở cụm hoa ở giai đoạn V10-V12 so với tín hiệu của các trình tự mts-siARN này ở cụm hoa ở giai đoạn V8-V9 hoặc các mẫu mô khác. Các kết quả của phân tích vi dàn được thể hiện trong bảng 10 cho thấy rằng trình tự cADN được thể hiện ở đây dưới dạng SEQ ID NO: 22 có thể được

sử dụng làm nguồn để thiết kế các yếu tố đích mts-siARN cho các phân tử ADN tái tổ hợp.

Bảng 10. Các kết quả của phân tích vi dàn đối với cADN nêu trong SEQ ID NO: 22

SEQ ID NO:	LH244			01DKD2		
	Cụm hoa ở giai đoạn V8-V9 (STDR)	Cụm hoa ở giai đoạn V10-V12 (STDR)	Mô khác (STDR)	Cụm hoa ở giai đoạn V8-V9 (STDR)	Cụm hoa ở giai đoạn V10-V12 (STDR)	Mô khác (STDR)
70	56,5 (23,7)	694 (256,9)	1,8 (0,4)	3 (3)	873 (308,1)	4 (1,5)
71	1125,5 (383,4)	2380 (696,9)	1,6 (0,5)	46 (0)	1943,5 (447)	2,3 (1,3)
72	323,5 (54)	325,7 (55,9)	1324,8 (1083,3)	332,5 (83,3)	530 (89,9)	233,3 (16,5)
73	1058,5 (370,2)	2395,7 (634,9)	4,5 (1,8)	37,5 (2,5)	1695,5 (380,3)	2 (1,4)
74	83,5 (20,7)	129 (11,2)	164,2 (106,5)	43,5 (0,5)	171 (19,2)	45,8 (4,5)
75	53 (34,3)	237,3 (62,1)	3,3 (0,5)	3 (1)	257 (74,8)	5 (1,8)
76	55 (38,4)	252,3 (66,5)	5,7 (1)	2,5 (0,5)	276,5 (81,3)	4 (1,4)
77	180,5 (64,1)	302,7 (111,2)	4,1 (2,3)	0,5 (0,5)	225 (30,3)	2,5 (0,6)
78	47,5 (15,7)	642,7 (242)	1 (0,4)	3 (2)	715,5 (211,6)	4,5 (1)
79	197,5 (62,1)	269,3 (106,8)	1,9 (0,6)	5 (1)	290,5 (28,8)	2 (0,4)
80	138 (83,8)	383,3 (44,6)	0,7 (0,3)	2,5 (1,5)	230 (43,4)	0,5 (0,3)
81	207 (113,1)	470,3 (55,2)	1,6 (1,1)	1 (1)	320 (69,7)	0 (0)
82	95,5 (29,8)	137 (17,7)	217,4 (158,6)	71,5 (7,6)	211 (14,1)	54,8 (5,1)
83	173 (63,6)	303 (82)	2,5 (1,2)	2 (1)	253,5 (24,7)	1,5 (0,6)
84	13 (5,1)	35,7 (7,1)	4,4 (1,5)	0 (0)	20 (10,1)	1 (0,4)

85	184 (71,7)	310 (109,1)	2,8 (1,3)	2,5 (0,5)	246 (14,1)	2,5 (1)
86	173,5 (62,1)	241,7 (101,2)	2,4 (0,7)	3 (1)	256,5 (7,6)	3 (0,9)
87	56 (35,4)	104 (12,7)	4,7 (2)	2,5 (0,5)	91,5 (6,6)	2,5 (1)

Các phân tích này khẳng định rằng sáu trình tự cADN (SEQ ID NO: 17 – 22) là rất giàu các trình tự đích mts-siARN và mts-siARN tương ứng thể hiện tính đặc hiệu cao ở cụm hoa. Do đó, các trình tự cADN này chứa các trình tự hữu dụng với các phương pháp sinh học phân tử để tạo ra các phân tử ADN tái tổ hợp chứa các yếu tố đích mts-siARN mà có thể làm câm gen chuyển qua trung gian mts-siARN.

Phân tích trình tự bộ gen tương ứng chứa các yếu tố đích mts-siARN được tiến hành đối với ba mươi hai chất mầm ngô khác nhau (với thời gian trưởng thành tương đối (relative maturity-RM) nằm trong khoảng từ 80 đến 120 ngày) thường được sử dụng làm chất mầm cái để lai chéo để khẳng định sự có mặt và sự biến đổi trình tự bất kỳ của các yếu tố đích mts-siARN. Đối với các yếu tố đích mts-siARN được đề cập trong SEQ ID NO: 1 và SEQ ID NO: 2, ba bộ cặp mỗi khuếch đại nhiệt được thiết kế để khuếch đại trình tự tương ứng trong trình tự cADN được thể hiện ở đây dưới dạng SEQ ID NO: 17. Các đoạn mồi này được sử dụng để tạo ra đơn vị siêu sao chép PCR trong ADN bộ gen được chiết từ mô của mỗi chất mầm. Các đơn vị siêu sao chép được tạo ra từ tất cả các chất mầm được thử nghiệm. Trình tự của đơn vị siêu sao chép qua ba mươi hai chất mầm là 100% đồng nhất với trình tự yếu tố đích mts-siARN hoặc có số vị trí đa hình nucleotit đơn tối thiểu (lên tới 95% đồng nhất). Số liệu này cho thấy rằng các cây chuyển gen được tạo ra bằng cấu trúc ADN tái tổ hợp chứa gen chuyển mã hóa protein tái tổ hợp được liên kết chức năng với yếu tố đích mts-siARN được thể hiện dưới dạng SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 2 sẽ có sự điều hòa biểu hiện protein tái tổ hợp đặc hiệu mô ở hầu hết các chất mầm của ngô. Nếu gen chuyển mã hóa protein tái tổ hợp tạo ra tính kháng glyphosat, thì các cụm hoa ở hầu hết chất mầm của ngô sẽ có tính bất thụ được cảm ứng bởi glyphosat.

Ví dụ 2: Các cấu trúc ADN tái tổ hợp và vector biến nạp thực vật

Các cấu trúc ADN tái tổ hợp và vector biến nạp thực vật được tạo ra bằng cách sử dụng các trình tự ADN tương ứng với các vùng của sáu trình tự cADN được xác định là giàu các trình tự đích mts-siARN. Các cấu trúc ADN tái tổ hợp và vector biến nạp thực

vật được thiết kế là hữu dụng để tạo ra các cây chuyển gen trong đó việc làm câm đặc hiệu cụm hoa gen chuyển được liên kết chức năng với yếu tố đích mts-siARN sẽ xảy ra nhờ làm câm qua trung gian mts-siARN.

Chín yếu tố đích mts-siARN được thiết kế bằng cách sử dụng các kết quả của phân tích sáu trình tự cADN. Mỗi yếu tố đích mts-siARN được thiết kế để có trình tự ADN chứa nhiều trình tự đích mts-siARN chồng lợp mà có thể gắn kết với các mts-siARN khác. Trình tự yếu tố đích mts-siARN được thể hiện ở đây dưới dạng SEQ ID NO: 1 có 95% tính đồng nhất trình tự với vị trí nucleotit 1429 đến 1628 của trình tự cADN được thể hiện ở đây dưới dạng SEQ ID NO: 17. Trình tự yếu tố đích mts-siARN được thể hiện ở đây dưới dạng SEQ ID NO: 2 có một nt thay đổi (T69A) so với SEQ ID NO: 1. Trình tự yếu tố đích mts-siARN được thể hiện ở đây dưới dạng SEQ ID NO: 3 tương ứng với vị trí nucleotit 239 đến 433 của trình tự cADN được thể hiện ở đây dưới dạng SEQ ID NO: 18. Trình tự yếu tố đích mts-siARN được thể hiện ở đây dưới dạng SEQ ID NO: 4 tương ứng với vị trí nucleotit 477 đến 697 của trình tự cADN được thể hiện ở đây dưới dạng SEQ ID NO: 18. Trình tự yếu tố đích mts-siARN được thể hiện ở đây dưới dạng SEQ ID NO: 5 tương ứng với vị trí nucleotit 239 đến 433 của trình tự cADN được thể hiện ở đây dưới dạng SEQ ID NO: 19. Trình tự yếu tố đích mts-siARN được thể hiện ở đây dưới dạng SEQ ID NO: 6 tương ứng với vị trí nucleotit 370 đến 477 của trình tự cADN được thể hiện ở đây dưới dạng SEQ ID NO: 19. Trình tự yếu tố đích mts-siARN được thể hiện ở đây dưới dạng SEQ ID NO: 7 tương ứng với vị trí nucleotit 1357 đến 1562 của trình tự cADN được thể hiện ở đây dưới dạng SEQ ID NO: 20. Trình tự yếu tố đích mts-siARN được thể hiện ở đây dưới dạng SEQ ID NO: 8 tương ứng với vị trí nucleotit 247 đến 441 của trình tự cADN được thể hiện ở đây dưới dạng SEQ ID NO: 21. Trình tự bổ sung ngược của trình tự yếu tố đích mts-siARN được thể hiện bởi SEQ ID NO: 9 có 99% tính đồng nhất trình tự so với vị trí nucleotit 191 đến 490 của trình tự cADN được thể hiện ở đây dưới dạng SEQ ID NO: 22 với ba nt bất cặp nhằm (C314A, A350G, và G408A) nêu trong SEQ ID NO: 22 so với trình tự bổ sung ngược nêu trong SEQ ID NO: 9. Yếu tố đích mts-siARN khác có thể được tạo ra bằng cách kết hợp các trình tự ADN của các yếu tố đích mts-siARN khác hoặc các đoạn của hai hoặc nhiều vùng cADN giàu đích mts-siARN, như bằng cách kết hợp toàn bộ hoặc các đoạn của hai hoặc nhiều yếu tố đích mts-siARN được thể hiện ở đây dưới dạng SEQ ID NO: 1-9 và/hoặc một hoặc nhiều trình tự mts-siARN được thể hiện ở đây dưới dạng SEQ ID NO:

23 - 92. Các đoạn khác nhau của các yếu tố đích mts-siARN này có chiều dài nằm trong khoảng từ 21 đến 170 nucleotit được kết hợp và các yếu tố đích mts-siARN mới được tạo ra bằng cách sử dụng các phương pháp tổng hợp ADN đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và được đề cập ở dạng SEQ ID NO: 10 - 16.

Các yếu tố đích mts-siARN được tách dòng phụ trong các cấu trúc ADN tái tổ hợp có yếu tố đích mts-siARN được liên kết chức năng với đầu 3' của khung đọc mở của gen *cp4-epsps* (SEQ ID NO: 93), mã hóa protein CP4-EPSPS tạo ra tính kháng glyphosat, và 5' so với vùng không được dịch mã 3' được liên kết chức năng (3'-UTR). Các cấu trúc ADN tái tổ hợp cũng chứa các tổ hợp được liên kết chức năng của một trong ba tổ hợp trình tự khởi đầu/intron/trình tự tăng cường khác nhau và trình tự peptit chuyển tiếp của lục lạp. Các cấu trúc catxet biểu hiện chứa trong các vector biến nạp để thử nghiệm tính hiệu quả của đích mts-siARN.

Ví dụ 3: Biến nạp thực vật và thử nghiệm về hiệu quả

Các vector biến nạp chứa các cấu trúc ADN tái tổ hợp được sử dụng với phương pháp biến nạp trên cơ sở *Agrobacterium* và các phôi ngô chưa trưởng thành và các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các mẫu lá của các cây R0 được thu gom và phân tích phân tử được tiến hành để chọn lọc các cây chuyển gen chứa một bản sao (một trình tự cài) hoặc hai bản sao (hai đoạn cài độc lập) của cấu trúc ADN tái tổ hợp và không có mặt khung vector. Các sự kiện mang một bản sao không được phun glyphosat và được tự thụ phấn và được đề xuất lấy hạt R1, trong khi đó các sự kiện mang hai bản sao được sử dụng để phun glyphosat R0 để đánh giá tính kháng sinh dưỡng và tính bất thụ được tạo ra. Các cây chuyển gen mà không được phun glyphosat có thời kì ra hoa bình thường, phát tán phấn hoa bình thường, và phát triển phấn hoa bình thường như được đánh giá bằng cách nhuộm bằng thuốc nhuộm Alexandar và quan sát dưới kính hiển vi.

Các sự kiện R0 mang hai bản sao được sử dụng trong thử nghiệm để ước lượng sự kiện đồng hợp tử mang một bản sao. Các cây được phun glyphosat ở hai giai đoạn phát triển khác nhau để xác định liệu có mặt yếu tố đích mts-siARN trong cấu trúc ADN tái tổ hợp tạo ra tính kháng glyphosat sinh dưỡng và tính bất thụ cụm hoa do glyphosat hay không. Các cây trong nhà kính được phun 1X glyphosat (0,75lb ae/acre) được phun ở giai đoạn V5 sau đó phun 1X glyphosat (0,75 lb ae/acre) được phun ở giai đoạn V8. Bảy ngày sau khi phun glyphosat ở giai đoạn V5, các cây được đánh giá về mức độ tổn thương sinh

đường trong đó các điểm $\leq 10\%$ tổn thương được coi là có tính kháng glyphosat sinh dưỡng (% kháng sinh dưỡng). Tính bất thụ đực được đánh giá bằng hai cách. Các cây mà thể hiện tính kháng glyphosat sinh dưỡng được đánh giá sau khi phun glyphosat ở giai đoạn V8 về tính bất thụ đực do glyphosat gây ra hoàn toàn được đánh giá là không có sự nhô ra của bao phấn lên đến giai đoạn S90 +12 (% bất thụ đực hoàn toàn). Sau đó, các bao phấn được thu gom và được cắt lát để quan sát sự phát triển phần hoa dưới kính hiển vi. Các bao phấn của mỗi sự kiện được thử nghiệm các hạt phấn hoa không có sức sống được tạo ra như được phát hiện bằng cách nhuộm bằng thuốc nhuộm Alexandar và quan sát dưới kính hiển vi và đánh giá là không tạo ra phần hoa có sức sống bất kỳ (% không có phần hoa). Ở các cây không được phun glyphosat, sự phát triển cụm hoa, sự nhô ra của bao phấn, và sự phát triển phần hoa là bình thường.

Các yếu tố đích mts-siARN được thử nghiệm trong nhiều cấu trúc vector biến nạp. Mỗi vector biến nạp được sử dụng để tạo ra nhiều cây R0 trong đó mỗi cây R0 thể hiện sự kiện chuyển gen duy nhất được tạo ra bằng cách sử dụng vector biến nạp này. Số liệu của ba cấu trúc vector biến nạp khác nhau được thể hiện trong các bảng 11 và 12.

Mười hai yếu tố đích mts-siARN được thử nghiệm trong cấu trúc vector thứ nhất (A) với các kết quả được thể hiện trong bảng 11. Ngạc nhiên là, tỷ lệ cây có tính kháng glyphosat sinh dưỡng nằm trong khoảng từ 80 đến 100%, nhưng tỷ lệ thể hiện tính bất thụ đực hoàn toàn do glyphosat gây ra (tính bất thụ đực được gây ra bao gồm cả dạng tạo ra phần hoa không có sức sống và không sinh phần hoa) nằm trong khoảng từ 0 đến 100%. Xem bảng 11. Ví dụ, các cây được tạo ra bằng cách sử dụng vector biến nạp chứa yếu tố đích mts-siARN được mã hóa bởi SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, hoặc SEQ ID NO: 15 có tỷ lệ tính kháng glyphosat sinh dưỡng cao (nằm trong khoảng từ 90 đến 100% cây được thử nghiệm), tuy nhiên không có sự kiện chuyển gen nào thể hiện tính bất thụ đực hoàn toàn do glyphosat gây ra; các cây được tạo ra bằng cách sử dụng vector biến nạp chứa yếu tố đích mts-siARN được mã hóa bởi SEQ ID NO: 5 hoặc SEQ ID NO: 9 có tỷ lệ kháng glyphosat sinh dưỡng cao (nằm trong khoảng từ 90 đến 100% số cây được thử nghiệm) và tỷ lệ tính bất thụ đực do glyphosat gây ra trung bình (nằm trong khoảng từ 50 đến 40% số cây được thử nghiệm); và các cây được tạo ra bằng cách sử dụng vector biến nạp chứa yếu tố đích mts-siARN được mã hóa bởi SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 7, hoặc SEQ ID NO: 8 có tỷ lệ kháng glyphosat sinh dưỡng cao (nằm trong khoảng từ 88 đến 100% số cây được thử nghiệm) và tỷ lệ tính bất thụ đực do glyphosat gây ra cao (82-

100% số cây được thử nghiệm). Sự phát triển phần hoa được đánh giá bằng cách nhuộm bằng thuốc nhuộm Alexandar. Các cây chứa bốn sự kiện được tạo ra bằng vector biến nạp chứa yếu tố đích mts-siARN được thể hiện dưới dạng SEQ ID NO: 2 và được phun glyphosat để tạo ra tính bất thụ được thể hiện các hạt phần hoa bị thui rất ít hoặc không phát hiện thấy hạt phần hoa. Các cây không được phun glyphosat có phần hoa bình thường. Xem Fig.4.

Bảng 11. Đánh giá các cây R0.

SEQ ID NO:	Cấu trúc vector	Số cây được phun	% tính kháng sinh dưỡng	% Bất thụ được hoàn toàn	% không * phần hoa
2	A	11	100	82	82
3	A	10	90	10	0
4	A	7	86	7	0
5	A	10	90	50	0
6	A	9	90	82	0
7	A	9	88	100	44
8	A	10	90	100	50
9	A	10	100	40	0
13	A	7	100	0	0
14	A	10	90	0	0
15	A	10	90	0	0
16	A	10	80	50	0

Bốn yếu tố đích mts-siARN khác được thử nghiệm trong cấu trúc vector thứ hai và thứ ba (B và C, tương ứng) với các kết quả được thể hiện trong bảng 12. Sự khác biệt cả về tỷ lệ cây có tính kháng glyphosat sinh dưỡng và tỷ lệ cây có tính bất thụ được hoàn toàn do glyphosat được quan sát giữa hai cấu trúc vector này. Cấu trúc vector B tạo ra tỷ lệ các cây có tính kháng glyphosat sinh dưỡng cao đối với tất cả các yếu tố đích mts-siARN được thử nghiệm. Đối với tỷ lệ thể hiện tính bất thụ được hoàn toàn do glyphosat, hai yếu tố đích mts-siARN (SEQ ID NO: 10 và SEQ ID NO: 11) được thử nghiệm thể hiện đặc tính tốt hơn ở cấu trúc vector C, một trong số các yếu tố đích mts-siARN (SEQ ID NO: 12) thể hiện đặc tính tốt hơn ở cấu trúc vector B, và một trong số các yếu tố đích mts-

siARN (SEQ ID NO: 1) thể hiện 100% tính bất thụ được hoàn toàn do glyphosat ở cả hai cấu trúc B và C.

Bảng 12. Đánh giá các cây R0

SEQ ID NO:	Cấu trúc vector	Các cây được phun	% tính kháng sinh dưỡng	% tính bất thụ được hoàn toàn	% Không phân hoa
1	B	9	67	100	100
10	B	10	90	55	22
11	B	2	100	50	0
12	B	10	100	50	20
1	C	13	38	100	60
10	C	6	83	100	0
11	C	9	55	80	0
12	C	15	87	23	0

Trong số các cây thể hiện tính kháng glyphosat sinh dưỡng, tỷ lệ cây có tính bất thụ được do glyphosat có phân hoa không có sức sống nằm trong khoảng từ 0 đến 100%. Đối với các cây được tạo ra bằng cách sử dụng vector biến nạp, mà có hơn 60% cây được thử nghiệm có tính kháng glyphosat sinh dưỡng và tính bất thụ được hoàn toàn do glyphosat, tỷ lệ các cây có phân hoa không có sức sống nằm trong khoảng từ 0 đến 100%. Hai yếu tố đích mts-siARN (SEQ ID NO: 1 trong cấu trúc vector B và SEQ ID NO: 2 trong cấu trúc vector A) có 100% và 82% có phân hoa không có sức sống, tương ứng. Hai yếu tố đích mts-siARN này (SEQ ID NO: 1 và SEQ ID NO: 2) khác nhau một nucleotit và được lấy từ cùng một trình tự cADN (SEQ ID NO: 17).

Ví dụ 4. Định vị miễn dịch protein CP4-EPSPS trong cụm hoa

Định vị miễn dịch protein CP4-EPSPS trong cụm hoa của các cây chuyển gen được sử dụng để phân tích sự biểu hiện protein ở cấp độ tế bào và mô để khẳng định sự mất biểu hiện protein CP4-EPSPS ở phân hoa do sự có mặt của yếu tố đích mts-siARN được liên kết chức năng. Các cây chuyển gen thế hệ R3 chứa gen chuyển *cp4-epsps* được liên kết chức năng với SEQ ID NO: 1 hoặc gen chuyển *cp4-epsps* không có yếu tố đích mts-siARN được liên kết chức năng làm đối chứng được trồng trong nhà kính. Các cây được phun 1X glyphosat (0,75 lb ae/acre) ở giai đoạn V2 để khẳng định tính kháng sinh dưỡng. Các cụm hoa có chiều cao 1cm đến 17cm được thu hoạch ở giai đoạn từ V8 đến

V12 khi mô bao phấn ở các giai đoạn tế bào mẹ hạt phấn và giai đoạn không có hạt phấn. Bao phấn được loại khỏi cụm hoa bông bằng cách sử dụng kẹp giải phẫu và cố định ngay trong 3,7% formaldehyt trong dung dịch nước muối được đệm phosphat (phosphate buffered saline-PBS) trong chân không nhẹ. Sau khi rửa trong PBS, các mô được đặt trong môi trường cố định mô và được đông lạnh ngay. Các khối mô đông lạnh được bảo quản ở nhiệt độ -80°C cho đến khi được cắt lát trong thiết bị vi phẫu ở nhiệt độ -20°C và đặt vào các lam kính.

Các lát cắt mô được phong bế bằng cách sử dụng chất phong bế (10% huyết thanh dê bình thường, 5% albumin huyết thanh bò, 0,1% Triton X-100 trong PBS) trong hai giờ. Các lát cắt được ủ với kháng thể kháng CP4-EPSPS (1/500 trong PBS). Sau khi rửa các lát cắt này ba lần trong PBS, các lát cắt mô được ủ với kháng thể thứ cấp, IgG dê kháng chuột được tiếp hợp với Alexa Flour® 488 (Invitrogen, Eugene, Oregon). Đối chứng âm được chuẩn bị bằng cách bỏ qua bước ủ với kháng thể CP4-EPSPS. Cả kháng thể sơ cấp và thứ cấp được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong hai đến bốn giờ và sau đó ủ tiếp qua đêm ở nhiệt độ 4°C. Sau khi rửa, các mô được hiện ảnh bằng kính hiển vi đồng tiêu cự Zeiss Lazar Scanning Microscope (LSM) 510 META sử dụng máy phát lượng tử ánh sáng ở bước sóng 488nm để kích thích và bước sóng 500-550nm (kênh xanh lá) cho bộ lọc phát xạ. Thông số hiện ảnh này được áp dụng cho toàn bộ các mẫu kể cả các mẫu đối chứng. Các hình ảnh huỳnh quang và ở vùng sáng được sàng lọc từ mỗi lát cắt, và hợp nhất bằng cách sử dụng phần mềm LSM sau đó thể hiện thông tin cấu trúc. Số liệu của các mẫu đối chứng âm đã cho thấy không có tín hiệu như kỳ vọng. Số liệu của các cây chuyển gen chứa gen chuyển *cp4-epsps* được liên kết chức năng với SEQ ID NO: 1 đã cho thấy tín hiệu huỳnh quang yếu chứng tỏ sự biểu hiện protein CP4-EPSPS yếu ở thành bao phấn, tầng nuôi, và tiểu bào tử phần hoa đang phát triển của bao phấn. Số liệu của các cây chuyển gen đối chứng (các cây chứa gen chuyển *cp4-epsps* nhưng không chứa yếu tố đích mts-siARN được liên kết chức năng) đã cho thấy tín hiệu huỳnh quang cao chứng tỏ sự biểu hiện protein CP4-EPSPS cao ở thành bao phấn, tầng nuôi và tiểu bào tử phần hoa đang phát triển của bao phấn.

Việc mất sự biểu hiện protein CP4-EPSPS ở phần hoa ở các cây chứa gen chuyển *cp4-epsps* được liên kết chức năng với yếu tố đích mts-siARN được thể hiện dưới dạng SEQ ID NO: 1 có liên quan đến tính bất thụ đực hoàn toàn do glyphosat được quan sát thấy ở các cây này. Số liệu này đã khẳng định rằng tính bất thụ đực hoàn toàn do

glyphosat quan sát được là kết quả của việc mất sự biểu hiện protein CP4-EPSPS ở phần hoa do sự có mặt của yếu tố đích mts-siARN được liên kết chức năng được thể hiện dưới dạng SEQ ID NO: 1.

Ví dụ 5. Các thử nghiệm trên cánh đồng

Để sử dụng tối ưu trong quá trình tạo ra cây lai mong muốn có mức nhô ra của bao phần rất thấp trong các điều kiện trên cánh đồng sau khi phun thuốc diệt cỏ kết hợp với tính kháng thuốc diệt cỏ sinh dưỡng (như được đánh giá bởi mức tổn thương cây trồng thấp). Các khía cạnh khác về quá trình tạo ra cây ngô lai cũng có thể là mong muốn, như chiều cao cây và sản lượng. Để đánh giá điểm này, các cây chuyển gen chứa gen chuyển cp4-epsps được liên kết chức năng với yếu tố đích mts-siARN được thử nghiệm ở các thể hệ trước trong các điều kiện trên cánh đồng và nhiều thông số được đánh giá.

Các thử nghiệm trên cánh đồng của các cây thể hệ R3 chứa gen chuyển cp4-epsps được liên kết chức năng với yếu tố đích mts-siARN được thể hiện dưới dạng SEQ ID NO: 1 được tiến hành ở nhiều vị trí để đánh giá tính kháng glyphosat sinh dưỡng và tính nhạy glyphosphat đặc hiệu cụm hoa. Các thử nghiệm trên cánh đồng đã thử nghiệm các cây thể hệ R3 chứa cùng một trình tự cài chuyển gen ở các vị trí khác nhau trong bộ gen. Các cây thử nghiệm chứa một bản sao của một trong số bốn sự kiện chuyển gen duy nhất được tạo ra bằng cách sử dụng cùng một vectơ biến nạp thực vật chứa gen chuyển cp4-epsps được liên kết chức năng với yếu tố đích mts-siARN được thể hiện dưới dạng SEQ ID NO: 1. Các thử nghiệm được tiến hành bằng cách sử dụng thiết kế khối đầy đủ ngẫu nhiên. Hiệu quả đa tính trạng và các thông số nông học được đánh giá suốt mùa thử nghiệm trên cánh đồng, và cuối mùa sản lượng được đánh giá. Các thử nghiệm trên cánh đồng về hiệu quả tính trạng được tiến hành bằng cách phun thuốc diệt cỏ glyphosat với lượng 0,75 lb ae/acre ở giai đoạn V7 sau đó phun 0,75 lb ae/acre ở giai đoạn V9 và đánh giá tỷ lệ tổn thương cây trồng ở giai đoạn VT (CIPVT), tỷ lệ nhô ra của bao phần trung bình ở giai đoạn S90+8 (AES9E), và sản lượng (được đánh giá bằng đơn vị bushel (1 bushel = 25,4012kg) mỗi mẫu Anh (0,4 ha) (bu/acre)) vào cuối mùa. Các thử nghiệm trên cánh đồng bao gồm sự kiện chuyển gen kháng glyphosat NK603 (số đăng ký ATCC PTA-24780) làm đối chứng âm để đánh giá tính bất thụ đực do glyphosat và làm đối chứng dương để đánh giá tính kháng glyphosat sinh dưỡng. Các cây chứa sự kiện NK603 thể hiện tính kháng glyphosat sinh dưỡng ở mức thương mại và tạo ra cụm hoa kháng

glyphosat hoàn toàn. Toàn bộ các số liệu được đưa vào phân tích phương sai và (LSD) trung bình được tách ở $p < 0,05$.

Bảng 13. Các kết quả về hiệu quả tính trạng của các thử nghiệm trên cánh đồng với các cây chứa SEQ ID NO: 1

Sự kiện	CIPVT	AES9E
Đối chứng NK603	1,25	95,00
Sự kiện 1	1,25	0
Sự kiện 2	3,75	3,25
Sự kiện 3	0	4,00
Sự kiện 4	0	1,75

Mức tổn thương cây trồng trung bình ở giai đoạn VT đối với các cây đối chứng chứa sự kiện NK603 là 1,25. Mức tổn thương cây trồng trung bình đối với các cây chứa sự kiện 1, sự kiện 2, sự kiện 3, và sự kiện 4 lần lượt là 1,25, 3,75, 0, và 0. Mức chênh lệch nhỏ nhất (LSD) đối với sự tổn thương cây trồng ở 0,05 là 10,25 đối với tất cả các sự kiện được thử nghiệm. Các kết quả này chỉ ra rằng các cây chứa bốn sự kiện chuyển gen chứa yếu tố đích mts-siARN SEQ ID NO: 1 có mức tổn thương sinh dưỡng từ không đến rất thấp khi phun glyphosat với lượng 0,75 lb ae/acre ở giai đoạn V7 sau đó là giai đoạn V9, tương tự với các cây đối chứng chứa sự kiện NK603.

Mức nhô ra của bao phấn trung bình ở giai đoạn S90+8 đối với các cây đối chứng chứa sự kiện NK603 là 95. Mức nhô ra của bao phấn trung bình ở giai đoạn S90+8 đối với các cây chứa sự kiện 1, sự kiện 2, sự kiện 3, và sự kiện 4 lần lượt là 0, 3,25, 4, và 1,75, tương ứng. Mức nhô ra của bao phấn trung bình ở giai đoạn S90+8 LSD ở 0,05 là 42,71 đối với tất cả các sự kiện được thử nghiệm. Các kết quả này chỉ ra rằng các cây chứa bốn sự kiện chuyển gen chứa yếu tố đích mts-siARN SEQ ID NO: 1 có mức nhô ra của bao phấn từ 0 đến rất thấp khi phun glyphosat với lượng 0,75 lb ae/acre ở giai đoạn V7 sau đó ở giai đoạn V9 trái ngược với các cây đối chứng chứa sự kiện NK603, mà có tính bất thụ đục hoàn toàn sau khi phun glyphosat.

Cuối mùa cây ngô được thu hoạch từ các thử nghiệm trên cánh đồng này và sản lượng được đánh giá. Sản lượng trung bình của các cây đối chứng chứa sự kiện NK603 là 96,74 bu/acre. Sản lượng trung bình của các cây chứa sự kiện 1, sự kiện 2, sự kiện 3, và sự kiện 4 lần lượt là 102,17 bu/acre, 96,48 bu/acre, 97,59 bu/acre, và 95,8 bu/acre. LSD

sản lượng ở 0,05 là 26,25 bu/acre đối với tất cả các sự kiện được thử nghiệm. Xem bảng 14. Các kết quả này chỉ ra rằng các cây chứa bốn sự kiện chuyển gen chứa yếu tố đích mts-siARN SEQ ID NO: 1 có sản lượng tương đương với NK603.

Bảng 14. Các kết quả về sản lượng của các thử nghiệm trên cánh đồng với các cây chứa SEQ ID NO: 1

Sự kiện	Sản lượng trung bình (bu/acre)
Đối chứng NK603	96,74
Sự kiện 1	102,17
Sự kiện 2	96,48
Sự kiện 3	97,59
Sự kiện 4	95,8

Các thử nghiệm trên cánh đồng của các cây nội phối thể hệ R2 hoặc thể hệ cao hơn chứa gen chuyển cp4-epsps được liên kết chức năng với các yếu tố đích mts-siARN khác nhau được tiến hành ở nhiều vị trí để đánh giá tính kháng glyphosat sinh dưỡng và tính nhạy glyphosphat đặc hiệu cụm hoa. Các thử nghiệm trên cánh đồng thử nghiệm các cây nội phối thể hệ R2 hoặc thể hệ cao hơn chứa một bản sao của gen chuyển cp4-epsps được liên kết chức năng với yếu tố đích mts-siARN SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, hoặc SEQ ID NO: 8, mỗi yếu tố trong cấu trúc vector biến nạp A. Các thử nghiệm được tiến hành bằng cách sử dụng thiết kế phong bế nhóm với yếu tố tạo nhóm là vector biến nạp, hoặc một nhóm vector biến nạp nếu số sự kiện dùng cho vector biến nạp cụ thể là thấp. Hiệu quả đa tính trạng và các thông số nông học được đánh giá qua mùa thử nghiệm trên cánh đồng, và cuối mùa sản lượng được đánh giá. Các thử nghiệm hiệu quả tính trạng trên cánh đồng được tiến hành bằng cách phun glyphosat với lượng 1,5 lbs ae/acre được phun cho cây ngô ở giai đoạn V2 sau đó phun glyphosat với lượng 0,75 lbs ae/acre cho cây ngô ở giai đoạn V8 (độ sinh trưởng ngày bằng 875) sau đó phun glyphosat với lượng 0,75 lbs ae/acre cho cây ngô ở giai đoạn V10 (độ sinh trưởng ngày bằng 1025). Đánh giá tỷ lệ tổn thương cây trồng ở giai đoạn VT (CIPVT), tỷ lệ nhô ra của bao phần trung bình ở giai đoạn S90+8 (AES90+8), chiều cao cây trung bình (tính theo inso), và sản lượng (được tính theo số bushel mỗi mẫu Anh (0,4 ha) (bu/acre)) ở cuối mùa. Các thử nghiệm trên cánh đồng bao gồm sự kiện chuyển gen NK603 kháng glyphosat làm đối chứng âm để đánh giá tính bất thụ được do glyphosat

và làm đối chứng dương để đánh giá tính kháng glyphosat sinh dưỡng. Tổ hợp các cây thụ phấn được kháng glyphosat chứa ba nền chất mầm lai được trồng cách nhau ba mảnh đất một và bao quanh toàn bộ khu thử nghiệm để làm nguồn phấn hoa cho các lần tiến hành thử nghiệm. Xử lý thuốc diệt cỏ được tiến hành bằng cách sử dụng balô CO₂ hoặc bình phun có gắn bộ phận kéo được hiệu chỉnh để phân phối 15 galông mỗi mẫu Anh (0,4 ha) (gallons per acre-GPA) bằng cách sử dụng đầu phun Teejet® TTI để phun vào không khí (TeeJet Technologies, Springfield, IL) trong đó nước là chất mang thuốc diệt cỏ. Tất cả số liệu được phân tích phương sai và (LSD) trung bình được tách ở $p < 0,05$. Các kết quả được đề cập trong bảng 15.

Không thấy có sự chênh lệch đáng kể về tỷ lệ tổn thương cây trồng ở giai đoạn VT (CIPVT) hoặc về chiều cao cây trung bình so với đối chứng NK603 ở các cây được thử nghiệm chứa yếu tố đích mts-siARN SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, hoặc SEQ ID NO: 8. Các cây chứa yếu tố đích mts-siARN SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, hoặc SEQ ID NO: 7 cũng không bị giảm đáng kể về sản lượng hạt so với đối chứng NK603. Các cây chứa yếu tố đích mts-siARN SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 7 có mức nhô ra của bao phấn từ không đến rất thấp với các giá trị AES90+8 nằm trong khoảng từ 0 đến 2,75% và nằm trong khoảng từ 0 đến 1,5%, tương ứng. Các cây chứa yếu tố đích mts-siARN SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, hoặc SEQ ID NO: 8 có mức nhô ra của bao phấn giảm đáng kể so với cây đối chứng, với các giá trị AES90+8 nằm trong khoảng từ 10% đến 25%.

Bảng 15. mts-siARN khác trong cùng một cấu trúc vectơ biến nạp A

SEQ ID NO:	# sự kiện được thử nghiệm	CIPVT (LSD=8,1)	AES90+8 (LSD = 10)	Sản lượng hạt bu/acre (LSD=24,7)	Chiều cao cây trung bình (inso) (LSD=6,9)
Không có	NK603	0-6,25%	90%	110	83,2
1	8	2,5-6,25%	0-2,75%	97-99	84,75
4	4	1,25-3,75%	16,25-18,75%	70-80	85,1
5	4	5%	10%-20%	90-100	84,31
6	7	3,75%	25%	120	82,1
7	2	3,75-5%	0-1,5%	100-110	79,8

8	2	2,5-2,7%	15,75-17,85%	80-90	80,1
---	---	----------	--------------	-------	------

Ví dụ 6. Sản xuất hạt lai

Các cây chuyển gen và hạt theo sáng chế có thể được sử dụng nhằm mục đích nhân giống kể cả để sản xuất hạt lai. Các cây ngô chuyển gen chứa cấu trúc ADN tái tổ hợp chứa gen chuyển mã hóa protein EPSPS kháng glyphosat được liên kết chức năng với yếu tố đích mts-siARN được trồng trong một khu vực, như cánh đồng mở. (Các) cây ngô bố mẹ khác có thể có hoặc không có trong khu vực này. Để kiểm soát cỏ dại trong quá trình tạo hạt, glyphosat có thể được phun lên cây ngô chuyển gen ở các giai đoạn sinh dưỡng như được chỉ ra trên các nhãn sản phẩm nông nghiệp Roundup®.

Sản xuất hạt lai có thể được tiến hành bằng cách phun glyphosat lên cây ngô chuyển gen (cây cái) bắt đầu ngay trước hoặc khi phát triển cụm hoa ở các giai đoạn tăng trưởng sinh dưỡng của ngô nằm trong khoảng từ V7 đến V13. Việc phun glyphosat sẽ tạo ra kiểu hình bất thụ đực nhờ kháng glyphosat chọn lọc mô ở các cây ngô chuyển gen. Các cây ngô chuyển gen có tính bất thụ đực được gây ra có thể được thụ phấn nhờ các cây cho phấn hoa khác (cây đực), tạo ra hạt ngô lai có sức sống mang cấu trúc ADN tái tổ hợp để tạo ra tính kháng glyphosat đặc hiệu mô. Các cây cho phấn hoa có thể có hoặc không có trong khu vực này và có thể là hoặc không phải là cây ngô chuyển gen. Quá trình thụ phấn có thể được tiến hành bằng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, bao gồm đặt các cây gần nhau hoặc thụ phấn bằng tay. Hạt lai được thu hoạch từ các cây ngô chuyển gen.

Các quy tắc theo sáng chế được minh họa và được mô tả, người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này hiểu rằng sáng chế có thể được thay đổi về trật tự và chi tiết mà không nằm ngoài các quy tắc này. Các tác giả sáng chế yêu cầu bảo hộ tất cả các thay đổi mà thuộc tinh thần và phạm vi của yêu cầu bảo hộ đi kèm.

Viện dẫn chéo đến các đơn có liên quan

Đơn này yêu cầu hưởng quyền ưu tiên của đơn tạm thời Mỹ số 62/195,546, được nộp ngày 22/07/2015, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Kết hợp danh mục trình tự

Danh mục trình tự được bao gồm trong tệp có tên “MONS392WO_ST25.txt”, mà có dung lượng 26,3 kilobit (được đánh giá trong hệ điều hành MS-Windows), được tạo ra vào ngày 28/06/2016, được nộp kèm và được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phân tử ADN tái tổ hợp chứa yếu tố đích mts-siARN bao gồm SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 2 hoặc các trình tự bổ sung với chiều dài đầy đủ của chúng, trong đó yếu tố đích mts-siARN được liên kết chức năng với phân tử polynucleotit có khả năng phiên mã khác nguồn gốc.
2. Phân tử ADN tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó phân tử polynucleotit có khả năng phiên mã khác nguồn gốc mã hóa protein tạo ra tính kháng thuốc diệt cỏ ở cây trồng.
3. Phân tử ADN tái tổ hợp theo điểm 2, trong đó phân tử polynucleotit có khả năng phiên mã khác nguồn gốc này mã hóa 5-enolpyruvyl shikimat 3-phosphat synthaza (EPSPS) kháng glyphosat.
4. Phương pháp tạo ra phân tử ADN tái tổ hợp, trong đó phương pháp này bao gồm việc liên kết chức năng yếu tố đích mts-siARN chứa SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 2 hoặc các trình tự bổ sung với chiều dài đầy đủ của chúng với phân tử polynucleotit có khả năng phiên mã khác nguồn gốc.
5. Cây chuyển gen hoặc bộ phận của nó chứa phân tử ADN tái tổ hợp theo điểm 1 trong bộ gen của nó.
6. Hạt của cây chuyển gen theo điểm 5, trong đó hạt này chứa phân tử ADN đã nêu.
7. Cây theo điểm 5, trong đó cây này là cây một lá mầm.
8. Cây theo điểm 7, trong đó cây này là cây ngô.
9. Phương pháp điều hòa chọn lọc sự biểu hiện của protein trong mô sinh sản đực của cây chuyển gen bao gồm biểu hiện phân tử ADN tái tổ hợp theo điểm 1 ở cây chuyển gen này.
10. Phương pháp theo điểm 9, trong đó protein này chứa 5-enolpyruvyl shikimat 3-phosphat synthaza (EPSPS) kháng glyphosat.
11. Phương pháp tạo ra tính bất thụ đực ở cây chuyển gen bao gồm:
 - a) trồng cây chuyển gen chứa phân tử ADN tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó phân tử polynucleotit có khả năng phiên mã khác nguồn gốc mã hóa protein tạo ra tính kháng với ít nhất một thuốc diệt cỏ thứ nhất; và
 - b) dùng một lượng hữu hiệu thuốc diệt cỏ này cho cây chuyển gen này, trong đó việc dùng thuốc diệt cỏ được tiến hành trước hoặc đồng thời với sự phát triển mô sinh sản đực của cây chuyển gen này, nhờ đó tạo ra tính bất thụ đực ở cây chuyển gen.

12. Phương pháp theo điểm 11, trong đó phân tử polynucleotit có khả năng phiên mã khác nguồn gốc này mã hóa 5-enolpyruvyl shikimat 3-phosphat synthaza (EPSPS) kháng glyphosat.
13. Phương pháp theo điểm 11, trong đó thuốc diệt cỏ này là glyphosat.
14. Phương pháp theo điểm 13, trong đó lượng hữu hiệu của thuốc diệt cỏ glyphosat này từ khoảng 0,125 pao (0,06kg) đương lượng axit trên mỗi mẫu Anh (0,4ha) đến khoảng 8 pao (3,63kg) đương lượng axit trên mỗi mẫu Anh (0,4ha).
15. Phương pháp theo điểm 11, trong đó lượng hữu hiệu của thuốc diệt cỏ này được dùng ở giai đoạn phát triển được chọn từ nhóm gồm giai đoạn V4, V5, V6, V7, V8, V9, V10, V11, V12, V13 và V14.
16. Phương pháp sản xuất hạt lai bao gồm:
 - a) dùng một lượng hữu hiệu thuốc diệt cỏ cho cây chuyển gen chứa phân tử ADN tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó phân tử polynucleotit có khả năng phiên mã khác nguồn gốc mã hóa protein tạo ra tính kháng ít nhất một thuốc diệt cỏ thứ nhất, trong đó việc dùng thuốc diệt cỏ này được tiến hành trước hoặc đồng thời với sự phát triển của mô sinh sản đực của cây chuyển gen, nhờ đó tạo ra tính bất thụ đực ở cây chuyển gen này;
 - b) thụ phấn cây chuyển gen này với phấn hoa từ một cây thứ hai; và
 - c) để cây chuyển gen này tạo ra hạt lai.
17. Phương pháp theo điểm 16, trong đó quá trình thụ phấn này là quá trình thụ phấn nhờ gió.
18. Phương pháp theo điểm 16, trong đó phân tử polynucleotit có khả năng phiên mã khác nguồn gốc này mã hóa 5-enolpyruvyl shikimat 3-phosphat synthaza (EPSPS) kháng glyphosat.
19. Phương pháp theo điểm 16, trong đó thuốc diệt cỏ này là glyphosat.
20. Phương pháp theo điểm 19, trong đó glyphosat này được dùng đồng thời với sự phát triển của cây với lượng hữu hiệu khoảng 0,125 pao (0,06kg) đương lượng axit trên mỗi mẫu Anh (0,4ha) đến khoảng 8 pao (3,63 kg) đương lượng axit trên mỗi mẫu Anh (0,4ha).
21. Hạt lai được tạo ra bằng phương pháp theo điểm 16, trong đó hạt lai chứa phân tử ADN tái tổ hợp đã nêu.

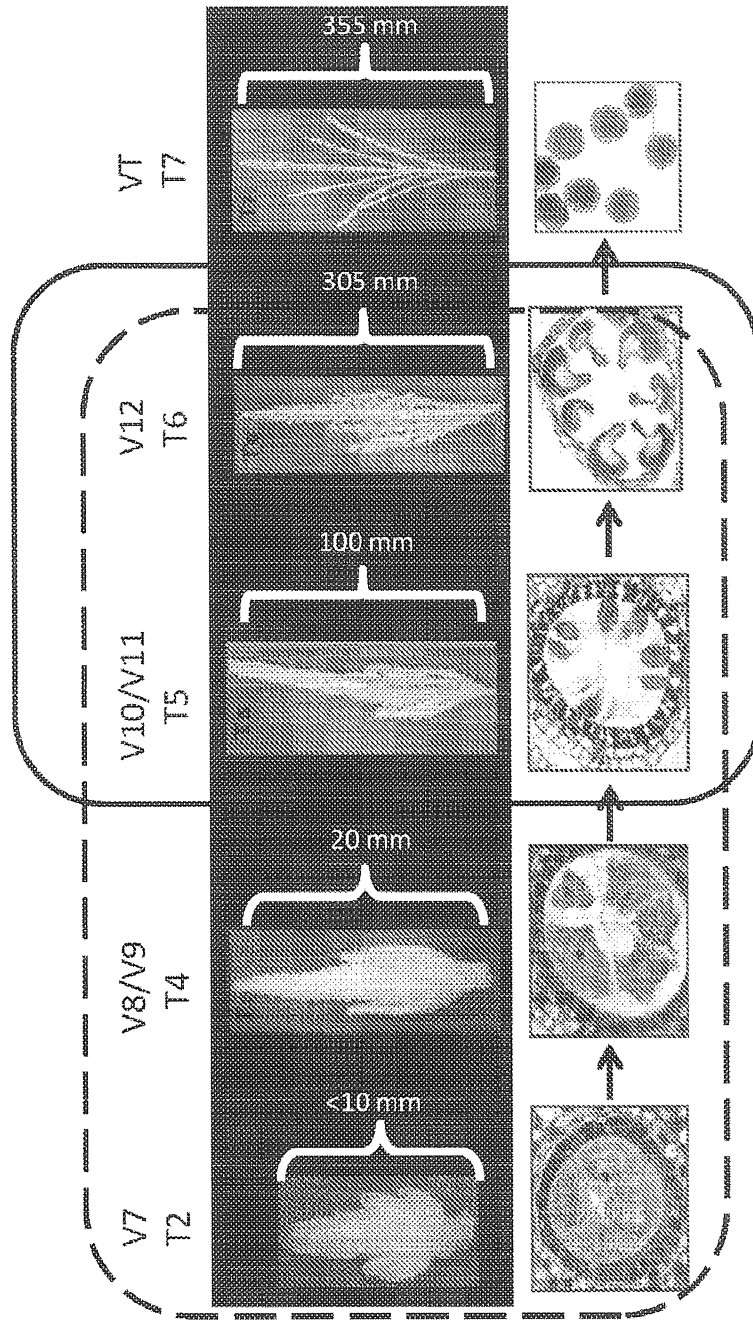


Fig.1

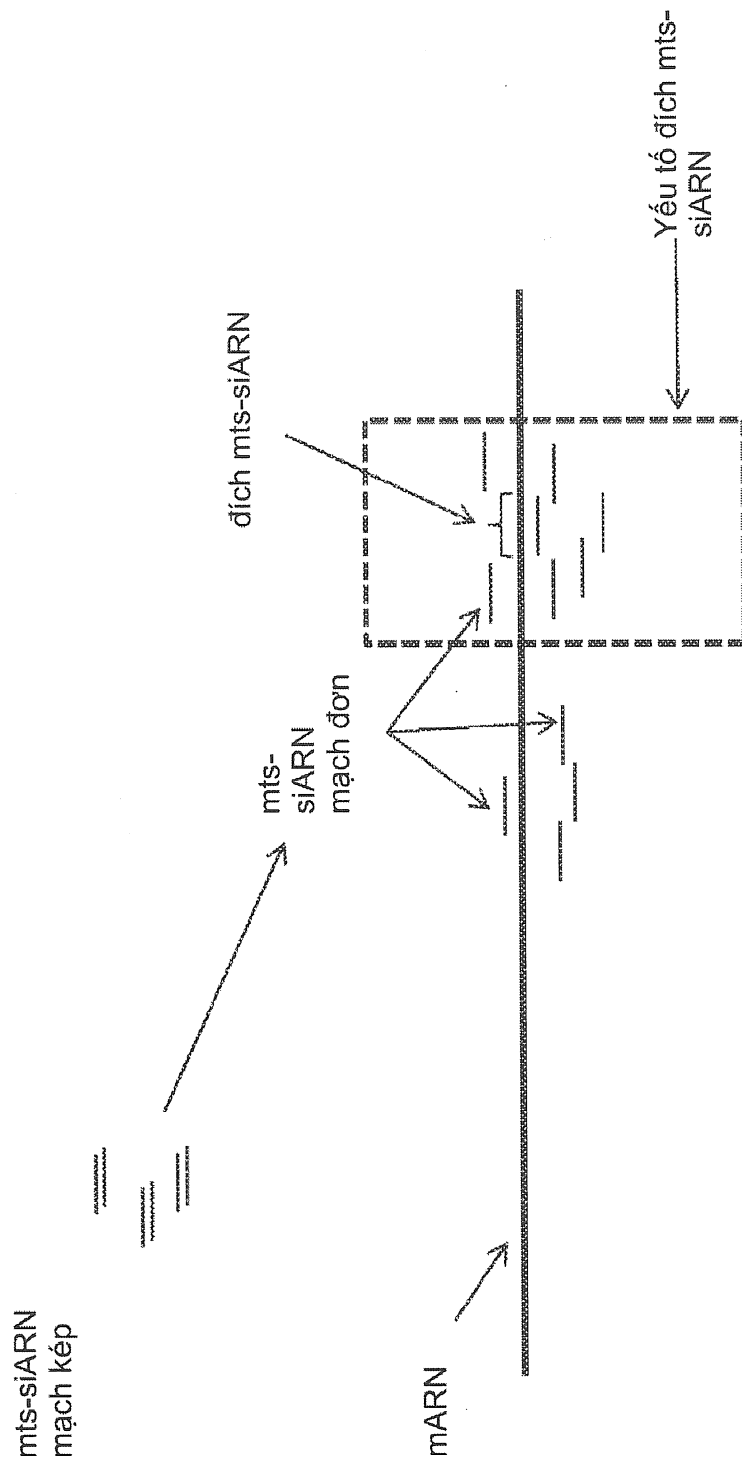


Fig.3

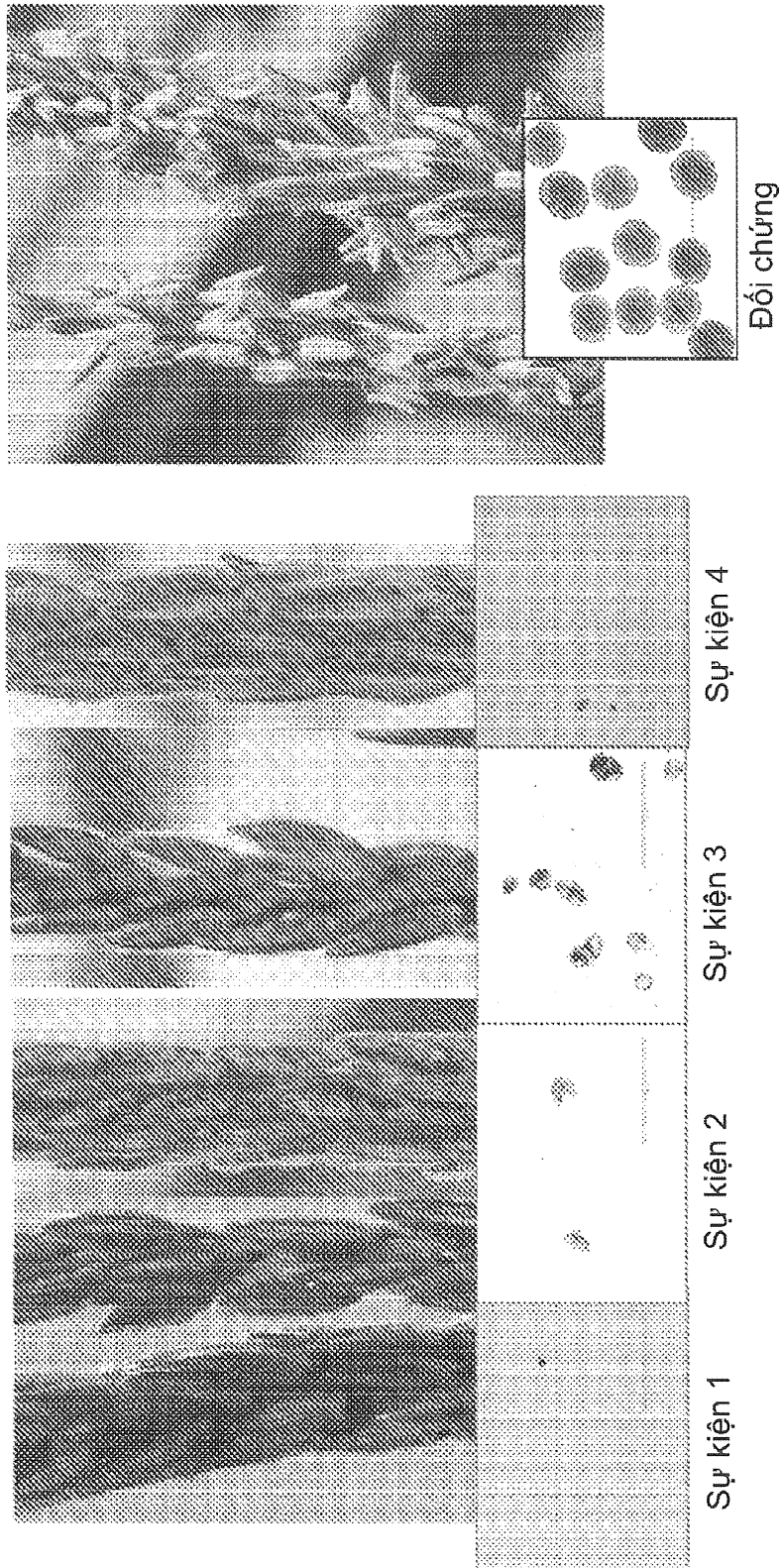


Fig.4

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Monsanto Technology LLC

<120> Phân tử ADN tái tổ hợp chứa yếu tố đích mts-siARN, phương pháp tạo ra phân tử ADN này và phương pháp điều hòa chọn lọc sự biểu hiện của protein trong mô sinh sản đực của cây chuyển gen chứa phân tử ADN này

<130> MONS:392WO

<150> 62/195,546

<151> 22-07-2015

<160> 93

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 201

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 1

agacgacgac cgtgcatggt gatgaatcac agacgacgaa cacgcatgtc gcatcgccgt 60

cctctttgta tcacacagca tcaccttctt cgctctacta ctccccgag caatcaccga 120

ccaataaac caaccatcaa cctccccgt cgccgccgcc ttcaccgtcc tccctcaca 180

ccatagaact gcaaattgtcc g 201

<210> 2

<211> 201

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 2

agacgacgac cgtgcatggt gatgaatcac agacgacgaa cacgcatgtc gcatcgccgt 60

cctctttgaa tcacacagca tcaccttctt cgctctacta ctccccgag caatcaccga 120

ccaataaac caaccatcaa cctccccgt cgccgccgcc ttcaccgtcc tccctcaca 180

ccatagaact gcaaattgtcc g 201

<210> 3

<211> 195

<212> ADN

<213> Zea mays

<400> 3

tctagccaca cggtcacgtt tggacgacca ataataggct tgcaaccctt caaattgtgt 60
ccatcagctt cccaacgtgc atatcgccat cctctgcttc gtgtcccatg tcaccacccc 120
cactcttcct ctttacatgc aatgcaaata aagcagatcc aacgtggatg aggggtgaatc 180
ggatgttgag gtggg 195

<210> 4
<211> 221
<212> ADN
<213> Zea mays

<400> 4
acgagggaat gtcattgggc gatgagttgg aggcgtcaaa tgcagataaa gctacaactt 60
ccatgtggag gatgactgcg acgttggtgc agactcatcc actacagtga gagtctagga 120
aagcatgaag ccgattgtgg acatcgatgt cgggtgtcaag gaattataga tgtcatgttg 180
ggagagcaac catggcacga tagttaaggc gcaagggtat c 221

<210> 5
<211> 108
<212> ADN
<213> Zea mays

<400> 5
tggctgcttc tgttggcgtg aaagctcgag tgctcctaaa tggtcgctgt attagctgat 60
acgacatcta cccgatgcaa tagataatat tgtttacacg cgtgagtc 108

<210> 6
<211> 108
<212> ADN
<213> Zea mays

<400> 6
tcgccagaaa gggagtagta gtattacctg atatctatgc taattcaggt ggtgtggtcg 60
ttagctactt taattgagtg ggttcagaac attcaagggt tcattgtg 108

<210> 7
<211> 206
<212> ADN
<213> Zea mays

<400> 7
ggaaccggtg accagctgca cgacgatgaa tcctacaaga cgaccatgta atacacagtg 60
tcgtcctctt cgttctacta ctcaacagag cagtcgccga ccaataacga atggagtatt 120
atctctgtcc ttacaccttac accatattca caccatagaa ctgcaaagt ccgagggtacc 180
aactaacatc ggtacctttg gcatga 206

<210> 8
 <211> 195
 <212> ADN
 <213> Zea mays

<400> 8
 agattggtca tacactagat agggctagat cactcgggtc gccacaagtt gaagaatgca 60
 aagagtgtcc acatgatttc atggatgatga acagtgatgt tatgagcaaa ctagcaaagg 120
 ataatacgtt gcatatatgt gatgaagacc gatcagtttc cgagcaaagt agcaaataag 180
 tcatcgaagc tgtca 195

<210> 9
 <211> 300
 <212> ADN
 <213> Zea mays

<400> 9
 ggacaacaag caccttcttg ccttgcaagg cctcccttcc ctatggtagc cacttgagtg 60
 gatgacttca ccttaaagct attgattccc taagtgccag acataatagg ctatacatcc 120
 tctctggtgg caacaatgag ccattttggt tgggtgtgga gtctattatt gagttttttt 180
 tggcaccgta ctcccatgga gagtagaaga caaactcttc accgttgtag tcgttgatgg 240
 tattggtggt gacgacatcc ttggtgtgca tgcactggtg agtcactggt gtactcggcg 300

<210> 10
 <211> 90
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp

<400> 10
 agacgacgac cgtgcatggt gatgaatcac agacgacgaa cacgcatgtc gcatcgccgt 60
 cctctcacac catagaactg caaatgtccg 90

<210> 11
 <211> 165
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp

<400> 11
 agacgacgac cgtgcatggt gatgaatcac agacgacgaa cacgcatgtc gcatcgccgt 60

cctctcacac catagaactg caaatgtccg acaacaagca ccttcttgcc ttgcagtatt 120

ggtggtgacg acatccttgg tgtgcatgca ctggtgagtc actgt 165

<210> 12
 <211> 170
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp

<400> 12
 agacgacgac cgtgcatggt gatgaatcac agacgacgaa cacgcatgtc gcatcgccgt 60
 cctctcacac catagaactg caaatgtccg ctcttcaccg ttgtagtcgt tgatggtatt 120
 ggtggtgacg acatccttgg tgtgcatgca ctggtgagtc actgttgtag 170

<210> 13
 <211> 82
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp

<400> 13
 acgtgataac ttctatgctg gctgtgattg ctagtgaag aaaagaatag atatggtgac 60
 atcaagtttc cactgctga cg 82

<210> 14
 <211> 106
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp

<400> 14
 cccaacgtgc atatcgccat cctctgctac gagggaaatgt cattggtcga tgagatgagg 60
 gtgaatcgga tgttgagggtg gcacgatagt taaggcgcaa gggtag 106

<210> 15
 <211> 80
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp

<400> 15
 tcgtccaaac gtgaccgtgt ggctagaagc agaggatggc gatatgcacg ttatgctttc 60

ctagactctc actgtagtgg

80

<210> 16

<211> 264

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 16

gacaacaagc accttcttgc cttgcagtat tgggtggtgac gacatccttg gtgtgcatgc 60

actggtgagt cactgttgta cgtgataact tctatgctgg ctgtgattgc tagttgaaga 120

aaagaataga tatggtgaca tcaagtttcc actgcgtgac gccaacgtgc atatcgccat 180

cctctgctac gagggaatgt cattggtcga tgagatgagg gtgaatcgga tgttgaggtg 240

gcacgatagt taaggcgcaa ggg 264

<210> 17

<211> 1826

<212> ADN

<213> Zea mays

<400> 17

atcgcttgct cgctcggtgc ttttggcagg tatagcaagc acaccccggc cttcacccat 60

cgagcctcag ttagcatctc tagctagctc ttctccacgt ttagctttca ataattccatc 120

gtctctgcag gtagccagca gacaccactt cacaagcagg atggcaatga actgggtgtt 180

gttttgccag ggtcccagcc ctatgaaagc gcgttacgtt tacgcagtgc tctttctgct 240

ggccaacttg tctgcgtggc tcacgcgaga gaaccgtata tcatattact tagcgcagcg 300

gggcaacgcc cgctgtcacg gtgaccgggg ctgtctcgcg gctcagatgg tgctgacaat 360

tagccatact ttctgtatgt ttttcgtggc catgctaata tccaccgtga ccacgtccaa 420

gttgaatgac cgcagaaatt catggcactg cgggtggtgg ccggtgaagg ttgccctttt 480

tgtaggttgt ttcttcttct ctcaggtggt tccatccggt tggatcgaaa cctacgggaa 540

aattgogcag gttggagcag gggatatttct tgtacttcag cttatgtcta ccataagatt 600

tatcacacag ctgaattaca aattatgcga gaccaatttt gaagaaagg acatccgtgt 660

cttcgcaatc tctgttactg ccatacctcac atttttggga ttgatagtat tcttgagcct 720

aaagtttgcc gagtggtggc acaatatgga gctcattgtc atcacaatgg tgctattttt 780

catcatgtgt gtagtctcac taatgtccaa ggctaacaaa tttttcatgg agcctgcatt 840

aattggtggg tacgctactt tcatatgcct gctagcgatt acaagtgaac ctgagtcagg 900

```

atgcgacatg aaacgcaaag caggtccagg tgctggttgg ttaaccattt ccttttttgt      960
ttctggactc ctcggcactg tttattctgc ttttactatg ggcatcggct acaaattgtac      1020
acgaaacacg ttggagtcgg aagacaatgt accatatggg tacggttttt ttcatttcat      1080
cttcatgtcg ggctgcatgt actttggaat gatgtttgtt gcctgggaca cacatcatac      1140
catggaagat aacgatactg ctggccagaa ttttgggagt aggctggctc caacacttcc      1200
tcgcagagat ctttgaaca gatgaccagc tgcacggcga tgaatcccat acgacgaccg      1260
tgcattggtga tgaagccgag acgacgaccg tgcattggtga tcaagccgag acgacgaccg      1320
tgcattggtga tgaagccgag acgacgaccg tgcattggtga tcaagccgag acgacgactg      1380
tgcattggtga tgaatccgag actacgaccg tgcattggtga tgaatccgag acgacgaccg      1440
tgcattggtga tgaatcacag acgacgaaca cgcattgtcac atcgccgtcc tctttgtatc      1500
acacagcgtc gccctcttcg ctctactact ccccgagca tcaccgacca ataacttga      1560
ccatcaacct cctccgtcgc cgccgcgttc accgtcctcc cctcacacca tagaactgca      1620
aatgtccgag ataccaaata tcggtacatc tggcatgaat gaagaggagg acgatgatga      1680
ctatattaga gaatgggaga gtgaatatat ggtcgctccg taattaacaa cttgtatttc      1740
gacatccact agtagaaaag agctctaagg cggggcactg gcggttcact taactgaacc      1800
gtcagtggaa aaaaaaaaaa aaaaaa      1826

```

<210> 18

<211> 757

<212> ADN

<213> Zea mays

<400> 18

```

atctagtagt tgataactat gaggtttgat aactaggagg ttcggcattg gtacatgtat      60
tgtcattatt gtttgtcgcg agtacctttg taaattttaga aatgagtcta accatatttt      120
cttagttatg tgtgagatac tggaggccac caaagctaga aatacgttga ttactatata      180
ttaatgcaga gcatggagca aagctgatct tttaaaatat acatgttacc tcottatttc      240
tagccacacg gtcacgtttg gacgaccaat aataggcttg caacccttca aattgtgtcc      300
atcagcttcc caacgtgcat atcgccatcc tctgcttcgt gtcccatgtc accaccccca      360
ctcttcctct ttacatgcaa tgcaaataaa gcagatccaa cgtggatgag ggtgaatcgg      420
atgttgaggt ggggtctgct aaatctccca aataatcaaa tggcggctgc aacaacacga      480
gggaatgtca ttggtcgatg agttggaggc gtcaaatgca gataaagcta caacttccat      540
gtggaggatg actgcgacgt tgtggcagac tcatccacta cagtgagagt ctaggaaagc      600

```

atgaagccga ttgtggacat cgatgtcggg gtcaaggact tatagatgtc atgttgggag 660
 agcaaccatg gcacgatagt taaggcgcaa gggatatctgt aatactcaaa attgtataca 720
 aggaatatat agaggtcttc tcaaaaaaaaa aaaaaaaa 757

<210> 19
 <211> 820
 <212> ADN
 <213> Zea mays

<400> 19
 atgcgctacg gcagtttgta gtttagtcta atcaagccat ggtgttgaaa cttgaccata 60
 cttgtctcaa tgagactttg gagtgaacca aatgagctta tgttcttata tgactactag 120
 ctagaagtta gaggcttagat gatggctgct tctgttggcg tgaaagctcg agtgctccta 180
 aatggtcgtc gtattagctg atacgacatc taccgatgc aatagataat attgtttaca 240
 cgcgtgagtc caaaattggt ggctttgggt cggagcagtt aatgcgagaa gtgtatttta 300
 tcacttctga gtgcaacctt ttttttatta tttttccgag cttctgcctc ttgcatatgt 360
 tgtagattct cgccgagaag ggagtagtag tattacctga tatctatgct aattcagggtg 420
 gtgtggctcg tagctacttt aattgagtgg gttcagaaca ttcaaggttt catgtgggcc 480
 gaggagaaag tggacgatga actagaaaag gacatgagca gtgcttttca acacatgaag 540
 gccatgtgca aatctttggt gctgccgaag tgtgtcgtga cattggaatt gcgggtctag 600
 aaaaacaagc tcattagatt tctgaaaaaa cattagaagt tattagattg gtagcatttt 660
 ttttaagattt aaaattttat agaagtcac attttcgttt attggaagaa atatttttgg 720
 aagttgaaaa gatgctctaa catccaacca cgaaactat cttgcaacca ctctaacacg 780
 atttcggtaa tatgttttta tgaaaaaaaa aaaaaaaaaa 820

<210> 20
 <211> 1814
 <212> ADN
 <213> Zea mays

<400> 20
 gcctcagatg ctagctagct cttctccacg tttagcttcc aatccgtcca tctctctgca 60
 gactgcaggt gagcgccata tctatctcaa tcaatctgaa gctagtaatt tgttttatac 120
 aaatctacaa gtaatcgatc atcagttaac atatgatgtc gatctgtggt gtatttgggt 180
 gaacaggggt atttcttgta gttcagctca tgagtttcac aagacttcat cacacggtta 240
 aactacaaat tgtgcgagac aaattaggtg tgtatgttta ccactgtttt aatcgatcta 300

```

acttagaaaa cgtgtgttca acgtacgagt gactgtcaag ccgatgggtg gctttgattg      360
tgtgtgttgc aaacctaata atgcatggca tgccgaacaa attttggttg gatgcatata      420
tatatgctag gacatctgag gatcatatgt gccaaatagt ttagccaatt aatttctcac      480
aagcacgcag attcagcagt tggatcaaac ttgagaaaca ccattttggt tgattcgttc      540
tcatatctgc ggagttgcta gctagttggt cttggcattg gtagtttgag aacgaatgct      600
cttagaacat cccgagtaat ttatagtgtg caaagtttga gatccgctgg gtttaatctg      660
agttagtttt gatctttaga tcaattttta aggtgctatt cgtcaatatt ggatgggtccg      720
gatcgaataa attctagtgg tcccatatga agacctttga atttcgtcca gcagattcct      780
tatggcggcc ttgtgactat attgttcgta gtttatgatt tttagacacc atttgatagg      840
gttttgagat tttcacctaa aactcctcat gctgaaaact gttgggttga tttgtcatac      900
cgggaggtct gatattcata ccggaggatg aggtctattt tactcagcct tttgagagtc      960
ttttactgat tcttctcttc ctcaattctg gcattttctg ctgtgttttt ttaaaattat    1020
tactgagtac atctccccac aaagtttagc tgtgtatagt cattgtcttt tttatatgta    1080
actgcggtggg attgaataaa aaaatataag ccaaaatcac ctagagtga tatttggttg    1140
ctcttattca agttcttttg atcgtctgct tgctctaata catgcataca ccaaatttta    1200
ttttgtcttt acgctgcaaa caaaaaccaa ctatatgcat tacatatggt gtgtgtatta    1260
tgctggctta tattaatatt tgcgtttaca gtagcgatac tgttgaccag aattttggaa    1320
ataaacccgc tccaacacct acttgcaaag atatttgga cccgtgacca gctgcacgac    1380
gatgaatcct acaagacgac catgtaatac acagtgtcgt cctcttcggt ctactactca    1440
acagagcagt cgccgaccaa taacgaatgg agtattatct ctgtccttca ccttacacca    1500
tattcacacc atagaactgc aaatgtccga ggtaccaact aacatcggtg cttttggcat    1560
gaatgatgaa tgaagaggac ggcgatgact atattagaga atgggaaagt gaataactgc    1620
tcgatctgtc actaacaatt tgtaattcaa catcagaggc atattaatth cgtttatgaa    1680
acgttgtaat atagacgtgc ctacgggtggc gtcacgtttg atgtatggat atgtttgaca    1740
tagtaagaca tgtttcatgt gtattctttt atccatacta ctcttaaaga aatacatgta    1800
tgctgatgga tgaa                                     1814

```

```

<210> 21
<211> 679
<212> ADN
<213> Zea mays

<400> 21

```

```

atgctgagca acaaagtttt acgaacatgt gaagaggaga taaaattggg catcacaatt      60
gcgtgtgcaa atgtttatgg ttcgatccat ataggattgg taggcattag gaactcagat      120
atgtctgggc ttctacatca cagggaatgg gtggaatcaa ttcgtgggtc acgccagaaa      180
agagttgtgg acataattta tatatgtttg tgagctaaaa ataagtgttg gctaccattg      240
aagtatagat tggtcataca ctagataggg ctagatcact cgggtcgcca caagttgaag      300
aatgcaaaga gtgtccacat gatttcatgg tgatgaacag tgattttatg agcaaactag      360
caaaggataa tcagttgcat atatgtgatg aagaccgatc agtttccgag caaagtagca      420
aatgagtcac cgaagctgtc atctaggaca aactcgttgt tatcgtagat tagacaacaa      480
ggctaggaca tcataccttag tcgtcagatc aagcgatgaa caacaacatg gaattggaag      540
attaagataa aaggaatagt agatatataa tggtttggtt tgatattgga ttactcaatt      600
gattgtggtc ctctaataa taaagagtgg atagtattat cctagtagaa aactttttca      660
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa                                         679

```

```

<210> 22
<211> 631
<212> ADN
<213> Zea mays

```

```

<400> 22
aacttcatat agaccatagt tagtgacagc attaaagttt gagatgttga atgctaaaaa      60
acaattagtc acaatattgt ttagataaaa atttgagatg tcggaggaag ctgctgaaaa      120
aggttaactt tatctatggg actaagcttc aattcggcat cctcccatte ttcagtctta      180
atgtcgttgc cgccgagtac aacagtgact caccagtgcg tgacacacca ggatgtcgtc      240
accaccaata ccatcaacga ctacaacggt gaagagtttg tcttctactc tccatgggag      300
tacggtgcca aaacaaactc aataatagac taccacacca accaaaatga ctcatgttg      360
ccaccagaga gaatgtatag cctattatgt ctggcactta gggaatcgat agctttaagg      420
tgaagtcatc cactcaagtg gctaccatag ggaagggagg ccttgcaagg caagaagggtg      480
cttgttgtcc gttgtgataa caccttttca acaataatgt tcatacctac attgttcgtt      540
cgtcgttggg taaaaacatt gctatatcta tttattttta ttatcatata tatattatta      600
atacttttgt ttgccaaaaa aaaaaaaaaa a                                         631

```

```

<210> 23
<211> 22
<212> ADN
<213> Zea mays

```

<400> 23	
catcaccatg cacggtcgtc gt	22
<210> 24	
<211> 18	
<212> ADN	
<213> Zea mays	
<400> 24	
atcaccatgc acggtcgt	18
<210> 25	
<211> 18	
<212> ADN	
<213> Zea mays	
<400> 25	
acgaccgtgc atggtgat	18
<210> 26	
<211> 22	
<212> ADN	
<213> Zea mays	
<400> 26	
cgcatgtcac atcgccgtcc tc	22
<210> 27	
<211> 22	
<212> ADN	
<213> Zea mays	
<400> 27	
cggacatttg cagttctatg gt	22
<210> 28	
<211> 22	
<212> ADN	
<213> Zea mays	
<400> 28	
gacatttgca gttctatggt gt	22
<210> 29	
<211> 20	
<212> ADN	
<213> Zea mays	
<400> 29	
ccgtgcatgg tgatgaatcc	20
<210> 30	

<211>	19	
<212>	ADN	
<213>	Zea mays	
<400>	30	
	caccatgcac ggtcgtcgt	19
<210>	31	
<211>	22	
<212>	ADN	
<213>	Zea mays	
<400>	31	
	acacgcatgt cacatgccg tc	22
<210>	32	
<211>	23	
<212>	ADN	
<213>	Zea mays	
<400>	32	
	tagccacacg gtcacgtttg gac	23
<210>	33	
<211>	24	
<212>	ADN	
<213>	Zea mays	
<400>	33	
	aggggtgaatc ggatgttgag gtgg	24
<210>	34	
<211>	24	
<212>	ADN	
<213>	Zea mays	
<400>	34	
	acgtgcatat cgccatcctc tgct	24
<210>	35	
<211>	24	
<212>	ADN	
<213>	Zea mays	
<400>	35	
	tagccacacg gtcacgtttg gacg	24
<210>	36	
<211>	23	
<212>	ADN	
<213>	ngô	
<400>	36	

cgtgcatatc gccatcctct gct	23
<210> 37	
<211> 24	
<212> ADN	
<213> Zea mays	
<400> 37	
cagaggatgg cgatatgcac gttg	24
<210> 38	
<211> 22	
<212> ADN	
<213> Zea mays	
<400> 38	
ctcaacatcc gattcaccct ca	22
<210> 39	
<211> 22	
<212> ADN	
<213> Zea mays	
<400> 39	
catcgaccaa tgacattccc tc	22
<210> 40	
<211> 22	
<212> ADN	
<213> Zea mays	
<400> 40	
ccttgcgct taactatcgt gc	22
<210> 41	
<211> 24	
<212> ADN	
<213> Zea mays	
<400> 41	
acccttgcg ctttaactatc gtgc	24
<210> 42	
<211> 24	
<212> ADN	
<213> Zea mays	
<400> 42	
actacagtga gagtctagga aagc	24
<210> 43	
<211> 24	

<212>	ADN	
<213>	Zea mays	
<400>	43	
	agcactcgag ctttcacgcc aaca	24
<210>	44	
<211>	24	
<212>	ADN	
<213>	Zea mays	
<400>	44	
	ttggcgtgaa agctcgagtg ctcc	24
<210>	45	
<211>	24	
<212>	ADN	
<213>	Zea mays	
<400>	45	
	taaatggtcg tcgtattagc tgat	24
<210>	46	
<211>	24	
<212>	ADN	
<213>	Zea mays	
<400>	46	
	cagctaatac gacgaccatt tagg	24
<210>	47	
<211>	23	
<212>	ADN	
<213>	Zea mays	
<400>	47	
	tggtgtggtc gttagctact tta	23
<210>	48	
<211>	24	
<212>	ADN	
<213>	Zea mays	
<400>	48	
	aaagtagcta acgaccacac cacc	24
<210>	49	
<211>	20	
<212>	ADN	
<213>	Zea mays	
<400>	49	
	tactactact cccttctcgg	20

<210>	50	
<211>	22	
<212>	ADN	
<213>	Zea mays	
<400>	50	
	ctgatatcta tgctaattca gg	22
<210>	51	
<211>	24	
<212>	ADN	
<213>	Zea mays	
<400>	51	
	tgccgaagtg tgtcgtgaca ttgg	24
<210>	52	
<211>	22	
<212>	ADN	
<213>	Zea mays	
<400>	52	
	ctgatatcta tgctaattca gg	22
<210>	53	
<211>	22	
<212>	ADN	
<213>	Zea mays	
<400>	53	
	ccatgtaata cacagtgtcg tc	22
<210>	54	
<211>	18	
<212>	ADN	
<213>	Zea mays	
<400>	54	
	catcgtcgtg cagctggt	18
<210>	55	
<211>	22	
<212>	ADN	
<213>	Zea mays	
<400>	55	
	cggacatttg cagttctatg gt	22
<210>	56	
<211>	22	
<212>	ADN	

<213> Zea mays
 <400> 56
 tacacagtgt cgtcctcttc gt 22
 <210> 57
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Zea mays
 <400> 57
 gacatttgca gttctatggt gt 22
 <210> 58
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Zea mays
 <400> 58
 cgaggtacca actaacatcg gt 22
 <210> 59
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Zea mays
 <400> 59
 atgccaaagg taccgatggt ag 22
 <210> 60
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Zea mays
 <400> 60
 cgtcgtgcag ctggtcaccg gt 22
 <210> 61
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Zea mays
 <400> 61
 ctgtgatgta gaagcccaga c 21
 <210> 62
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Zea mays
 <400> 62
 caaatgagtc atcgaagctg t 21

<210>	63	
<211>	21	
<212>	ADN	
<213>	Zea mays	
<400>	63	
	tagatcactc gggtcgccac a	21
<210>	64	
<211>	21	
<212>	ADN	
<213>	Zea mays	
<400>	64	
	gcatatatgt gatgaagacc g	21
<210>	65	
<211>	21	
<212>	ADN	
<213>	Zea mays	
<400>	65	
	cgaattgatt ccacccattc c	21
<210>	66	
<211>	21	
<212>	ADN	
<213>	Zea mays	
<400>	66	
	tggtcataca ctagataggg c	21
<210>	67	
<211>	21	
<212>	ADN	
<213>	Zea mays	
<400>	67	
	cctatctagt gtatgaccaa t	21
<210>	68	
<211>	21	
<212>	ADN	
<213>	Zea mays	
<400>	68	
	gaacagtgat tttatgagca a	21
<210>	69	
<211>	21	
<212>	ADN	
<213>	Zea mays	

<400> 69	
gctcataaaa tcactgttca t	21
<210> 70	
<211> 23	
<212> ADN	
<213> Zea mays	
<400> 70	
catgcactgg tgagtcactg ttg	23
<210> 71	
<211> 23	
<212> ADN	
<213> Zea mays	
<400> 71	
agctatcgat tccctaagt cca	23
<210> 72	
<211> 23	
<212> ADN	
<213> Zea mays	
<400> 72	
ggcctccctt ccctatggta gcc	23
<210> 73	
<211> 24	
<212> ADN	
<213> Zea mays	
<400> 73	
aagctatcga ttccctaagt gcca	24
<210> 74	
<211> 18	
<212> ADN	
<213> Zea mays	
<400> 74	
aggcctccct tccctatg	18
<210> 75	
<211> 24	
<212> ADN	
<213> Zea mays	
<400> 75	
acagtgactc accagtgcac gcac	24

<210>	76	
<211>	21	
<212>	ADN	
<213>	Zea mays	
<400>	76	
	acagtgactc accagtgcac g	21
<210>	77	
<211>	23	
<212>	ADN	
<213>	Zea mays	
<400>	77	
	aaggcaagaa ggtgcttggt gtc	23
<210>	78	
<211>	24	
<212>	ADN	
<213>	Zea mays	
<400>	78	
	gcacgcactg gtgagtcact gttg	24
<210>	79	
<211>	25	
<212>	ADN	
<213>	Zea mays	
<400>	79	
	caaggcaaga aggtgcttgt tgtcc	25
<210>	80	
<211>	22	
<212>	ADN	
<213>	Zea mays	
<400>	80	
	catcaacgac tacaacggtg aa	22
<210>	81	
<211>	24	
<212>	ADN	
<213>	Zea mays	
<400>	81	
	accatcaacg actacaacgg tgaa	24
<210>	82	
<211>	24	
<212>	ADN	
<213>	Zea mays	

<400> 82	
aggcctccct tccctatggt agcc	24
<210> 83	
<211> 18	
<212> ADN	
<213> Zea mays	
<400> 83	
caaggcaaga aggtgctt	18
<210> 84	
<211> 18	
<212> ADN	
<213> Zea mays	
<400> 84	
aagaaggtgc ttgttgtc	18
<210> 85	
<211> 23	
<212> ADN	
<213> Zea mays	
<400> 85	
caaggcaaga aggtgcttgt tgt	23
<210> 86	
<211> 24	
<212> ADN	
<213> Zea mays	
<400> 86	
caaggcaaga aggtgcttgt tgtc	24
<210> 87	
<211> 24	
<212> ADN	
<213> Zea mays	
<400> 87	
accaaggatg tcgtcaccac caat	24
<210> 88	
<211> 24	
<212> ADN	
<213> Zea mays	
<400> 88	
tcacgcagtg gaaacttgat gtca	24
<210> 89	

<211>	23	
<212>	ADN	
<213>	Zea mays	
<400>	89	
tcacgcagtg	gaaacttgat gtc	23
<210>	90	
<211>	22	
<212>	ADN	
<213>	Zea mays	
<400>	90	
cagccagcat	agaagttatc ac	22
<210>	91	
<211>	23	
<212>	ADN	
<213>	Zea mays	
<400>	91	
cacgcagtg	aaacttgatg tca	23
<210>	92	
<211>	24	
<212>	ADN	
<213>	Zea mays	
<400>	92	
atctattctt	ttcttcaact agca	24
<210>	93	
<211>	1368	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Trình tự tổng hợp	
<400>	93	
atgcttcacg	gagcttcacg taggccagct actgccagga agtctagcgg gctcagtggc	60
accgtgcgca	tccctggcga taaaagtatt tcacacagga gcttcacggt cggaggactt	120
gctagtggag	agacgagaat cactgggttg cttgagggcg aagatgttat caacaccggt	180
aaggcgatgc	aagcaatggg tgccagaatc cgaaaagagg gcgatacgtg gatcatcgac	240
gggtgttggt	acggaggatt gctcgctccc gaagcgccac ttgactttgg gaacgcagct	300
acgggggtgcc	gtcttactat gggactggta ggcgtgtatg actttgactc taccttcacg	360
gggtgacgcga	gcctcactaa gagaccaatg ggacgagtgc tgaatcccct gagggagatg	420
gggtgtccagg	tgaaatctga ggatgggtgat cgtcttccgg ttactctgcg agggcccaag	480

acccccacgc caatcacgta caggggttccg atggcgtcag cacaggtcaa gtcagcggta	540
ctcctggcgg gcctcaacac acctggaatc acaaccgtga ttgaacccat catgactaga	600
gaccacacgg agaagatggt gcaggggtttc ggcgctaatac taacggtcga aaccgacgcc	660
gacggcgtga ggacaatccg cttggagggc agaggtaaac tgactggcca agtcacgat	720
gtgctggag atccctcgtc cacagcggtt cccctcgtag ctgcgttgct cgtccctgga	780
tctgatgtga cgatcctgaa tgcctcatg aatccaacta gaaccggcct catcctcaca	840
ttgcaggaga tgggtgctga catcgagggt atcaatccta ggttggcagg tggagaggat	900
gtggccgata tgcgcgtgcg ttctagtaca ctcaaaggcg tgaccgtccc tgaggatcgc	960
gctccatcca tgatcgacga gtacccatt ctgcgcgttg ctgctgcgtt tgccgagggc	1020
gcaactgtaa tgaacggcct tgaggagttg agggttaagg agagtgcag gctgtccgcg	1080
gtggcgaatg gcctgaagct aaacggcgtg gactgcgacg aagggtgaaac gtcccttgta	1140
gtccgtggtc gccagacgg gaaggggttg gggaatgctt cgggagctgc tgtggcgacg	1200
caccttgatc atagaatcgc catgtcattt ctggtgatgg gacttgtctc cgagaatccg	1260
gtgaccgttg acgatgctac catgatcgcc acctcctttc ctgagttcat ggacctcatg	1320
gcaggcttgg gggccaagat cgagctgtct gatactaagg ccgcttga	1368