



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

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

(11)



1-0031888

(51)⁷ A01H 5/00; C12N 5/04; C12N 15/82

(13) B

(21) 1-2016-03703

(22) 10/03/2015

(86) PCT/US2015/019663 10/03/2015

(87) WO2015/142571 24/09/2015

(30) 61/968,342 20/03/2014 US

(45) 25/05/2022 410

(43) 27/02/2017 347A

(73) MONSANTO TECHNOLOGY LLC (US)

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

(72) BURNS, Wen, C. (US); GOLEY, Michael, E (US); HUANG, Jintai (US);
MCCANN, Melinda, C. (US); SHAO, Aihua (US); SPARKS, Oscar, C (US);
STOECKER, Martin, A (US); WEI, Liping (US).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) PHÂN TỬ ADN TÁI TỔ HỢP, CÂY NGÔ CHUYỂN GEN CHỨA PHÂN TỬ ADN NÀY VÀ PHƯƠNG PHÁP TẠO RA CÂY NGÔ CHUYỂN GEN CÓ KHẢ NĂNG DUNG NẠP VỚI THUỐC DIỆT CỎ DICAMBA VÀ GLUFOSINAT

(57) Sáng chế đề xuất phân tử ADN tái tổ hợp là đơn nhất đối với sự kiện ngô chuyển gen MON 87419 và cây ngô chuyển gen, các bộ phận của cây, hạt, tế bào và các sản phẩm nông nghiệp chứa sự kiện MON 87419 cũng như các phương pháp sử dụng và phát hiện sự kiện ngô chuyển gen MON 87419. Cây ngô chuyển gen chứa sự kiện MON 87419 thể hiện khả năng dung nạp với thuốc diệt cỏ dicamba và glufosinat.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các phân tử ADN tái tổ hợp là đơn nhất về sự kiện ngô chuyển gen MON 87419. Sáng chế cũng đề cập đến cây ngô, bộ phận, hạt, tế bào ngô chuyển gen và các sản phẩm nông nghiệp chứa sự kiện ngô chuyển gen MON 87419 cũng như các phương pháp ứng dụng sự kiện này. Các cây ngô chuyển gen chứa sự kiện ngô chuyển gen MON 87419 thể hiện khả năng dung nạp với các thuốc diệt cỏ dicamba và glufosinat.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Cây ngô (*Zea mays*) là cây trồng quan trọng ở nhiều vùng trên thế giới. Nhiều phương pháp công nghệ sinh học được áp dụng cho cây trồng này để tạo ra ngô có các đặc điểm mong muốn. Một trong các đặc điểm mong muốn này là khả năng dung nạp thuốc diệt cỏ. Sự biểu hiện của gen khác loại, còn được biết là gen chuyển, đối với khả năng dung nạp thuốc diệt cỏ ở thực vật có thể gây ra sự dung nạp thuốc diệt cỏ trên thực vật này. Tuy nhiên, sự biểu hiện của gen chuyển, và do đó hiệu quả của nó, có thể bị ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố khác nhau bao gồm sự định hướng và thành phần của cassette điều khiển sự biểu hiện của từng gen chuyển đã được chuyển vào nhiễm sắc thể của thực vật và vị trí trên nhiễm sắc thể và kết quả hệ gen của sự gắn xen gen chuyển này. Điều này càng phức tạp hơn ở các thực vật chuyển gen có nhiều gen chuyển được liên kết phân tử, mỗi gen này gây ra một đặc điểm riêng. Trong trường hợp này, sự biểu hiện chính xác của mỗi gen chuyển được liên kết phân tử ở thực vật phải do cùng một đột biến gắn xen gen chuyển (còn được gọi là sự kiện đa gen). Trong các trường hợp này, cần phải thiết kế và thử nghiệm nhiều cassette biểu hiện, mỗi cassette này có cấu hình các gen chuyển và yếu tố biểu hiện khác nhau, và sau đó tạo ra và phân tích một số lượng lớn các sự kiện biến nạp thực vật đơn lẻ qua nhiều thế hệ thực vật để lựa chọn sự kiện chuyển gen có các đặc điểm tốt hơn đối với mỗi đặc điểm mong muốn và mỗi đặc điểm nông học và kiểu hình tối ưu cần thiết để phù hợp với các mục đích thương mại. Việc chọn lọc này đòi hỏi phải mô tả đặc điểm phân tử rộng cũng như các thử nghiệm trong nhà kính và trên cánh đồng trong nhiều năm, ở nhiều địa điểm, và trong nhiều điều kiện khác nhau nhờ đó có thể thu được một số lượng đáng kể các số liệu nông học, kiểu hình và phân tử. Sau đó, số liệu thu được và các quan sát phải được phân tích bởi đội ngũ các nhà khoa học và nông học với mục đích lựa chọn một sự kiện thích hợp cho ứng dụng thương mại nông nghiệp trong một lượng lớn tế bào mầm và nhiều điều kiện đồng ruộng khác nhau. Khi được chọn, sự kiện thương mại tạo ra các đặc điểm mong muốn có thể được lai nhập vào các môi trường di truyền khác bằng cách sử dụng các phương pháp tạo giống cây trồng, nhờ đó tạo ra nhiều giống cây trồng khác nhau có đặc

điểm mong muốn này và được điều chỉnh thích hợp với các điều kiện nuôi trồng ở từng địa phương cụ thể.

Để tạo ra cây trồng chuyển gen chứa một sự kiện biến nạp duy nhất, phân cấu trúc ADN tái tổ hợp được chuyển vào bộ gen của tế bào ngô bằng cách sử dụng các kỹ thuật biến nạp ở thực vật. Tế bào ngô này được sử dụng tiếp để tạo ra cây R₀ đơn nhất, sau đó cây này có thể được sử dụng để tạo ra các cây con chuyển gen. Bộ gen của các cây con này chứa một sự kiện đơn nhất, và các cây này có thể được kiểm tra các đặc điểm mong muốn cũng như năng suất nông học. Hiệu quả của một sự kiện có thể bị ảnh hưởng bởi các yếu tố *cis* và/hoặc *trans* đối với vị trí tích hợp trong sự kiện biến nạp này. Kiểu hình được tạo ra bởi sự kiện này cũng có thể bị ảnh hưởng bởi cỡ và thiết kế của cấu trúc ADN mà có thể thay đổi bởi sự kết hợp các yếu tố di truyền trong cassette biểu hiện, số lượng gen chuyển, số lượng cassette biểu hiện, và cấu hình của các yếu tố và cassette này. Hiệu quả của sự kiện này có thể càng phức tạp hơn bởi các yếu tố như mô hình phát triển thực vật, kiểu ngày ngày-đêm, thời gian hoặc không gian của sự biểu hiện gen; hoặc do các yếu tố ngoại lai, ví dụ, các điều kiện môi trường ảnh hưởng đến sự sinh trưởng thực vật, sự sẵn có của nguồn nước, sự sẵn có của nguồn nitơ, nhiệt hoặc các yếu tố bất lợi. Do đó, khả năng tạo ra sự kiện sinh ra tập hợp các đặc điểm kiểu hình mong muốn không dễ dàng dự đoán được.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất phân tử ADN tái tổ hợp chứa trình tự được chọn từ nhóm chứa SEQ ID NO:1-10. Sáng chế cũng đề xuất ADN tái tổ hợp thu được từ hạt hoặc cây ngô chuyển gen chứa sự kiện ngô chuyển gen MON 87419, mẫu hạt điển hình chứa sự kiện ngô chuyển gen MON 87419 đang được lưu trữ với số truy cập ATCC là PTA-120860. Sáng chế cũng đề xuất phân tử ADN tái tổ hợp là phân tử siêu sao chép phát hiện sự có mặt của ADN thu được từ sự kiện ngô chuyển gen MON 87419. Sáng chế cũng đề xuất phân tử ADN nằm trong cây ngô, tế bào ngô, hạt ngô, cây con hoặc một bộ phận của cây thu được từ ngô chuyển gen chứa sự kiện MON 87419.

Sáng chế đề xuất phân tử ADN có chiều dài thích hợp chứa trình tự ADN kế tiếp của SEQ ID NO:10 để làm đoạn dò ADN lai trong các điều kiện lai nghiêm ngặt với phân tử ADN chứa trình tự ADN được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:1-10 và không lai trong các điều kiện lai nghiêm ngặt với phân tử ADN không chứa trình tự ADN được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:1-10. Sáng chế cũng đề xuất cặp phân tử ADN chứa phân tử ADN thứ nhất và phân tử ADN thứ hai, trong đó phân tử ADN thứ nhất là một đoạn của SEQ ID NO:9 và phân tử ADN thứ hai là một đoạn của ADN ngô chuyển gen chứa sự kiện ngô chuyển gen MON 87419, và trong đó mỗi phân tử ADN thứ nhất và thứ hai chứa trình tự ADN có chiều dài thích hợp bao gồm các nucleotit kế tiếp để làm các đoạn mồi ADN khi được sử dụng cùng nhau

trong phản ứng khuếch đại với ADN chứa sự kiện ngô chuyển gen MON 87419 để tạo ra phân tử siêu sao chép phát hiện sự kiện ngô chuyển gen MON 87419 trong mẫu.

Sáng chế đề xuất phương pháp phát hiện sự có mặt của sự kiện ngô chuyển gen MON 87419 trong mẫu ADN bằng cách cho mẫu này tiếp xúc với đoạn dò ADN, đưa mẫu này và đoạn dò ADN vào các điều kiện lai nghiêm ngặt, và phát hiện sự lai của đoạn dò ADN này với một phân tử ADN trong mẫu, tại đó sự lai của đoạn dò ADN với phân tử ADN thể hiện sự có mặt của sự kiện ngô chuyển gen MON 87419 trong mẫu ADN.

Sáng chế đề xuất phương pháp phát hiện sự có mặt của sự kiện ngô chuyển gen MON 87419 trong mẫu ADN bằng cách cho mẫu này tiếp xúc với cặp đoạn dò ADN, thực hiện phản ứng khuếch đại đủ để tạo ra phân tử siêu sao chép ADN chứa trình tự được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:1-8 và SEQ ID NO:10, và phát hiện sự có mặt của phân tử siêu sao chép ADN này trong phản ứng, trong đó sự có mặt của phân tử siêu sao chép ADN này trong phản ứng thể hiện sự có mặt của sự kiện ngô chuyển gen MON 87419 trong mẫu ADN.

Sáng chế đề xuất kit phát hiện ADN chứa ít nhất một phân tử ADN có trình tự ADN có chiều dài thích hợp bao gồm các nucleotit kế tiếp của SEQ ID NO:10 để làm đoạn dò hoặc đoạn dò đặc hiệu để phát hiện sự có mặt của sự kiện ngô chuyển gen MON 87419 trong mẫu ADN.

Sáng chế đề xuất cây ngô, hạt ngô, tế bào ngô, một bộ phận của cây ngô, hoặc sản phẩm hàng hóa từ ngô chứa một phân tử ADN có trình tự ADN được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:1-10. Sáng chế cũng đề xuất cây, hạt hoặc tế bào ngô chuyển gen có khả năng dung nạp glufosinat hoặc dicamba, hoặc thuốc diệt cỏ glufosinat và dicamba. Sáng chế cũng đề xuất cây, hạt, tế bào, bộ phận của cây ngô chuyển gen hoặc sản phẩm hàng hóa từ ngô chuyển gen chứa sự kiện MON 87419. Sáng chế cũng đề xuất cây hoặc hạt ngô chuyển gen là thể lai có ít nhất một cây bố mẹ chứa sự kiện ngô chuyển gen MON 87419.

Sáng chế đề xuất phương pháp phòng trừ cỏ dại trong một vùng bao gồm trồng cây ngô chuyển gen chứa sự kiện MON 87419 và sử dụng liều hữu hiệu dicamba hoặc glufosinat hoặc thuốc diệt cỏ dicamba và glufosinat để phòng trừ cỏ dại trong vùng này mà không làm hại đến cây ngô chuyển gen. Sáng chế cũng đề xuất phương pháp phòng trừ cỏ dại bằng cách sử dụng liều hữu hiệu của thuốc diệt cỏ glufosinat là khoảng 0,1 pound (0,045kg) đương lượng axit trên một mẫu Anh (0,405 hecta) đến khoảng 16 pound (7,2kg) đương lượng axit trên mỗi mẫu Anh (0,405 hecta) thuốc diệt cỏ glufosinat đến hết mùa sinh trưởng. Sáng chế cũng đề xuất phương pháp phòng trừ cỏ dại bằng cách sử dụng liều hữu hiệu của thuốc diệt cỏ glufosinat là khoảng 0,4 pound (0,18kg) đương lượng axit trên mỗi mẫu Anh (0,405 hecta) đến khoảng 1,59 pound (0,72kg) đương lượng axit trên mỗi mẫu Anh (0,405 hecta) thuốc diệt cỏ glufosinat đến hết mùa sinh trưởng. Sáng chế cũng đề xuất phương pháp phòng trừ cỏ dại

bằng cách sử dụng liều hữu hiệu của thuốc diệt cỏ dicamba là khoảng 0,1 pound (0,045kg) đương lượng axit trên mỗi mẫu Anh (0,405 hecta) đến khoảng 16 pound (7,2kg) đương lượng axit trên mỗi mẫu Anh (0,405 hecta) thuốc diệt cỏ dicamba đến hết mùa sinh trưởng. Sáng chế cũng đề xuất phương pháp phòng trừ cỏ dại bằng cách sử dụng liều hữu hiệu của thuốc diệt cỏ dicamba là khoảng 0,5 pound (0,22kg) đương lượng axit trên mỗi mẫu Anh (0,405 hecta) đến khoảng 2 pound (0,9kg) đương lượng axit trên mỗi mẫu Anh (0,405 hecta) thuốc diệt cỏ dicamba đến hết mùa sinh trưởng.

Sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra cây ngô chuyển gen có khả năng dung nạp với thuốc diệt cỏ dicamba và glufosinat bằng cách lai hữu tính một cây ngô chuyển gen chứa sự kiện ngô chuyển gen MON 87419 với cây ngô thứ hai, thu hoạch hạt được tạo ra, trồng hạt này để tạo ra cây con, xử lý cây con bằng glufosinat hoặc dicamba, hoặc thuốc diệt cỏ dicamba và glufosinat, và chọn lọc cây con có khả năng dung nạp với thuốc diệt cỏ dicamba và glufosinat. Sáng chế cũng đề xuất phương pháp tạo ra cây ngô chuyển gen có khả năng dung nạp thuốc diệt cỏ dicamba và glufosinat bằng cách tự thụ phấn cây ngô chuyển gen chứa sự kiện ngô chuyển gen MON 87419, thu hoạch hạt được sinh ra, trồng hạt này để tạo ra cây con, xử lý cây con bằng glufosinat hoặc dicamba, hoặc thuốc diệt cỏ dicamba và glufosinat, và chọn lọc cây con có khả năng dung nạp với thuốc diệt cỏ dicamba và glufosinat.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1: minh họa tổ chức của sự gắn xen gen chuyển trong bộ gen của cây ngô chứa sự kiện ngô chuyển gen MON 87419. Các đường nằm ngang tương ứng với các vị trí tương đối của SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10; các mũi tên in đậm có ký hiệu SQ26644 và SQ26645 thể hiện vị trí gần đúng của cặp đoạn mỗi được sử dụng để xác định cây ngô chuyển gen chứa sự kiện MON 87419; các đường ngắn, in đậm được đánh số từ 14 đến 22 thể hiện vị trí tương đối của các trình tự cấu trúc tái tổ hợp đơn nhất nằm trong gắn xen ADN (SEQ ID NO:9) và con số thể hiện SEQ ID NO tương ứng của mỗi trình tự; các mũi tên nằm ngang in nét thường thể hiện tổ chức tương đối của hai cassette biểu hiện riêng biệt chứa ADN được gắn xen gen chuyển khác loại chứa sự kiện ngô chuyển gen MON 87419 và các ô thể hiện các yếu tố riêng biệt của hai cassette biểu hiện này; tiền tố “P” đứng trước thể hiện yếu tố trình tự khởi động, tiền tố “L” đứng trước thể hiện yếu tố dẫn đầu, tiền tố “I” thể hiện intron, tiền tố “TS” thể hiện peptit chuyển lap lục, tiền tố “T” thể hiện yếu tố kết thúc phiên mã và polyadenyl hóa 3’ (3’ UTR), *pat* thể hiện vùng mã hóa cho protein phosphinothricin axetyl transferaza (PAT), và *dmo* thể hiện vùng mã hóa cho protein dicamba mono-oxygenaza (DMO).

Mô tả vắn tắt các trình tự

SEQ ID NO:1 là trình tự ADN gồm 30 nucleotit thể hiện vùng nối 5' của ADN bộ gen ngô và sự gắn xen gen chuyển. SEQ ID NO:1 tương ứng với các vị trí nucleotit từ 1232 đến 1261 của SEQ ID NO:10.

SEQ ID NO:2 là trình tự ADN gồm 30 nucleotit thể hiện vùng nối 3' của ADN bộ gen ngô và sự gắn xen gen chuyển. SEQ ID NO:2 tương ứng với các vị trí nucleotit từ 7994 đến 8023 của SEQ ID NO:10.

SEQ ID NO:3 là trình tự ADN gồm 60 nucleotit thể hiện vùng nối 5' của ADN bộ gen ngô và đột biến gắn xen gen chuyển. SEQ ID NO:3 tương ứng với các vị trí nucleotit từ 1217 đến 1276 của SEQ ID NO:10.

SEQ ID NO:4 là trình tự ADN gồm 60 nucleotit thể hiện vùng nối 3' của ADN bộ gen ngô và đột biến gắn xen gen chuyển. SEQ ID NO:4 tương ứng với các vị trí nucleotit từ 7979 đến 8038 của SEQ ID NO:10.

SEQ ID NO:5 là trình tự ADN gồm 100 nucleotit thể hiện vùng nối 5' của ADN bộ gen ngô và đột biến gắn xen gen chuyển. SEQ ID NO:5 tương ứng với các vị trí nucleotit từ 1197 đến 1296 của SEQ ID NO:10.

SEQ ID NO:6 là trình tự ADN gồm 100 nucleotit thể hiện vùng nối 3' của ADN bộ gen ngô và sự gắn xen gen chuyển. SEQ ID NO:6 tương ứng với các vị trí nucleotit từ 7959 đến 8058 của SEQ ID NO:10.

SEQ ID NO:7 là trình tự ADN gồm 1771 nucleotit thể hiện 1246 nucleotit của ADN vùng bên ở đầu 5' của bộ gen ngô và 525 nucleotit của đầu cùng 5' của gắn xen gen chuyển.

SEQ ID NO:8 là trình tự ADN gồm 1767 nucleotit thể hiện 516 nucleotit của đầu 3' của gắn xen gen chuyển và 1251 nucleotit của ADN vùng bên ở đầu 3' của bộ gen ngô.

SEQ ID NO:9 là trình tự ADN gồm 6762 nucleotit tương ứng với sự gắn xen gen chuyển của sự kiện ngô chuyển gen MON 87419.

SEQ ID NO:10 trình tự ADN gồm 9259 nucleotit tương ứng với sự kiện ngô chuyển gen MON 87419; trình tự này chứa trình tự ADN vùng bên của bộ gen ở đầu 5' từ vị trí 1 đến 1246, đột biến gắn xen ADN chuyển gen từ vị trí 1247 đến 8008, và từ vị trí 1247 đến 8008, và trình tự ADN vùng bên ở đầu 3' của bộ gen từ vị trí 8009 đến 9259.

SEQ ID NO:11 là trình tự ADN gồm 33 nucleotit tương ứng với đoạn mỗi được gọi là SQ26644 và được sử dụng để xác định ADN có sự kiện ngô chuyển gen MON 87419 trong mẫu; nó tương ứng với các vị trí từ 7966 đến 7998 của SEQ ID NO:10.

SEQ ID NO:12 là trình tự ADN gồm 24 nucleotit tương ứng với đoạn mỗi được gọi là SQ26645 và được sử dụng để xác định ADN chứa sự kiện ngô chuyển gen MON 87419 trong mẫu; nó tương ứng với các vị trí từ 8022 đến 8045 của SEQ ID NO:10.

SEQ ID NO:13 là trình tự ADN gồm 19 nucleotit tương ứng với đoạn dò được gọi là PB11207 và được sử dụng để xác định ADN chứa sự kiện ngô chuyển gen MON 87419 trong mẫu; nó tương ứng với các vị trí từ 8002 đến 8020 của SEQ ID NO:10.

Các SEQ ID NO:14-22 là các trình tự ADN tương ứng với các trình tự đơn nhất nằm trong đột biến gắn xen gen chuyển của sự kiện ngô chuyển gen MON 87419.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các định nghĩa và các phương pháp sau đây được cung cấp để làm rõ hơn về sáng chế và để hướng dẫn người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này thực hành theo sáng chế. Trừ khi được định nghĩa khác, các thuật ngữ được hiểu theo cách sử dụng thông thường bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực tương ứng.

Các kỹ thuật biến nạp thực vật hiện đại được sử dụng để tạo ra thực vật được thao tác di truyền. Thuật ngữ “chuyển gen” cũng có thể được sử dụng để đề cập đến thực vật được thao tác di truyền. Trong quá trình tạo ra thực vật chuyển gen, ADN ngoại lai được gắn xen ngẫu nhiên vào bộ gen của tế bào thực vật. Trong quy trình biến nạp này, nhiều tế bào đơn lẻ được biến nạp. Do sự tích hợp ngẫu nhiên, sự kiện tái tổ hợp ADN riêng biệt và đơn nhất sẽ diễn ra trong bộ gen của từng tế bào thực vật đơn lẻ đã được biến nạp. Sau đó toàn bộ thực vật chuyển gen được tạo ra từ một tế bào chuyển gen đơn lẻ duy nhất, tế bào này tất yếu dẫn đến mọi tế bào của thực vật chuyển gen đều chứa ADN đã gắn xen đơn nhất như là một phần ổn định trong bộ gen của nó. Ngô chuyển gen chứa sự kiện MON 87419 có khả năng dung nạp thuốc diệt cỏ có sự gắn xen ADN chuyển gen đơn lẻ vào nhiễm sắc thể/bộ gen của chất mầm ngô. Sự kiện ngô chuyển gen MON 87419 được tạo ra bằng cách: (i) biến nạp hàng nghìn tế bào cây ngô bằng cấu trúc axit nucleic chứa gen chuyển cần quan tâm, (ii) tái sinh quần thể cây ngô, mỗi cây chứa một sự kiện chuyển gen đơn nhất, và (iii) thử nghiệm trong nhiều năm, sàng lọc, và lựa chọn để chọn lọc ra sự kiện có các đặc điểm nông học mong muốn, sự kiện ngô chuyển gen MON 87419. Sự kiện ngô chuyển gen MON 87419 được mô tả là trình tự ADN đơn nhất có sự gắn xen gen chuyển vào vị trí cụ thể của bộ gen ngô.

Việc gắn xen ADN chuyển gen vào bộ gen ngô được thực hiện bằng kỹ thuật biến nạp thực vật và tạo ra trình tự phân tử chuyển gen mới của bộ gen, được gọi là “sự kiện”. Trình tự này là đơn nhất và đặc trưng cho sự kiện này và có thể được xác định dễ dàng khi được so sánh với trình tự gốc của bộ gen ngô hoặc các sự kiện chuyển gen ngô khác. Phân tích phân tử sự kiện ngô chuyển gen MON 87419 xác định vị trí gắn xen vào bộ gen của ADN được gắn xen (SEQ ID NO:9) và trình tự ADN bên của bộ gen ngô nằm ngay cạnh một trong hai sườn của ADN đã gắn xen (SEQ ID NO:7 và SEQ ID NO:8). Do đó kiểu sắp xếp ADN gắn xen này đối với ADN bộ gen ngô xung quanh là đặc hiệu và đơn nhất đối với ngô chuyển gen có khả năng dung nạp thuốc diệt cỏ chứa sự kiện ngô chuyển gen MON 87419. Trình tự phân tử mới

của bộ gen (SEQ ID NO:10) cũng là một phần nguyên vẹn của nhiễm sắc thể ở cây ngô chuyển gen có khả năng dung nạp thuốc diệt cỏ chứa sự kiện ngô chuyển gen MON 87419 và do đó là ổn định trong cây trồng này và có thể được chuyển lên dòng con của cây này.

Sáng chế cũng đề xuất dòng con của thể biến nạp gốc chứa sự kiện ngô chuyển gen MON 87419. Dòng con này có thể được tạo ra bằng cách tự thụ phấn cây ngô chứa sự kiện ngô chuyển gen MON 87419 hoặc bằng cách lai chéo xa hữu tính giữa cây ngô chứa sự kiện ngô chuyển gen MON 87419 và cây khác chứa hoặc không chứa sự kiện ngô chuyển gen MON 87419. Cây khác này có thể là cây chuyển gen chứa cùng một sự kiện hoặc các sự kiện khác nhau hoặc cây không chuyển gen, chẳng hạn như cây thuộc loài khác. Ngay cả sau khi lai ngược lặp lại đến dòng bố mẹ hồi phục, sự kiện ngô chuyển gen MON 87419 từ dòng bố mẹ đã biến nạp hiện diện trong dòng con của phép lai ở cùng một vị trí trong bộ gen.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “ngô” nghĩa là *Zea mays* (còn được gọi là ngô) và bao gồm tất cả các loài cây có thể được lai với ngô.

Sáng chế đề xuất cây ngô chuyển gen có khả năng dung nạp thuốc diệt cỏ chứa sự kiện MON 87419 có khả năng dung nạp thuốc diệt cỏ dicamba (axit 3,6-diclo-2-metoxibenzoic) và thuốc diệt cỏ glufosinat (axit 2-amino-4-(hydroxymethylphosphinyl)-butanoic). Dicamba là thuốc diệt cỏ auxin tổng hợp hữu ích để phòng trừ cỏ dại lá to. Glufosinat là thuốc diệt cỏ phospho hữu cơ hữu ích cho việc phòng trừ nhiều loài cỏ sống một năm và lâu năm và cỏ dại lá to. Sự kiện ngô chuyển gen MON 87419 chứa gen demetylaza (*dmo*) của *Stenotrophomonas maltophilia* biểu hiện protein dicamba mono-oxygenaza (DMO) để gây ra khả năng dung nạp thuốc diệt cỏ dicamba và gen kháng bialaphos (*pat*) của *Streptomyces viridochromogenes* biểu hiện protein phosphinothricin N-axetyltransferaza (PAT) gây ra khả năng dung nạp thuốc diệt cỏ glufosinat.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “tái tổ hợp” dùng để chỉ ADN, protein, hoặc sinh vật không tự nhiên mà bình thường không tìm thấy được trong tự nhiên và được tạo ra bởi can thiệp của con người. Như được sử dụng ở đây, “phân tử ADN tái tổ hợp” là một phân tử ADN chứa tổ hợp của các phân tử ADN mà bình thường không xuất hiện cùng nhau và là kết quả của sự can thiệp của con người, ví dụ, một phân tử ADN bao gồm tổ hợp của ít nhất là hai phân tử ADN khác loại với nhau, như một phân tử ADN chứa gen chuyển và ADN bộ gen của thực vật kè sát gen chuyển này. Ví dụ về phân tử ADN tái tổ hợp là một phân tử ADN chứa ít nhất là một trình tự được chọn từ SEQ ID NO:1-10. Như được sử dụng ở đây, “cây trồng tái tổ hợp” là cây trồng mà bình thường không tồn tại trong tự nhiên, là kết quả của sự can thiệp của con người, và chứa phân tử ADN chuyển gen. Kết quả của sự biến đổi bộ gen này là cây trồng tái tổ hợp là một loại cây mới và khác biệt rõ ràng với cây kiểu hoang cùng họ. Ví dụ về cây trồng tái tổ hợp là cây ngô chứa sự kiện MON 87419.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “gen chuyển” dùng để chỉ một phân tử ADN được kết hợp nhân tạo vào bộ gen của một sinh vật như là kết quả của sự can thiệp của con người, chẳng hạn bằng các phương pháp biến nạp thực vật. Gen chuyển này có thể là khác loài với sinh vật này. Thuật ngữ “gắn xen gen chuyển” như được sử dụng ở đây dùng để chỉ gen chuyển được gắn xen bằng kỹ thuật biến nạp thực vật vào bộ gen ngô để tạo ra sự kiện MON 87419. Trình tự của đột biến gắn xen gen chuyển này được đề xuất là SEQ ID NO:9. Thuật ngữ “chuyển gen” dùng để chỉ việc chứa gen chuyển, ví dụ, “cây trồng chuyển gen” dùng để chỉ cây trồng chứa gen chuyển.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “khác loại” dùng để chỉ phân tử thứ nhất mà bình thường không kết hợp với phân tử thứ hai hoặc một sinh vật trong tự nhiên. Ví dụ, một phân tử ADN có thể thu được từ loài thứ nhất và được gắn xen vào bộ gen của loài thứ hai. Do đó, phân tử ADN này sẽ là khác loại với bộ gen và sinh vật này.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “khảm” dùng để chỉ một phân tử ADN duy nhất được tạo ra bằng cách dung hợp phân tử ADN thứ nhất vào phân tử ADN thứ hai, trong đó cả phân tử ADN thứ nhất và thứ hai, bình thường, đều không thể được tìm thấy trong cấu hình được dung hợp với nhau đó. Do đó, phân tử ADN khảm là phân tử ADN mới mà bình thường không tìm thấy được trong tự nhiên. Một ví dụ về phân tử ADN khảm là phân tử ADN chứa ít nhất một trình tự được chọn từ SEQ ID NO:1-10.

Sáng chế đề xuất các phân tử ADN và các trình tự ADN tương ứng của chúng. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “ADN” và “phân tử ADN” dùng để chỉ phân tử axit deoxyribonucleic (ADN). Một phân tử ADN có thể có nguồn gốc từ bộ gen hoặc tổng hợp, và theo quy ước từ đầu 5’ (ngược dòng) đến đầu 3’ (xuôi dòng). Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “trình tự ADN” dùng để chỉ trình tự nucleotit của một phân tử ADN. Danh pháp được sử dụng là danh pháp được yêu cầu bởi Đề mục 37 của Bộ pháp điển các quy định liên bang Mỹ § 1.822 và được chỉ ra trong các bảng trong WIPO Standard ST.25 (1998), Phụ lục 2, bảng 1 và 3. Theo quy ước, các trình tự ADN theo sáng chế và các đoạn của chúng được mô tả kèm theo viện dẫn đến một chuỗi duy nhất trong hai chuỗi trình tự ADN bổ sung. Có thể hiểu là, các trình tự bổ sung của các trình tự được đề xuất ở đây (các trình tự của chuỗi bổ sung này), còn được gọi trong lĩnh vực này là các chuỗi bổ sung đảo, nằm trong phạm vi của sáng chế và được dự định nằm trong phạm vi của các đối tượng được yêu cầu bảo hộ. Do đó, như được sử dụng ở đây các viện dẫn đến SEQ ID NO:1-10 và SEQ ID NO:14-22 và các đoạn của nó bao gồm và dùng để chỉ trình tự của chuỗi bổ sung và các đoạn của chúng.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “đoạn” dùng để chỉ phần nhỏ hơn của toàn bộ. Ví dụ, các đoạn của SEQ ID NO:10 sẽ bao gồm các trình tự dài khoảng ít nhất là 20 nucleotit liên tiếp, ít nhất là khoảng 25 nucleotit liên tiếp, ít nhất là khoảng 30 nucleotit liên tiếp, ít nhất là

khoảng 35 nucleotit liên tiếp, ít nhất là khoảng 40 nucleotit liên tiếp, ít nhất là khoảng 45 nucleotit liên tiếp, ít nhất là khoảng 50 nucleotit liên tiếp, ít nhất là khoảng 60 nucleotit liên tiếp, ít nhất là khoảng 70 nucleotit liên tiếp, ít nhất là khoảng 80 nucleotit liên tiếp, ít nhất là khoảng 90 nucleotit liên tiếp, hoặc ít nhất là khoảng 100 nucleotit liên tiếp của trình tự đầy đủ của SEQ ID NO:10.

Trình tự ADN tương ứng với trình tự ADN hoàn chỉnh có sự gắn xen gen chuyển và các phần quan trọng của ADN bộ gen ngô ở bên cạnh một trong hai đầu của gắn xen gen chuyển được đề xuất là SEQ ID NO:10. Các trình tự ADN của ADN bộ gen ngô được liên kết vật lý bằng liên kết phosphodiester với và do đó nằm bên cạnh đầu 5' của gắn xen gen chuyển được đề xuất là SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, và SEQ ID NO:7. Trình tự ADN của ADN bộ gen ngô được liên kết vật lý bằng liên kết phosphodiester với và do đó nằm bên cạnh đầu 3' của gắn xen gen chuyển được đề xuất là SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, và SEQ ID NO:8.

Ngô chuyển gen chứa sự kiện MON 87419 có hai vùng được gọi là vùng nối. “Vùng nối” là vị trí mà một đầu của gắn xen gen chuyển được liên kết với ADN bộ gen. Vùng nối trái hoặc kéo dài qua một phần của gắn xen gen chuyển và ADN liền kề bên cạnh của bộ gen và do đó là điểm nối hai phần này thành một phân tử liên tục. Một vùng nối nằm ở đầu 5' của gắn xen gen chuyển và một vùng nằm ở đầu 3' của gắn xen gen chuyển, được gọi ở đây lần lượt là vùng nối 5' và 3'. “Trình tự nối” dùng để chỉ trình tự ADN có chiều dài bất kỳ kéo dài vùng nối 5' hoặc 3' của một sự kiện. Các trình tự nối của sự kiện ngô chuyển gen MON 87419 là rõ ràng với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này bằng cách sử dụng SEQ ID NO:10. Ví dụ về các trình tự nối của sự kiện ngô chuyển gen MON 87419 được đề xuất là SEQ ID NO:1-8. Fig. 1 minh họa sắp xếp vật lý của SEQ ID NO:1-10 được sắp xếp từ đầu 5' đến 3'. Do đó sáng chế đề xuất một phân tử ADN chứa ít nhất một trong số các trình tự ADN như được chỉ ra trong SEQ ID NO:1-8.

Trình tự nối của sự kiện ngô chuyển gen MON 87419 có thể tồn tại như là một phần của bộ gen của cây, hạt hoặc tế bào ngô chuyển gen chứa sự kiện MON 87419. Việc xác định bất kỳ một hoặc nhiều trong số SEQ ID NO:1-8 trong mẫu thu được từ cây ngô chuyển gen, bộ phận của cây, hạt hoặc tế bào ngô chuyển gen chỉ ra rằng ADN này thu được từ ngô chuyển gen chứa sự kiện MON 87419 và là dấu hiệu chỉ ra sự có mặt của sự kiện ngô chuyển gen MON 87419.

Sự kiện ngô chuyển gen MON 87419 chứa các trình tự đơn nhất đối với sự gắn xen gen chuyển, cụ thể là SEQ ID NO:14-22. Các trình tự này là đơn nhất đối với cấu trúc khảm đặc hiệu của nhiều trình tự khởi động, intron, peptit gắn đích lục lạp (chloroplast targeting peptides: CTP), tín hiệu kết thúc 3' khác nhau, các gen *pat* và *dmo* nằm ở vị trí gắn xen gen

chuyển của sự kiện này. Fig. 1 minh họa vị trí tương đối của mỗi trình tự trong số các trình tự gắn xen gen chuyển đơn nhất này đối với SEQ ID NO:9.

Được đề xuất là các phân tử ADN điển hình có thể được sử dụng làm đoạn môi hoặc đoạn dò để xác định sự có mặt trong mẫu của ADN thu được từ sự kiện ngô chuyển gen MON 87419. Các đoạn môi hoặc đoạn dò này là đặc hiệu đối với trình tự axit nucleic đích và do đó là hữu ích để xác định sự kiện ngô chuyển gen MON 87419 bằng các phương pháp được mô tả ở đây.

“Đoạn môi” là một phân tử ADN được thiết kế để sử dụng trong các phương pháp gắn môi hoặc lai mà bao gồm phản ứng khuếch đại. Phản ứng khuếch đại là phản ứng *in vitro* khuếch đại ADN khuôn để tạo ra phân tử siêu sao chép. Như được sử dụng ở đây, “phân tử siêu sao chép” là một phân tử ADN đã được tổng hợp bằng cách sử dụng các kỹ thuật khuếch đại. Các phân tử siêu sao chép theo sáng chế có trình tự ADN chứa một hoặc nhiều trong số SEQ ID NO:1-10, hoặc các đoạn của chúng. Một cặp đoạn môi có thể được sử dụng cùng với ADN khuôn, chẳng hạn như mẫu ADN bộ gen ngô, trong phản ứng khuếch đại, chẳng hạn như phản ứng chuỗi polymeraza (polymerase chain reaction: PCR), để tạo ra phân tử siêu sao chép, trong đó phân tử siêu sao chép được tạo ra sẽ có trình tự ADN tương ứng với trình tự của ADN khuôn nằm giữa hai vị trí mà các đoạn môi được lai với khuôn. Một đoạn môi thường được thiết kế để lai với chuỗi ADN đích bổ sung để tạo ra thể lai giữa đoạn môi và chuỗi ADN đích. Sự có mặt của đoạn môi là điểm nhận biết bởi polymeraza để bắt đầu kéo dài đoạn môi này bằng cách sử dụng chuỗi ADN đích làm khuôn. Các cặp đoạn môi dùng để chỉ việc sử dụng hai đoạn môi liên kết hai chuỗi đối diện của đoạn nucleotit chuỗi kép nhằm mục đích khuếch đại đoạn nucleotit nằm giữa chúng. Ví dụ về các trình tự đoạn môi được đề xuất là SEQ ID NO:11 và SEQ ID NO:12. Cặp đoạn môi được đề xuất là SEQ ID NO:11 và SEQ ID NO:12 là hữu ích để làm phân tử ADN thứ nhất và phân tử ADN thứ hai, trong đó phân tử ADN thứ nhất là một đoạn của SEQ ID NO:9 và phân tử ADN thứ hai là một đoạn của trình tự ADN ngô chuyển gen của SEQ ID NO:10, và mỗi phân tử này có chiều dài đủ để làm các đoạn môi ADN khi được sử dụng cùng nhau trong phản ứng khuếch đại với ADN chứa sự kiện MON 87419 để tạo ra phân tử siêu sao chép phát hiện sự kiện ngô chuyển gen MON 87419 trong mẫu. Trình tự ADN bộ gen ngô của sự kiện ngô chuyển gen MON 87419 được đề xuất là các vị trí 1-1246 và 8009-9259 của SEQ ID NO:10.

“Đoạn dò” là phân tử axit nucleic bổ sung cho một chuỗi của axit nucleic đích và là hữu ích trong các phương pháp phát hiện sự lai. Các đoạn dò theo sáng chế bao gồm không chỉ các axit deoxyribonucleic hoặc axit ribonucleic mà còn cả polyamit và các nguyên liệu dò khác mà liên kết đặc hiệu với ADN đích và việc phát hiện các liên kết này có thể là hữu ích trong việc phát hiện sự có mặt hoặc vắng mặt của trình tự ADN đích. Đoạn dò có thể được

gắn với nhãn có thể phát hiện được thông thường hoặc phân tử chỉ thị, chẳng hạn như đồng vị phóng xạ, phôi tử, chất phát quang bằng phản ứng hóa học, hoặc enzym. Trình tự ADN điển hình hữu ích như là một đoạn dò để phát hiện sự kiện ngô chuyển gen MON 87419 được đề xuất là SEQ ID NO:13.

Phương pháp thiết kế và sử dụng các đoạn mồi và đoạn dò đã được biết rõ trong lĩnh vực này và các phân tử ADN chứa các đoạn của SEQ ID NO:1-10 và hữu ích như là các đoạn mồi và đoạn dò để phát hiện sự kiện ngô chuyển gen MON 87419 có thể được thiết kế dễ dàng bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

Do đó các phân tử ADN và các trình tự ADN tương ứng được đề xuất ở đây là hữu ích để xác định sự kiện ngô chuyển gen MON 87419 ở cây ngô chuyển gen, tế bào, hạt hoặc các bộ phận của cây ngô chuyển gen; chọn lọc các thể lai hoặc các giống ngô chứa sự kiện ngô chuyển gen MON 87419; và phát hiện sự có mặt hoặc vắng mặt của sự kiện ngô chuyển gen MON 87419 trong mẫu.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “được phân lập” dùng để chỉ việc tách một phân tử ra khỏi các phân tử khác mà bình thường được kết hợp với nó ở trạng thái tự nhiên hoặc nguyên thể của nó. Do đó, thuật ngữ “được phân lập” có thể dùng để chỉ một phân tử ADN đã được tách ra khỏi (các) phân tử ADN khác mà bình thường được kết hợp với nó ở trạng thái tự nhiên hoặc nguyên thể của nó. Phân tử ADN này có thể tồn tại ở trạng thái được tái tổ hợp, như phân tử ADN tái tổ hợp. Do đó, các phân tử ADN đã dung hợp vào các trình tự điều hòa hoặc mã hóa mà bình thường các phân tử này không được kết hợp cùng, ví dụ do các kỹ thuật tái tổ hợp, được xem là đã được phân lập, ngay cả khi được tích hợp như một gen chuyển vào nhiễm sắc thể của tế bào hoặc có mặt cùng với các phân tử ADN khác.

Sáng chế đề xuất cây ngô, cây con, hạt, tế bào thực vật, và các bộ phận của cây chứa sự kiện ngô chuyển gen MON 87419, và các sản phẩm hàng hóa được sản xuất bằng cách sử dụng chúng. Mẫu điển hình của hạt ngô chuyển gen có khả năng dung nạp thuốc diệt cỏ chứa sự kiện MON 87419 đã được lưu trữ theo Hiệp ước Budapest cùng với Bộ sưu tập chủng nuôi cấy kiểu Mỹ (American type Culture Collection: ATCC®). Kho lưu trữ ATCC đã chỉ định ký hiệu lưu trữ sáng chế PTA-120860 cho hạt của cây ngô chuyển gen có khả năng dung nạp thuốc diệt cỏ chứa sự kiện MON 87419. Cây, cây con, hạt, tế bào thực vật, các bộ phận của cây và sản phẩm hàng hóa theo sáng chế chứa lượng có thể phát hiện được của ADN có ít nhất một trong số các trình tự được đề xuất là SEQ ID NO:1-10 và SEQ ID NO:14-22. Cây, cây con, hạt, tế bào thực vật và các bộ phận của cây theo sáng chế cũng có thể chứa một hoặc nhiều đặc điểm chuyển gen bổ sung, đặc biệt là các đặc điểm được đưa vào bằng cách lai cây ngô chứa sự kiện ngô chuyển gen MON 87419 với một cây khác chứa (các) đặc điểm chuyển gen bổ sung. Các đặc điểm này bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, khả năng kháng côn

trùng tăng, hiệu quả sử dụng nước tăng, năng suất tăng, khả năng chịu hạn tăng, chất lượng hạt tăng, chất lượng dinh dưỡng được cải thiện, sản sinh hạt lai, và/hoặc khả năng dung nạp thuốc diệt cỏ tăng trong đó đặc điểm này được so sánh với cây ngô thiếu đặc điểm chuyển gen này.

Các cây trồng theo sáng chế có thể được sử dụng để tạo ra cây con chứa sự kiện ngô chuyển gen MON 87419. Như được sử dụng ở đây, “cây con” bao gồm cây, hạt và tế bào thực vật bất kỳ chứa sự kiện ngô chuyển gen MON 87419 được thừa kế từ cây ông bà, khác biệt ở chỗ cây này chứa phân tử ADN có ít nhất một trình tự được chọn từ SEQ ID NO:1-10. Cây trồng, cây con và hạt có thể là đồng hợp tử hoặc dị hợp tử đối với sự kiện ngô chuyển gen MON 87419. Các cây con có thể được trồng từ hạt đã được sinh ra từ cây ngô chứa sự kiện MON 87419 hoặc từ các hạt được sinh ra bởi cây ngô được thụ tinh bằng hạt phấn chứa sự kiện ngô chuyển gen MON 87419.

Như được sử dụng ở đây, “bộ phận của cây” theo sáng chế là phần bất kỳ thu được từ cây ngô chuyển gen chứa sự kiện MON 87419. Các bộ phận của cây bao gồm, nhưng không giới hạn ở hạt phấn, noãn, vỏ, hoa, rễ, thân, xơ và lá. Các bộ phận của cây có thể vẫn sống hoặc không sống.

Sáng chế đề xuất sản phẩm hàng hóa được sản xuất ra từ ngô chuyển gen chứa sự kiện MON 87419. Sản phẩm hàng hóa theo sáng chế chứa lượng có thể phát hiện được của ADN chứa trình tự ADN được chọn từ nhóm chứa SEQ ID NO:1-10. Như được sử dụng ở đây, “sản phẩm hàng hóa” dùng để chỉ chế phẩm hoặc sản phẩm chứa nguyên liệu thu được từ cây ngô chuyển gen, hạt ngô, tế bào cây ngô, hoặc bộ phận cây ngô chứa sự kiện MON 87419. Sản phẩm hàng hóa bao gồm nhưng không bị giới hạn ở hạt, ngũ cốc, các bộ phận của cây, và bột xay thô đã xử lý. Ngô chuyển gen chứa sự kiện MON 87419 có thể được sử dụng để sản xuất sản phẩm hàng hóa bất kỳ thường thu được từ ngô. Sản phẩm hàng hóa theo sáng chế sẽ chứa ADN tương ứng với sự kiện ngô chuyển gen MON 87419 với lượng có thể phát hiện được. Phương pháp phát hiện một hoặc nhiều ADN trong mẫu này có thể được sử dụng để xác định hàm lượng hoặc nguồn của sản phẩm hàng hóa này. Phương pháp phát hiện chuẩn bất kỳ để phát hiện các phân tử ADN có thể được sử dụng, bao gồm các phương pháp phát hiện được mô tả ở đây.

Sáng chế đề xuất các phương pháp phòng trừ cỏ dại bằng cách sử dụng glufosinat hoặc dicamba, hoặc thuốc diệt cỏ dicamba và glufosinat với ngô chuyển gen chứa sự kiện MON 87419. Phương pháp phòng trừ cỏ dại trên một vùng, chẳng hạn như trên cánh đồng, được đề xuất bao gồm trồng cây ngô chuyển gen chứa sự kiện MON 87419 trên một vùng và sử dụng glufosinat hoặc dicamba, hoặc thuốc diệt cỏ dicamba và glufosinat với lượng hữu hiệu để diệt cỏ cho vùng này với mục đích phòng trừ cỏ dại trong vùng này mà không làm hại đến cây ngô

chuyển gen chứa sự kiện MON 87419 này. Việc sử dụng glufosinat hoặc dicamba, hoặc thuốc diệt cỏ dicamba và glufosinat này có thể là trước khi nảy mầm (vào thời điểm bất kỳ sau khi hạt ngô chuyển gen chứa sự kiện MON 87419 được trồng và trước khi các cây ngô chuyển gen chứa sự kiện MON 87419 nảy mầm) hoặc sau khi nảy mầm (thời điểm bất kỳ sau khi cây ngô chuyển gen chứa sự kiện MON 87419 nảy mầm). Liều hữu hiệu để phòng trừ cỏ dại của glufosinat để sử dụng trên một vùng để phòng trừ cỏ dại nên bao gồm khoảng từ 0,1 pound (0,045kg) đương lượng axit trên mỗi mẫu Anh (0,405 hecta) (ae/ac) đến nhiều nhất là khoảng 16 pound (7,2kg) ae/ac glufosinat đến hết mùa sinh trưởng. Liều hữu hiệu để phòng trừ cỏ dại của dicamba để sử dụng trên một vùng để phòng trừ cỏ dại nên bao gồm khoảng từ 0,1 pound (0,045kg) ae/ac đến nhiều nhất là khoảng 16 pound (7,2kg) ae/ac dicamba đến hết mùa sinh trưởng. Nhiều cách sử dụng glufosinat hoặc dicamba, hoặc thuốc diệt cỏ dicamba và glufosinat có thể được áp dụng đến hết mùa sinh trưởng, ví dụ, hai cách sử dụng (như sử dụng trước khi trồng và sử dụng sau khi nảy mầm hoặc sử dụng trước khi nảy mầm và sử dụng sau khi nảy mầm) hoặc ba cách sử dụng (như sử dụng trước khi trồng, sử dụng trước khi nảy mầm và sử dụng sau khi nảy mầm).

Như được sử dụng ở đây, “thành phần hoạt chất” hoặc “ai” (viết tắt của active ingredient) là thành phần của chế phẩm phòng trừ cỏ dại chịu trách nhiệm về hoạt tính phòng trừ cỏ dại, thường được đo bằng số pound trên một galông hoặc được sử dụng ở dạng số pound trên mỗi mẫu Anh (0,405 hecta). Đối với các thuốc diệt cỏ là axit (ví dụ, các phân tử có nhóm carboxyl là thành phần cấu trúc của chúng), nhóm axit thường được chuyển hóa thành (có thể dùng cụ thay thế bằng các ion mong muốn để tạo thành) muối hoặc (được cho phản ứng với rượu để tạo thành) este trong quá trình bào chế. Điều này có thể làm thay đổi không chỉ các tính chất hóa học của một phân tử diệt cỏ cụ thể, mà còn cả khối lượng. Tuy nhiên, axit tương ứng là phần có tác dụng phòng trừ cỏ dại của chế phẩm này và sự tương đương về tác dụng phòng trừ cỏ dại giữa các thành phần hoạt chất khác nhau có thể được tính toán bằng cách sử dụng đương lượng axit dưới dạng đơn vị đo chuẩn. Thuật ngữ “đương lượng axit” hoặc “ae” có nghĩa là phần thành phần hoạt chất trong chế phẩm mà về mặt lý thuyết có thể được chuyển hóa lại thành axit tương ứng. Tỷ lệ sử dụng thuốc diệt cỏ có thể được thể hiện là “đương lượng axit trên mỗi mẫu Anh (0,405 hecta)” (viết tắt là “ae/ac”) hoặc là “thành phần hoạt chất trên mỗi mẫu Anh (0,405 hecta)” (viết tắt là “ai/ac”).

Phương pháp sản xuất cây ngô chuyển gen có khả năng dung nạp thuốc diệt cỏ chứa sự kiện MON 87419 được đề xuất. Cây con được tạo ra bằng các phương pháp này có thể là giống tốt hoặc cây lai; có thể được trồng từ hạt được sinh ra bởi cây ngô chuyển gen chứa sự kiện MON 87419 hoặc từ hạt được sinh ra bởi cây ngô được thụ tinh bằng hạt phấn của cây ngô chuyển gen chứa sự kiện MON 87419; và có thể là đồng hợp tử hoặc dị hợp tử đối với sự

kiện ngô chuyển gen MON 87419. Các cây có thể tự thụ phấn (còn được biết là “tự thụ phấn (selfing)” hoặc được thụ phấn chéo (còn được biết là “lai”). Cây ngô chuyển gen chứa sự kiện MON 87419 có thể được tự thụ phấn để tạo ra dòng thuần của các cây là đồng hợp tử đối với sự kiện ngô chuyển gen MON 87419. Các kết quả tự thụ phấn ở cây con đã được biết là “lai cùng dòng” và được sử dụng để tạo ra các dòng cận giao mà đồng đều về mặt di truyền. Mặt khác, cây ngô chuyển gen chứa sự kiện MON 87419 có thể được lai xa (lai với một cây khác chuyển gen hoặc không chuyển gen) để tạo ra hạt giống hoặc hạt lai. Hạt và cây con được tạo ra bằng phương pháp theo sáng chế sẽ chứa sự kiện ngô chuyển gen MON 87419 và sau đó có thể được xử lý bằng glufosinat hoặc dicamba, hoặc thuốc diệt cỏ dicamba và glufosinat. Việc xử lý bằng glufosinat hoặc dicamba, hoặc thuốc diệt cỏ dicamba và glufosinat có thể được sử dụng để lựa chọn cây con có khả năng dung nạp. Ngoài ra, các cây con này có thể được phân tích bằng cách sử dụng các phương pháp xác định cây hoặc hạt chứa sự kiện ngô chuyển gen MON 87419.

Cây, cây con, hạt, tế bào thực vật và các bộ phận của cây theo sáng chế cũng có thể chứa một hoặc nhiều đặc điểm chuyển gen ngô bổ sung, cụ thể là các đặc điểm được đưa vào bằng cách lai cây ngô chứa sự kiện ngô chuyển gen MON 87419 với một cây ngô khác chứa (các) đặc điểm chuyển gen bổ sung. Các đặc điểm chuyển gen ngô này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, khả năng kháng côn trùng gia tăng, hiệu quả sử dụng nước tăng, năng suất tăng, khả năng chịu hạn tăng, chất lượng hạt tăng, chất lượng dinh dưỡng được cải thiện, sản sinh ra hạt lai, và có khả năng dung nạp thuốc diệt cỏ, trong đó đặc điểm này được so sánh với cây ngô không có đặc điểm chuyển gen này. Các đặc điểm chuyển gen ngô này đã được biết bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này; ví dụ, danh mục các đặc điểm này được cung cấp trong Dịch vụ kiểm tra sức khỏe động vật và cây trồng (Animal and Plant Health Inspection Service: APHIS) của Bộ nông nghiệp Mỹ (United States Department of Agriculture: USDA) và có thể được tìm thấy trên trang web của họ tại <http://www.aphis.usda.gov>. Do đó hai cây chuyển gen có thể được lai để tạo ra dòng con chứa hai hoặc nhiều đặc điểm chuyển gen được phân ly độc lập. Việc lai ngược về cây bố mẹ và lai xa với cây không chuyển gen cũng được dự kiến, cũng như là nhân giống vô tính. Việc mô tả các phương pháp lai thường được sử dụng cho các đặc điểm và cây trồng khác nhau có thể được tìm thấy trong một trong số các tài liệu tham khảo, ví dụ, Fehr, trong *Breeding Methods for Cultivar Development*, Wilcox J. ed., American Society of Agronomy, Madison WI (1987).

Cây, hạt, tế bào, bộ phận của cây và sản phẩm hàng hóa theo sáng chế có thể được sử dụng để phát hiện các phân tử ADN và protein chỉ ra sự có mặt của sự kiện ngô chuyển gen MON 87419. Việc phát hiện này sẽ được thực hiện bằng cách sử dụng các trình tự ADN được

đề xuất ở đây và các trình tự protein DMO và PAT tương ứng được mã hóa bằng đột biến gắn xen gen chuyển mà được đề xuất là SEQ ID NO:9. Việc phát hiện sự có mặt của sự kiện ngô chuyển gen MON 87419 có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này, như kỹ thuật khuếch đại nhiệt axit nucleic, kỹ thuật lai axit nucleic (như phân tích thẩm tách Northern và phân tích Southern), các kỹ thuật phát hiện protein (như thẩm tách Western, kết tủa miễn dịch và các kỹ thuật dựa trên thử nghiệm hấp phụ miễn dịch liên kết enzym (enzyme-linked immunosorbent assay-based: ELISA) hoặc bằng cách sử dụng các phương pháp phát hiện và/hoặc kit phát hiện được đề xuất ở đây. Một phương pháp cho mẫu ADN tiếp xúc với cặp đoạn mồi có khả năng sản sinh ra phân tử siêu sao chép từ ADN của cây ngô chuyển gen chứa sự kiện MON 87419, thực hiện phản ứng khuếch đại và nhờ đó tạo ra phân tử siêu sao chép chứa ít nhất một trong số các trình tự ADN được đề xuất là SEQ ID NO:1-10 và SEQ ID NO:14-22, và sau đó phát hiện sự có mặt hoặc vắng mặt của phân tử siêu sao chép này và tùy ý xác nhận trong trình tự của phân tử siêu sao chép này một trình tự chứa ít nhất một trong số các trình tự được đề xuất là SEQ ID NO:1-10 và SEQ ID NO:14-22. Sự có mặt của phân tử siêu sao chép này là dấu hiệu xác định sự có mặt của ADN đặc hiệu cho cây ngô chuyển gen chứa sự kiện MON 87419 và do đó nguyên liệu sinh học trong mẫu thu được từ cây ngô chuyển gen chứa sự kiện MON 87419. Một phương pháp khác là cho mẫu ADN tiếp xúc với đoạn dò ADN, đưa đoạn dò và mẫu ADN này vào các điều kiện lai nghiêm ngặt, và sau đó phát hiện sự lai giữa đoạn dò và mẫu ADN đích. Việc phát hiện sự lai này là dấu hiệu xác định sự có mặt của ADN đặc hiệu cho cây ngô chuyển gen chứa sự kiện MON 87419 trong mẫu ADN.

Kit phát hiện ADN đối với sự kiện ngô chuyển gen MON 87419 được đề xuất. Nhiều biến thể của kit này cũng có thể được phát triển bằng cách sử dụng các chế phẩm và các phương pháp được mô tả ở đây và các phương pháp đã được biết rõ trong lĩnh vực phát hiện ADN. Các kit phát hiện ADN có thể được sử dụng cho các phương pháp lai với cây ngô chuyển gen chứa sự kiện MON 87419. Các kit này chứa các đoạn mồi ADN hoặc đoạn dò ADN chứa các đoạn của SEQ ID NO:1-10. Một ví dụ về kit này bao gồm ít nhất một phân tử ADN có chiều dài đủ để bao gồm các nucleotit kế tiếp của SEQ ID NO:10 có chức năng làm đoạn dò ADN hữu ích để phát hiện sự có mặt và/hoặc vắng mặt trong mẫu của ADN thu được từ cây ngô chuyển gen có khả năng dung nạp thuốc diệt cỏ chứa sự kiện MON 87419. Một phân tử ADN đủ để sử dụng làm đoạn dò ADN được đề xuất là hữu ích để xác định, phát hiện hoặc tìm ra sự có mặt và/hoặc vắng mặt trong mẫu của ADN ngô chuyển gen có khả năng dung nạp thuốc diệt cỏ chứa sự kiện MON 87419 được đề xuất là SEQ ID NO:13. Các đoạn dò khác có thể dễ dàng được thiết kế bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này và nên bao gồm ít nhất là khoảng 15 nucleotit của SEQ ID NO:10 và đủ đơn nhất đối với ADN ngô chuyển

gen có khả năng dung nạp thuốc diệt cỏ chứa sự kiện MON 87419 để xác định ADN thu được từ sự kiện ngô chuyển gen MON 87419. Một loại kit khác bao gồm cặp đoạn môi hữu ích để sản sinh ra phân tử siêu sao chép hữu ích để phát hiện sự có mặt hoặc vắng mặt trong mẫu của sự kiện ngô chuyển gen MON 87419. Kit này sẽ sử dụng phương pháp bao gồm cho mẫu ADN đích tiếp xúc với cặp đoạn môi, sau đó thực hiện phản ứng khuếch đại axit nucleic đủ để tạo ra phân tử siêu sao chép chứa một phân tử ADN có ít nhất một trình tự được chọn từ SEQ ID NO:1-10, và sau đó phát hiện sự có mặt hoặc vắng mặt của phân tử siêu sao chép này. Phương pháp này cũng có thể bao gồm giải trình tự phân tử siêu sao chép hoặc một đoạn của nó. Các cặp đoạn môi khác có thể được thiết kế dễ dàng bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này và nên bao gồm ít nhất 20 nucleotit của SEQ ID NO:10 và là đủ đơn nhất đối với ADN ngô chuyển gen có khả năng dung nạp thuốc diệt cỏ chứa sự kiện MON 87419 để phát hiện sự kiện ngô chuyển gen MON 87419. Kit theo sáng chế có thể tùy ý chứa các chất thử để thực hiện các phản ứng phát hiện và xác định được mô tả ở đây hoặc trong hướng dẫn sử dụng kit này và nội dung của nó.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “chứa” nghĩa là “bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở”.

Thông tin lưu trữ

Việc lưu trữ mẫu điển hình của hạt ngô chuyển gen chứa sự kiện ngô chuyển gen MON 87419 được thực hiện theo Hiệp ước Budapest với Bộ sưu tập chủng nuôi cấy kiểu Mỹ (American Type Culture Collection: ATCC) có địa chỉ ở 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia USA, Zip Code 20110. Ký hiệu lưu trữ sáng chế ATCC (số truy cập) đối với hạt chứa sự kiện ngô chuyển gen MON 87419 là PTA-120860 và ngày lưu trữ là 17 tháng 1, 2014. Việc lưu trữ sẽ được duy trì trong kho lưu trữ trong khoảng thời gian 30 năm, hoặc 5 năm sau yêu cầu cuối cùng hoặc trong thời gian bảo hộ sáng chế, tùy theo khoảng thời gian nào dài hơn.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ sau đây được bao gồm để mô tả đầy đủ hơn về sáng chế. Nên được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này là nhiều biến đổi có thể được tạo ra trong các ví dụ cụ thể được mô tả mà vẫn đạt được kết quả tương tự. Một số hợp chất có liên quan cả về mặt vật lý và hóa học có thể được thay thế cho các hợp chất được mô tả ở đây trong khi vẫn đạt được cùng một kết quả hoặc kết quả tương tự. Tất cả các thay thế và biến đổi mà là rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đều thuộc phạm vi của sáng chế.

Ví dụ 1: Sản xuất và chọn lọc sự kiện MON 87419

Ví dụ này mô tả việc sản xuất, phân tích và chọn lọc ngô chuyển gen chứa sự kiện MON 87419, một sự kiện có thể tạo ra khả năng dung nạp cả thuốc diệt cỏ dicamba và glufosinat. Được tổng kết là quy trình sản xuất và phân tích hàng chục nghìn cá thể cây trồng trong nhiều năm bằng cách thử nghiệm phân tử khác nghiệt, kiểm tra kiểu hình và thử nghiệm trên đồng cần thiết để lựa chọn lần cuối cùng sự kiện ngô chuyển gen MON 87419.

Các vector biến nạp chứa nhiều cassette biểu hiện khác nhau được thiết kế và thử nghiệm để xác nhận tính hữu ích trong việc biểu hiện các gen *dmo* và *pat* của chúng. Bằng cách sử dụng số liệu này, các tổ hợp yếu tố biểu hiện được lựa chọn và 8 vector biến nạp khác nhau được tạo ra và được biến nạp vào ngô. Các vector này kiểm tra trình tự khởi động và trình tự kết thúc trong nhiều tổ hợp khác nhau với hai vùng mã hóa gen *pat* và gen *dmo* (Bảng 1). Các cây tạo thành được phân tích về sự biểu hiện protein và hai vector (được thể hiện là A và B trong bảng 1) được lựa chọn để biến nạp ngô thương mại.

Bảng 1. Cấu hình cassette chứa vector biến nạp

Vector	cassette 1 (PAT)			cassette 2 (DMO)		
	Trình tự khởi động	Gen cần quan tâm	Trình tự kết thúc	Trình tự khởi động	Gen cần quan tâm	Trình tự kết thúc
A	AND.ge.Ubq1	PAT	Os.Ara5	PCSV/I-Act1	CTP4/DMO	Hsp17.5
B	P-1	PAT	T-1	PCSV/I-Act1	CTP4/DMO	Hsp17.5
C	AND.ge.Ubq1	PAT	Os.Ara5	P-1	CTP4/DMO	Hsp17.5
D	P-1	PAT	T-1	AND.ge.Ubq1	CTP4/DMO	Hsp17.5
E	AND.ge.Ubq1	PAT	Os.Ara5	P-2	CTP4/DMO	Hsp17.5
F	AND.ge.Ubq1	PAT	Os.Ara5	P-3	CTP4/DMO	Hsp17.5
G	P-1	PAT	T-1	P-2	CTP4/DMO	Hsp17.5
H	P-1	PAT	T-1	P-3	CTP4/DMO	Hsp17.5

Hơn 13000 cây ngô đã biến nạp đơn nhất được tạo ra bằng cách sử dụng hai vector (A và B) được chọn lọc. Ở thực vật, thường có sự biến đổi nhiều giữa các sự kiện đơn lẻ về mức độ biểu hiện gen được đưa vào, và sự biểu hiện gen có thể tương quan trực tiếp dương tính hoặc âm tính với kiểu hình của thực vật chứa sự kiện này. Sự biểu hiện các gen ngoại lai ở thực vật đã được biết là bị ảnh hưởng, ngoài các yếu tố khác, bởi vị trí nhiễm sắc thể của chúng. Với lý do đó, cần phải sàng lọc số lượng lớn các cây đơn lẻ chứa các sự kiện gắn xen ngẫu nhiên qua nhiều năm và các vị trí để xác định sự kiện tối ưu này. Sự kiện ngô chuyển gen MON 87419 được tạo ra bằng cách biến nạp qua trung gian *Agrobacterium* các phôi ngô trưởng thành LH244. Các phương pháp biến nạp ngô đã được biết trong lĩnh vực này. Các tế

bào ngô được biến nạp và tái sinh vào các cây ngô nguyên vẹn. Các cây đã bén rễ có các đặc điểm kiểu hình bình thường được lựa chọn. Hàng nghìn sự kiện đơn lẻ, độc lập sau đó được chuyển vào đất để trồng và đánh giá thêm.

Bảng 2. Quy trình chọn lọc sự kiện

	Mốc	Sự kiện Vector A được đưa ra	Sự kiện Vector B được đưa ra	Tổng số các sự kiện đơn nhất được đưa ra
Đánh giá R0	Sự kiện chuyển gen được tạo ra	5236	8413	13649
	Phân tích bản sao đơn lẻ qua lần thứ nhất	1300	1698	2998
	Xịt R0	642	798	1440
	Phân tích phân tử chi tiết ban đầu	85	99	184
	Phân tích Southern R0	54	58	112
Sàng lọc sớm (R1 & R2)	Các thử nghiệm R1 & phân tích phân tử	22	22	44
	Thử nghiệm R2 & phân tích phân tử	20	22	42
Các thử nghiệm trên cánh đồng được tiếp tục & phân tích phân tử	Năm SA 1	7	10	17
	Năm US 1	5	6	11
	Năm SA 2	2	3	5
	Đánh giá theo chiều sâu	2	0	2
	Lựa chọn sự kiện cuối cùng	1	0	1

Trong quá trình lựa chọn sự kiện này, phân tích phân tử cũng như các thử nghiệm trên cánh đồng để đánh giá kiểu hình, các đặc điểm nông học và hiệu lực của các sự kiện được thực hiện, thường là đồng thời (Bảng 2). 13000 cây ngô R0 đã biến nạp đơn lẻ, duy nhất được phân tích lần thứ nhất bằng PCR để lựa chọn các sự kiện có bản sao đơn lẻ chứa đột biến gắn xen gen chuyển (bản sao đơn lẻ qua lần thứ nhất). Bước này lựa chọn được 2.998 sự kiện. Bước lựa chọn tiếp theo là về khả năng dung nạp với việc xịt thuốc diệt cỏ R0 được thực hiện trong nhà kính. Các cây được thử nghiệm về khả năng dung nạp với cả glufosinat (thuốc diệt cỏ Ignite® 280) và dicamba (thuốc diệt cỏ Clarity®) bằng cách sử dụng thùng hỗn hợp của glufosinat (0,9 lb ai/ac) và dicamba (2,0 lb ae/ac) được xịt ở giai đoạn sinh trưởng V1/V2. Các cây thể hiện tổn thương >15% được loại bỏ, và 1.440 sự kiện được lựa chọn để phân tích thêm.

Phân tích phân tử chi tiết hơn ban đầu được thực hiện và bao gồm bước xác định và xác nhận trình tự, và kiểm tra lần thứ hai số lượng bản sao và sự vắng mặt của khung chính. Phân tích này đưa ra 184 sự kiện chỉ chứa một bản sao duy nhất có sự gắn xen gen chuyển được lựa chọn để tiếp tục. Phân tích Southern trên ADN được chiết từ các sự kiện R0 được thực hiện để xác nhận thêm số lượng bản sao gắn xen gen chuyển và để xác nhận sự vắng mặt của khung biến nạp. Trên cơ sở bước này, 112 sự kiện được lựa chọn để tiếp tục với R1 để phân tích thêm. Các cây R0 được tự thụ phấn và hạt được thu hoạch cho thử nghiệm R1.

Đồng thời với toàn bộ các thử nghiệm trên cánh đồng, phân tích phân tử bổ sung được tiếp tục. Phân tích Northern được thực hiện để phát hiện và đo các bản sao ARN thông tin của các gen *pat* và *dmo*. Việc giải trình tự protein đầu N của các protein PAT và DMO được tinh chế từ các cây chuyển gen chứa sự kiện đã chọn lọc được thực hiện để xác nhận trình tự protein tái tổ hợp. Phân tích Western để phát hiện các protein PAT và DMO được thực hiện với các mẫu cây chuyển gen. Việc giải trình tự toàn bộ gen chuyển và cả hai đầu 5' và 3' của đột biến gắn xen được thực hiện và được sử dụng tiếp để phát triển các phương pháp phát hiện các sự kiện đơn lẻ. Phân tích Southern chuyên sâu được thực hiện trên các cây R1 để xác nhận số lượng bản sao và sự vắng mặt của khung.

Đối với bước sàng lọc sớm thử nghiệm trên đồng R1, trong số 112 sự kiện được chọn từ bước sàng lọc R0 82 sự kiện được lựa chọn dựa vào các đánh giá về hạt thu hoạch được và kích thước vườn ươm. Các cây R1 được phân ly, và do đó là đồng hợp tử, dị hợp tử hoặc vô dụng, đối với một sự kiện. 82 sự kiện ở cây R1 được đánh giá trong bước sàng lọc hiệu lực trên đồng với tỉ lệ sử dụng thuốc diệt cỏ cao. Tổn thương cây được đánh giá sau khi xử lý bằng nhiều hỗn hợp khác nhau của glufosinat (Ignite 280) và dicamba (Clarity) (tỉ lệ sử dụng trên cánh đồng được gắn nhãn tối đa đến 20X glufosinat và tối đa đến 16X dicamba) và với thời điểm sử dụng là ở nhiều giai đoạn sinh trưởng khác nhau từ V1/V2 đến V8/V10. Các mức độ tổn thương được đánh giá từ 10 đến 14 ngày sau khi sử dụng thuốc diệt cỏ. Mức độ tổn thương chuẩn bao gồm tính điểm tỉ lệ phần trăm úa vàng, dị tật và sinh sản. Các trị số trung bình chung cho nhiều cây chứa cùng một sự kiện được sử dụng để lựa chọn các sự kiện để tiếp tục. Việc sử dụng thuốc diệt cỏ ở tỉ lệ 2X thường gây ra tổn thương dưới 10%, và việc sử dụng thuốc diệt cỏ ở tỉ lệ 16X và 20X gây ra mức độ tổn thương cao hơn 10%. Ngoài việc thử nghiệm về hiệu lực, điểm nông học được ghi lại cho mỗi cây và được liên hệ với sự kiện mà nó chứa. Tiêu chuẩn tính điểm nông học được đánh giá bao gồm chiều cao của cây, chiều cao của tai, tỉ lệ phần trăm độ ẩm, khối lượng thử nghiệm, số ngày thụ phấn được 50% và số ngày mọc râu ngô 50%. Dựa trên phân tích số liệu thu được từ các thử nghiệm trên cánh đồng R1 và phân tích phân tử, 44 sự kiện được lựa chọn để tiếp tục với R2 để phân tích thêm. Các cây R1 được tự thụ phấn và hạt được thu hoạch cho thử nghiệm R2.

Trong bước sàng lọc sớm của thử nghiệm trên cánh đồng R2, các sự kiện R2 và F1 (từ bước lai xa R1) được đánh giá trong bước sàng lọc hiệu lực trên cánh đồng ở 3 vị trí (hai bang và Puerto Rico). Tổn thương cây được đánh giá sau khi xử lý bằng cách sử dụng nhiều tỉ lệ hỗn hợp khác nhau của glufosinat và dicamba và trong các khoảng thời gian khác nhau. Các cây R2 là đồng hợp tử đối với sự kiện này và tỉ lệ mất khả năng dung nạp thuốc diệt cỏ sau khi sử dụng thuốc diệt cỏ là thấp, xác nhận kết quả R1. Số liệu nông học được thu thập và tính điểm như trong thử nghiệm trên cánh đồng R1. Phân tích phân tử bổ sung, bao gồm phân tích sự biểu hiện gen, cũng được sử dụng để lựa chọn cây chứa các sự kiện tốt nhất. Dựa trên phân tích số liệu thu được từ các thử nghiệm trên cánh đồng R2 và F1 và phân tích phân tử, 42 sự kiện được lựa chọn để tiếp tục đến R3 để phân tích thêm. Các cây R2 được tự thụ phấn và hạt được thu hoạch cho thử nghiệm R3.

Đối với thử nghiệm trên cánh đồng tiếp theo, các thử nghiệm về hiệu lực lai và lai gần và các thử nghiệm nông học lai và lai gần trên cánh đồng đều được thực hiện. Các thử nghiệm nông học trên cánh đồng được thực hiện trong cùng một mùa với các thử nghiệm về hiệu lực trên cánh đồng. Tất cả các thử nghiệm trên cánh đồng đều sử dụng kiểu khối đầy đủ ngẫu nhiên và được thực hiện ở nhiều vị trí. Đối với cả thử nghiệm về hiệu lực và thử nghiệm nông học trên cánh đồng, điểm nông học được thu thập trong cả mùa thử nghiệm trên đồng, và vào cuối mùa này kết quả được xác định (kết quả về hiệu lực hoặc kết quả về nông học). Các thử nghiệm về hiệu lực trên cánh đồng được thực hiện để đánh giá tổn thương cây ở thời điểm 10 đến 14 ngày sau khi sử dụng thuốc diệt cỏ, mức độ tổn thương cây, và năng suất. Mức độ tổn thương cây đích là điểm số nhỏ hơn 10% là tốt hơn đối với sự kiện này. Đối với các thử nghiệm nông học trên cánh đồng, các mảnh đất được duy trì không có cỏ dại và không sử dụng thuốc diệt cỏ glufosinat hoặc thuốc diệt cỏ dicamba trong suốt mùa sinh trưởng. Các thử nghiệm nông học lai trên cánh đồng bao gồm các đối chứng là thể lai so sánh (đối chứng lai) được tạo ra bằng cách sử dụng cùng các cây ngô bố mẹ đã được sử dụng để tạo ra giống lai chuyển gen, nhưng không chứa sự kiện chuyển gen. Các đối chứng lai gần là lai gần so sánh được với các dòng lai gần chuyển gen.

Phân tích tổng hợp được thực hiện bằng cách sử dụng tập hợp số liệu thử nghiệm trên cánh đồng trong nhiều mùa, ở nhiều vị trí. Bảng 3 minh họa số lượng bản sao mà với chúng các quan sát được lặp lại cho kiểu thử nghiệm trên cánh đồng cụ thể cho các cây chứa một trong số các sự kiện này. Đối với mỗi một trong hai sự kiện này, có 135 điểm số liệu được ghi lại đối với hiệu quả nông học lai, 933 điểm số liệu đối với hiệu lực lai, 179 điểm số liệu đối với đặc điểm nông học lai gần, 30 điểm số liệu đối với hiệu lực lai gần, và 16 điểm số liệu đối với sự kiện dựa vào thử nghiệm áp lực về tỉ lệ sử dụng thuốc diệt cỏ cho ngô chứa sự kiện này.

Bảng 3. Các bản sao thử nghiệm trên cánh đồng đối với hai sự kiện cuối cùng.

Mô tả	Số bản sao cho mỗi sự kiện
Các đặc điểm nông học lai	135 bản sao
Hiệu lực lai	933 bản sao
Đặc điểm nông học lai gần	179 bản sao
Hiệu lực lai gần	30 bản sao
Thử nghiệm áp lực dựa trên sự kiện	16 bản sao
Tổng số bản sao cho mỗi sự kiện	1293

Mỗi cây lai chứa một trong 23 sự kiện được chọn (tập hợp con của 42 sự kiện từ thử nghiệm trên cánh đồng R2) được đánh giá trong thử nghiệm trên cánh đồng về hiệu lực trái mùa năm thứ nhất ở Nam Mỹ (South America: SA) và các thử nghiệm nông học trên cánh đồng. Các thử nghiệm được thực hiện ở 6 vị trí theo kiểu khối hoàn chỉnh ngẫu nhiên với 4 xử lý và 2 bản sao cho mỗi xử lý. Trong các thử nghiệm về hiệu lực trên cánh đồng, chế phẩm dicamba là thuốc diệt cỏ Banvel® 4SL và chế phẩm glufosinat là Liberty® 1.67SL. Các xử lý bằng thuốc diệt cỏ bao gồm: (1) đối chứng không được xử lý; (2) dicamba ở 2 tỉ lệ lbs ae/acre (ac) PRE (trong đó PRE được xác định ở thời điểm trồng hoặc trước khi cây nảy mầm) sau đó dicamba ở tỉ lệ 1lb ae/ac được sử dụng ở mỗi VE-V2 sau đó là V4 sau đó là V8; (3) glufosinat được sử dụng với tỉ lệ 0,8 lb ai/ac ở VE-V2 sau đó là V4 sau đó là V8; và (4) glufosinat được sử dụng ở tỉ lệ 0,8 lb ai/ac cộng với dicamba được sử dụng với tỉ lệ 1 lb ae/ac at VE-V2 sau đó là V4 sau đó là V8. Tỉ lệ tổn thương được tính ở thời điểm 10 đến 14 ngày sau khi sử dụng thuốc diệt cỏ. Các trị số trung bình chung cho nhiều cây chứa cùng một sự kiện được sử dụng để lựa chọn các sự kiện để tiếp tục. Mức độ tổn thương cây đích là điểm số nhỏ hơn 10%, và mức độ tổn thương quan sát được là dưới 1%. Dựa trên việc tính điểm tổn thương thể lai, tính điểm nông học, kết quả về hiệu lực, kết quả về nông học, và phân tích phân tử bổ sung, 17 sự kiện được lựa chọn để tiếp tục.

Các cây lai gần và cây lai từ 17 sự kiện tiếp tục từ các thử nghiệm trên cánh đồng trái mùa năm thứ 1 ở SA sau đó được đánh giá thêm trong các thử nghiệm trên cánh đồng về hiệu lực và thử nghiệm nông học trên cánh đồng năm thứ nhất ở Mỹ (US). Các thử nghiệm này được thực hiện vào năm 2012, là mùa hạn hán nghiêm trọng ở Mỹ. Các thử nghiệm trên cánh đồng về hiệu lực lai được thực hiện ở 12 vị trí, 2 bang theo kiểu khối hoàn chỉnh ngẫu nhiên với 6 xử lý và 3 bản sao trong mỗi xử lý. Các cây lai chứa sự kiện chuyển gen này thu được khả năng dung nạp glyphosat từ cây bố trong phép lai. Trong các thử nghiệm trên cánh đồng về hiệu lực này, chế phẩm glyphosat là Roundup PowerMAX® 4.5SL, chế phẩm dicamba là Clarity 4SL, và chế phẩm glufosinat là Ignite 280 2.34SL. Việc xử lý bằng thuốc diệt cỏ bao

gồm: (1) đối chứng không được xử lý; (2) glyphosat với tỉ lệ 3 lbs ae/ac được sử dụng ở V4 sau đó là V8; (3) glufosinat với tỉ lệ 0,8 lb ai/ac được sử dụng ở V2 sau đó là V4 sau đó là V8; (4) dicamba với tỉ lệ 2 lbs ae/ac được sử dụng PRE và sau đó lại được sử dụng ở V4 sau đó là V8; (5) glyphosat với tỉ lệ 3lbs ae/ac cộng với dicamba với tỉ lệ 1,5 lbs ae/ac được sử dụng ở V2 sau đó là V4 sau đó là V8; (6) dicamba với tỉ lệ 2 lbs ae/ac được sử dụng ở V2 sau đó là glufosinat với tỉ lệ 0,8 lbs ai/ac cộng với dicamba với tỉ lệ 1 lb ae/ac được sử dụng ở giai đoạn sinh trưởng V4 sau đó là glyphosat với tỉ lệ 3 lbs ae/ac cộng với dicamba với tỉ lệ 1,5 lbs ae/ac được sử dụng ở giai đoạn sinh trưởng V8. Việc xác định tỉ lệ tổn thương được thực hiện ở thời điểm 10 đến 14 ngày sau khi sử dụng thuốc diệt cỏ. Các trị số trung bình chung cho nhiều cây chứa cùng một sự kiện được sử dụng để lựa chọn các sự kiện để tiếp tục. Mức độ tổn thương cây đích là điểm số nhỏ hơn 10%, và mức độ tổn thương quan sát được là dưới 1%. Dựa vào việc tính điểm tổn thương thể lai, tính điểm nông học, kết quả về hiệu lực, năng suất nông học, và phân tích phân tử bổ sung, 11 sự kiện được lựa chọn để tiếp tục.

Thử nghiệm trên cánh đồng trái mùa năm thứ 2 ở Nam Mỹ (SA) để đánh giá hiệu lực lai và năng suất nông học lai gần sau đó được thực hiện với các cây chứa 11 sự kiện này. Các cây lai chứa sự kiện chuyển gen này thu được khả năng dung nạp glyphosat từ cây bố trong phép lai. Các thử nghiệm về hiệu lực lai trên cánh đồng được thực hiện chủ yếu như được mô tả đối với thử nghiệm trên cánh đồng trái mùa năm thứ nhất ở Nam Mỹ nhưng xử lý bằng thuốc diệt cỏ như sau: (1) đối chứng không được xử lý; (2) glyphosat với tỉ lệ 3 lbs ae/ac được sử dụng ở V4 sau đó là V8; (3) glufosinat với tỉ lệ 0,8 lb ai/ac được sử dụng ở V4 sau đó là V8; (4) dicamba với tỉ lệ 2 lbs ae/ac được sử dụng PRE và sau đó lại được sử dụng ở V4 sau đó là V8; (5) glyphosat với tỉ lệ 3lbs ae/ac cộng với dicamba với tỉ lệ 1,5 lbs ae/ac được sử dụng ở V4 sau đó là V8; (6) glufosinat với tỉ lệ 0,8 lbs ai/ac cộng với dicamba với tỉ lệ 1 lb ae/ac được sử dụng ở V4 sau đó là glyphosat với tỉ lệ 3 lbs ae/ac cộng với dicamba với tỉ lệ 1,5 lbs ae/ac được sử dụng ở V8. Việc xác định tỉ lệ tổn thương được thực hiện ở thời điểm 10 đến 14 ngày sau khi sử dụng thuốc diệt cỏ. Các trị số trung bình chung cho nhiều cây chứa cùng một sự kiện được sử dụng để lựa chọn các sự kiện để tiếp tục. Dựa vào việc tính điểm tổn thương thể lai, tính điểm nông học, kết quả về hiệu lực lai, năng suất nông học lai gần, và phân tích phân tử bổ sung, 5 sự kiện được lựa chọn để tiếp tục.

Sau đó phân tích phân tử bổ sung được thực hiện cho 5 sự kiện này. Số liệu phân tử và trên cánh đồng trong nhiều năm cho mỗi một trong 5 sự kiện này, bao gồm các thử nghiệm về hiệu lực lai trên cánh đồng, các phép đo về kết quả lai và lai gần, tính điểm nông học, và thông tin phân tử sau đó được xem xét lại, và hai sự kiện được lựa chọn để phân tích thêm. Cả hai sự kiện này đều được tạo ra bằng cách sử dụng cùng một vector biến nạp, và do đó có cùng một gắn xen gen chuyển nhưng không cùng một vị trí trên bộ gen hoặc trình tự bên cạnh.

Các thử nghiệm hiệu lực lai và lai gần trên cánh đồng năm thứ hai ở Mỹ, và các thử nghiệm nông học lai và lai gần trên cánh đồng được thực hiện để đánh giá hai sự kiện này. Các thử nghiệm về hiệu lực lai này được thực hiện tương tự thử nghiệm trên cánh đồng ở Mỹ năm thứ nhất, nhưng bao gồm nhiều chế độ xịt khác nhau. Hiệu lực được đo bằng mức độ tổn thương và kết quả về hiệu lực lai. Phân tích phân tử bổ sung cho các sự kiện cũng được thực hiện. Các cây lai chứa sự kiện chuyển gen thu được khả năng dung nạp glyphosat từ cây bố trong phép lai. Các thử nghiệm lai Hiệu lực 1 và 2 trên cánh đồng được thực hiện ở 12 vị trí qua 2 bang và thử nghiệm lai Hiệu lực 3 trên cánh đồng được thực hiện ở 33 vị trí qua 4 bang. Trong các thử nghiệm trên cánh đồng này, chế phẩm glyphosat là Roundup PowerMAX 4.5SL, chế phẩm dicamba là Clarity 4SL, và chế phẩm glufosinat là Ignite 280 2.34SL. Việc sử dụng thuốc diệt cỏ cho các thử nghiệm Hiệu lực 1 và Hiệu lực 2 (với các phép lai với hai dòng lai gần riêng biệt) là: (1) đối chứng không được xử lý; (2) glufosinat với tỉ lệ 0,4 lb ai/ac được sử dụng ở VE-V2 sau đó là V6; (3) glufosinat với tỉ lệ 0,8 lb ai/ac được sử dụng ở VE-V2 sau đó là V6; (4) dicamba với tỉ lệ 0,5 lbs ae/ac được sử dụng ở V4 sau đó là V8; (5) dicamba với tỉ lệ 1,0 lbs ae/ac được sử dụng ở V4 sau đó là V8; và (6) glyphosat với tỉ lệ 2,25lbs ae/ac cộng với dicamba với tỉ lệ 1,0 lbs ae/ac được sử dụng ở V4 sau đó là V8. Việc sử dụng thuốc diệt cỏ cho thử nghiệm Hiệu lực 3 (thể hiện thể lai từ phép lai với dòng lai gần thứ 3) là: (1) đối chứng không được xử lý; (2) dicamba với tỉ lệ 0,5 lbs ae/ac được sử dụng ở VE-V2 sau đó là glufosinat với tỉ lệ 0,4 lb ai/ac được sử dụng ở V6; và (3) dicamba với tỉ lệ 1,0 lbs ae/ac được sử dụng ở VE-V2 sau đó là glufosinat với tỉ lệ 0,8 lb ai/ac được sử dụng ở V6. Việc đánh giá mức độ tổn thương được thực hiện ở thời điểm 10 đến 14 ngày sau khi sử dụng thuốc diệt cỏ và cho nhiều cây chứa cùng một sự kiện được sử dụng để lựa chọn các sự kiện để tiếp tục. Số liệu về năng suất và đặc điểm nông học được thu thập.

Để so sánh mức độ tổn thương thể lai cho hai sự kiện này, phân tích tổng hợp nhiều thử nghiệm trên cánh đồng về hiệu lực lai được thực hiện. (Bảng 4) Mức độ tổn thương được tính điểm ở V8 (tại đó phân tích V8 bao gồm tổn thương tích lũy từ việc sử dụng thuốc diệt cỏ V2, V4, V6, và V8) với khác biệt ít có ý nghĩa thống kê nhất (LSD ở $p < 0,05$). Phép thử 1, phép thử 2, và phép thử 3 thể hiện các phép lai với 3 cây ngô bố mẹ lai gần độc lập, mà được sử dụng để tạo ra thể lai cho thử nghiệm trên cánh đồng đã được chỉ ra. Đối với mỗi thử nghiệm, khác biệt không có ý nghĩa thống kê về mức độ tổn thương được phát hiện ra giữa các thể lai được tạo ra bằng cách sử dụng ngô bố mẹ chuyển gen chứa một trong hai sự kiện này.

Bảng 4. Phân tích tổng hợp về mức độ tổn thương từ các thử nghiệm trên cánh đồng về hiệu lực lai.

Thử nghiệm trên cánh đồng	Ngô chuyển gen	Tổn thương V8	LSD (P<0,05)
Năm thứ 1 kết hợp ở Nam Mỹ và Mỹ	MON 87419	0,43	0,3
Năm thứ 1 kết hợp ở Nam Mỹ và Mỹ	EVENT 2	0,49	0,3
Hiệu lực lai năm thứ 2 ở Nam Mỹ	MON 87419	2,58	3
Hiệu lực lai năm thứ 2 ở Nam Mỹ	EVENT 2	1,98	3
Thử nghiệm lai 1 năm thứ 2 ở Mỹ	MON 87419	0	0
Thử nghiệm lai 1 năm thứ 2 ở Mỹ	EVENT 2	0	0
Thử nghiệm lai 2 năm thứ 2 ở Mỹ	MON 87419	0	0
Thử nghiệm lai 2 năm thứ 2 ở Mỹ	EVENT 2	0	0
Thử nghiệm lai 2 năm thứ 3 ở Mỹ	MON 87419	0,31	0,42
Thử nghiệm lai 2 năm thứ 3 ở Mỹ	EVENT 2	0,12	0,42

Phân tích tổng hợp kết quả hiệu lực (bushel/acre) của thể lai từ nhiều thử nghiệm trên cánh đồng về hiệu lực được thực hiện để so sánh kết quả từ các thể lai chứa mỗi một trong hai sự kiện này. (Bảng 5) Đối với mỗi thử nghiệm, phát hiện ra khác biệt không có tính thống kê về kết quả hiệu lực giữa các thể lai được tạo ra bằng cách sử dụng ngô bố mẹ chuyển gen chứa một trong hai sự kiện này.

Bảng 5. Phân tích tổng hợp kết quả từ các thử nghiệm trên cánh đồng về hiệu lực lai.

Thử nghiệm trên cánh đồng	Ngô lai	Kết quả (Bu/ac)	LSD (p<0,05)
Năm thứ 1 kết hợp ở Nam Mỹ và Mỹ	MON 87419	171,07	4
Năm thứ 1 kết hợp ở Nam Mỹ và Mỹ	EVENT 2	172,90	4
Năm thứ 2 ở Nam Mỹ	MON 87419	233,66	14
Năm thứ 2 ở Nam Mỹ	EVENT 2	231,59	14
Thử nghiệm 1 năm thứ 2 ở Mỹ	MON 87419	217,43	10
Thử nghiệm 1 năm thứ 2 ở Mỹ	EVENT 2	220,06	10
Thử nghiệm 2 năm thứ 2 ở Mỹ	MON 87419	219,68	7
Thử nghiệm 2 năm thứ 2 ở Mỹ	EVENT 2	221,21	7
Thử nghiệm 3 năm thứ 2 ở Mỹ	MON 87419	208,76	5,67
Thử nghiệm 3 năm thứ 2 ở Mỹ	EVENT 2	213,02	5,67

Các thử nghiệm kiểm tra áp lực trên cánh đồng cũng được thực hiện với ngô chuyển gen lai chứa một trong hai sự kiện này. Trong các thử nghiệm áp lực này, một trong hai thuốc diệt cỏ glufosinat (Ignite 280, 2.34SL) hoặc dicamba (Clarity 4SL) được sử dụng với tỉ lệ cao không thương mại. Với các thử nghiệm trên cánh đồng điển hình, tỉ lệ 1X đối với glufosinat

là 0,4 lb ai/ac và tỉ lệ 1X đối với dicamba là 0,5 lb ae/ac. Đối với các thử nghiệm trên cánh đồng kiểm tra áp lực glufosinat, glufosinat được sử dụng ở VE-V2 sau đó là V4 sau đó là V8 ở các tỉ lệ sau đây: (1) 1 lb ai/ac (2.5X); (2) 2 lb ai/ac (5X); (3) 4 lb ai/ac (10X); và (4) 8 lb ai/ac (20X). Với các thử nghiệm trên cánh đồng kiểm tra áp lực dicamba, dicamba được sử dụng ở VE-V2 sau đó là V4 sau đó là V8 ở các tỉ lệ sau: (1) 2 lb ae/ac (4X); (2) 4 lb ae/ac (8X); (3) 8 lb ae/ac (16X); và (4) 16 lb ae/ac (32X). Vào cuối mùa này, các thử nghiệm trên cánh đồng kiểm tra áp lực lai được thu hoạch và năng suất (bushel/acre hoặc bu/ac) được xác định. Việc phân tích số liệu năng suất này so sánh các thể lai chứa một trong hai sự kiện này. Đối với mỗi thử nghiệm, phát hiện ra khác biệt không có tính thống kê về năng suất ở bất kỳ trong số các tỉ lệ sử dụng thuốc diệt cỏ giữa các thể lai được tạo ra bằng cách sử dụng ngô bố mẹ chuyển gen chứa một trong hai sự kiện này.

Bảng 6. Năng suất của các thử nghiệm trên cánh đồng về hiệu lực kiểm tra áp lực lai.

Thử nghiệm trên cánh đồng	Ngô lai chuyển gen	Năng suất (Bu/ac)	LSD (p<0,05)
Thử nghiệm áp lực glufosinat 2.5-20X	MON 87419	207,31	40
Thử nghiệm áp lực glufosinat 2.5-20X	EVENT 2	201,65	40
Thử nghiệm áp lực dicamba 4-32X	MON 87419	239,93	40
Thử nghiệm áp lực dicamba 4-32X	EVENT 2	234,60	40

Các thử nghiệm nông học lai được thực hiện trong 3 tập hợp với 15 vị trí cho mỗi tập hợp ở 21 vị trí qua 3 bang và được thực hiện trong cùng một mùa với các thử nghiệm trên cánh đồng về hiệu lực lai. Các kết quả đo nông học được thu lại trong cả mùa thử nghiệm trên cánh đồng, và cuối mùa này, năng suất nông học được xác định. Phân tích tổng hợp qua các thử nghiệm trên cánh đồng về đặc điểm nông học của thể lai trong nhiều mùa, ở nhiều vị trí được sử dụng để so sánh năng suất của đối chứng lai và các thể lai chứa một trong hai sự kiện này. Khác biệt không có tính thống kê về năng suất nông học của thể lai được phát hiện ra giữa các thể lai chuyển gen hoặc như được so sánh với các đối chứng lai (Bảng 7).

Bảng 7. Phân tích tổng hợp năng suất của các thử nghiệm trên cánh đồng về các đặc điểm nông học của thể lai.

Thử nghiệm trên cánh đồng	Ngô lai	Năng suất (Bu/ac)	LSD (p<0,05)
Năm thứ 1 kết hợp ở Nam Mỹ và Mỹ	Đối chứng	180,28	6
Năm thứ 1 kết hợp ở Nam Mỹ và Mỹ	MON 87419	179,01	6
Năm thứ 1 kết hợp ở Nam Mỹ và Mỹ	SỰ KIỆN 2	184,88	6
Năm thứ 2 ở Nam Mỹ	Đối chứng	231,70	10
Năm thứ 2 ở Nam Mỹ	MON 87419	232,47	10
Năm thứ 2 ở Nam Mỹ	SỰ KIỆN 2	225,07	10
Thử nghiệm 1 năm thứ 2 ở Mỹ	Đối chứng	185,80	17,40
Thử nghiệm 1 năm thứ 2 ở Mỹ	MON 87419	187,09	17,40
Thử nghiệm 1 năm thứ 2 ở Mỹ	SỰ KIỆN 2	192,28	17,40
Thử nghiệm 2 năm thứ 2 ở Mỹ	Đối chứng	219,12	12,83
Thử nghiệm 2 năm thứ 2 ở Mỹ	MON 87419	219,56	12,83
Thử nghiệm 2 năm thứ 2 ở Mỹ	SỰ KIỆN 2	221,22	12,83
Thử nghiệm 3 năm thứ 2 ở Mỹ	Đối chứng	197,62	8,66
Thử nghiệm 3 năm thứ 2 ở Mỹ	MON 87419	191,49	8,66
Thử nghiệm 3 năm thứ 2 ở Mỹ	SỰ KIỆN 2	195,48	8,66

Các thử nghiệm trên cánh đồng về hiệu lực lai gần được thực hiện bằng cách sử dụng kiểu khối hoàn chỉnh ngẫu nhiên ở 6 địa điểm, 1 bang. Trong các thử nghiệm trên cánh đồng này, chế phẩm dicamba là Clarity 4SL, và chế phẩm glufosinat là Ignite 280 2.34SL. Việc sử dụng thuốc diệt cỏ cho các thử nghiệm trên cánh đồng về hiệu lực lai gần là glufosinat với tỉ lệ 0,8 lb ai/ac và dicamba với tỉ lệ 2,0 lbs ae/ac được sử dụng ở VE-V2 sau đó là glufosinat với tỉ lệ 0,8 lb ai/ac và dicamba với tỉ lệ 2,0 lbs ae/ac được sử dụng ở V8. Vào cuối mùa, năng suất được đo. Đối với mỗi thử nghiệm này, khác biệt có ý nghĩa thống kê về năng suất hiệu lực lai gần được phát hiện ra khi so sánh năng suất lai gần thu hoạch từ các thử nghiệm này từ ngô chuyển gen chứa một trong các sự kiện này (Bảng 8). Số liệu này chỉ ra hiệu quả tốt hơn của ngô chuyển gen chứa sự kiện MON 87419.

Bảng 8. Phân tích tổng hợp năng suất của các thử nghiệm trên cánh đồng về hiệu lực lai gần.

Thử nghiệm trên cánh đồng	Ngô lai gần	Năng suất (Bu/ac)	LSD (p<0,05)
Lai gần năm thứ hai ở Mỹ	MON 87419	110,95	7
Lai gần năm thứ hai ở Mỹ	SỰ KIỆN 2	98,89	7

Các thử nghiệm trên cánh đồng về đặc điểm nông học lai gần được thực hiện trong cùng một mùa với thử nghiệm trên cánh đồng về hiệu lực năm thứ 1 ở Mỹ, thử nghiệm trên

cánh đồng về hiệu lực năm thứ 2 ở Mỹ (11 vị trí, 1 bang). Các mảnh ruộng được chuẩn bị theo kiểu khối hoàn chỉnh ngẫu nhiên được thực hiện ở nhiều vị trí, và các thử nghiệm được bao gồm đối chứng của dòng lai gần so sánh được với các dòng lai gần chuyển gen. Phân tích tổng hợp qua các thử nghiệm nông học lai gần trong nhiều mùa, ở nhiều địa điểm được thực hiện để so sánh năng suất của đối chứng được tạo cặp và dòng lai gần chuyển gen được tạo ra bằng cách sử dụng một trong hai sự kiện này. Khác biệt không có tính thống kê về năng suất nông học lai gần được phát hiện ra giữa ngô đối chứng và ngô chuyển gen chứa sự kiện MON 87419 (Bảng 9). Ngược lại, có sự giảm có ý nghĩa thống kê về năng suất ở ngô chuyển gen chứa sự kiện 2 khi so với đối chứng hoặc ngô chuyển gen chứa sự kiện MON 87419. Số liệu này thể hiện thêm về hiệu quả tốt hơn của ngô chuyển gen chứa sự kiện MON 87419.

Bảng 9. Phân tích tổng hợp năng suất của các thử nghiệm trên cánh đồng về đặc điểm nông học dòng lai gần.

Thử nghiệm trên cánh đồng	Ngô lai gần	Tổng (Bu/ac)	LSD ($p < 0,05$)
Lai gần năm thứ 1 ở Mỹ	Đối chứng	65,87	31
Lai gần năm thứ 1 ở Mỹ	MON 87419	60,33	31
Lai gần năm thứ 1 ở Mỹ	EVENT 2	43,10	31
Lai gần năm thứ 2 ở Mỹ	Đối chứng	95,88	7
Lai gần năm thứ 2 ở Mỹ	MON 87419	98,77	7
Lai gần năm thứ 2 ở Mỹ	EVENT 2	75,85	7
Lai gần năm thứ 2 ở Mỹ	Đối chứng	108,90	6
Lai gần năm thứ 2 ở Mỹ	MON 87419	109,22	6
Lai gần năm thứ 2 ở Mỹ	EVENT 2	96,88	6

Ví dụ 2: Mô tả trình tự ADN của sự kiện ngô chuyển gen MON 87419

Ví dụ này mô tả đặc điểm phân tử tổng quát được thực hiện trên sự kiện ngô chuyển gen MON 87419. Sự gắn xen gen chuyển chứa sự kiện ngô chuyển gen MON 87419 chứa, theo hướng từ 5' đến 3': (i) trình tự khởi động (P-ANDge.Ubq1), trình tự dẫn đầu, và intron (L-I-ANDge.Ubq1) của gen ubiquitin (Ubq) từ *Andropogon gerardii*; được liên kết động với gen *pat* từ *Streptomyces viridochromogenes* (CR-STRvi.pat) mã hóa phosphinothricin N-acetyltransferaza (PAT) gây ra khả năng dung nạp với thuốc diệt cỏ glufosinat; được liên kết động với tín hiệu polyadenyl hóa (còn được biết là trình tự kết thúc điều khiển sự polyadenyl hóa ARN thông tin) từ tiền gen RA5B của *Oryza sativa* (T-Os.Ara5) và (ii) trình tự khởi động cho bản sao có chiều dài đầy đủ của virus khảm sọc ở lạc (Peanut Chlorotic Streak Virus) có vùng tăng cường được sao chép (duplicated enhancer region: PCISV); được liên kết động với trình tự dẫn đầu của gen phức hợp thu ánh sáng b1 từ *Triticum aestivum* (L-Ta.Lhcb1); được liên kết động với intron đầu tiên từ gen actin 1 từ *Oryza sativa* (I-Os.Act1); được liên kết động

với peptit chuyển lục lạp đầu cùng N từ gen *Petunia x hybrida* 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphat synthaza (TS-Ph.ShkG-CTP4); được liên kết động với gen *dmo* của *Stenotrophomonas maltophilia* được tối ưu hóa cho hệ biểu hiện một lá mầm (CR-STEmma.DMO), gen này mã hóa dicamba monooxygenaza (DMO) gây ra khả năng dung nạp với thuốc diệt cỏ dicamba; được liên kết động với tín hiệu polyadenyl hóa protein sốc nhiệt 17 từ *Triticum aestivum* (T-Ta.Hsp17). Đầu 5' của đột biến gắn xen gen chuyển nằm cạnh rìa Phải của *Agrobacterium tumefaciens* và đầu 3' của đột biến gắn xen gen chuyển nằm cạnh rìa Trái của *Agrobacterium tumefaciens*.

Phân tích thẩm tách Southern được thực hiện để xác nhận ngô chuyển gen chứa sự kiện MON 87419 chứa bản sao đơn, không hoạt động của gắn xen gen chuyển nguyên vẹn mà không có khung vectơ bất kỳ. Các trình tự bên cạnh được phân lập từ cả đầu 5' và 3' của gắn xen này, và các trình tự nối tương ứng được xác định bằng cách sử dụng kỹ thuật PCR đảo và/hoặc kỹ thuật đi dọc bộ gen. Vị trí trên nhiễm sắc thể của hiện tượng gắn xen của sự kiện ngô chuyển gen MON 87419 được xác định bằng PCR đảo để khuếch đại ADN bộ gen bên ngoài vị trí cần quan tâm. Các trình tự bên cạnh cho sự kiện ngô chuyển gen MON 87419 được ánh xạ lên tổ hợp vật lý bộ gen ngô đã biết và sự kiện ngô chuyển gen MON 87419 được xác nhận là không nằm trong các gen bất kỳ đã biết. Thông tin trình tự này được sử dụng để thiết kế các thử nghiệm TAQMAN® có kết quả cuối cùng đặc trưng cho sự kiện để xác định sự có mặt của sự kiện ngô chuyển gen MON 87419 trong mẫu. Thông tin trình tự của vị trí gắn xen cũng được sử dụng để phân tích tin sinh học vị trí nhiễm sắc thể của sự kiện này. Tính nguyên vẹn của vị trí gắn xen được xác định bằng PCR qua alen kiểu hoang bằng cách sử dụng các đoạn mồi đặc hiệu với các vùng bên của sự kiện ngô chuyển gen MON 87419. Vị trí gắn xen kiểu hoang được sử dụng để ánh xạ lên bộ gen tham chiếu của ngô vị trí đơn nhất của sự tích hợp gen chuyển cho sự kiện ngô chuyển gen MON 87419. Để đảm bảo là không có thay đổi hoặc đột biến nào được đưa vào vùng bất kỳ của gen chuyển trong quá trình biến nạp, toàn bộ sự gắn xen gen chuyển của sự kiện MON 87419 được phân lập từ cây này và được giải trình tự.

Việc giải trình tự protein đầu cùng N của các protein PAT và DMO đã biểu hiện được thực hiện bằng cách sử dụng các dịch chiết protein đã tinh chế miễn dịch từ hạt ngô chuyển gen chứa sự kiện MON 87419. Sau đó, trình tự này được sử dụng để xác nhận trình tự axit amin đầu cùng N chính xác. Phân tích Western được thực hiện trên dịch chiết protein từ hạt của ngô chuyển gen chứa sự kiện MON 87419. Phân tích này xác nhận là một protein duy nhất có kích thước dự kiến đang được tạo ra lần lượt cho PAT và cho DMO. Các thử nghiệm ELISA được thực hiện để xác định mức protein trong các loại mô ngô chuyển gen khác nhau (lá, hạt, rễ và phần) cho protein PAT hoặc DMO được biểu hiện từ sự kiện ngô chuyển gen MON

87419. Phân tích Northern được thực hiện trên ARN poly-A được phân lập từ hạt của ngô chuyển gen chứa sự kiện MON 87419. Phân tích này xác nhận kích thước và số lượng bản sao cho các sản phẩm ARN thông tin *pat* và *dmo*. Mức độ biểu hiện ARN cũng được đo bằng PCR thời gian thực bằng cách sử dụng các mẫu từ ngô chuyển gen chứa sự kiện MON 87419.

Ví dụ 3: Các thử nghiệm TAQMAN® có kết quả cuối cùng đặc trưng cho sự kiện

Ví dụ này mô tả phương pháp khuếch đại nhiệt TAQMAN® có kết quả cuối cùng đặc trưng cho sự kiện được thực hiện để xác định ngô chuyển gen chứa sự kiện MON 87419 trong mẫu. Các đoạn mồi ADN được sử dụng trong thử nghiệm kết quả cuối cùng này là các đoạn mồi SQ26644 (SEQ ID NO:11), SQ26645 (SEQ ID NO:12), và đoạn dò PB11207 được đánh dấu 6-FAM™ (SEQ ID NO:13). 6-FAM™ là sản phẩm thuốc nhuộm huỳnh quang của Applied Biosystems (Foster City, CA) được gắn vào đoạn dò ADN. Đối với các đoạn dò TAQMAN® MGB™, hoạt tính exonucleaza 5' của polymeraza Taq ADN cắt đoạn dò này từ đầu 5', giữa chất phát huỳnh quang và chất hấp phụ huỳnh quang. Khi được lai với chuỗi ADN đích, chất hấp phụ và chất phát huỳnh quang được bố trí cách nhau đủ để tạo ra tín hiệu huỳnh quang, do đó giải phóng huỳnh quang. SQ26644 và SQ26645 khi được sử dụng với các phương pháp phản ứng này và PB11207 tạo ra phân tử siêu sao chép ADN là dấu hiệu xác định sự kiện ngô chuyển gen MON 87419. Các đối chứng cho phân tích này nên bao gồm đối chứng dương chứa sự kiện ngô chuyển gen MON 87419, đối chứng âm từ ngô không chuyển gen, và đối chứng âm không chứa ADN khuôn. Thêm vào đó, đối chứng cho phản ứng PCR nên tùy ý bao gồm Các đoạn mồi đối chứng nội kiểm và Đoạn dò đối chứng nội kiểm, đặc trưng cho một gen sao chép duy nhất trong bộ gen ngô. Các thử nghiệm này được tối ưu hóa để sử dụng cùng với một trong số Applied Biosystems GeneAmp® PCR System 9700 (chạy ở tốc độ tối đa) hoặc máy luân nhiệt MJ Research DNA Engine PTC-225, nhưng thiết bị khác cũng có thể được sử dụng.

Ví dụ về các điều kiện hữu ích với phương pháp thử nghiệm TAQMAN® kết quả cuối cùng hữu ích để phát hiện sự kiện ngô chuyển gen MON 87419 là như sau. Bước 1: nước 18 megôm được điều chỉnh đến thể tích cuối cùng là 10µl. Bước 2: 5,0µl Hỗn hợp 2X Universal Master Mix (dNTP, enzym, dung dịch đệm) đến nồng độ cuối cùng là 1X. Bước 3: 0,5µl đoạn mồi sự kiện-1 (SQ26644) và đoạn mồi sự kiện-2 (SQ26645). Hỗn hợp (được tạo huyền phù lại trong nước 18 megôm đến nồng độ là 20uM cho mỗi đoạn mồi) đến nồng độ cuối cùng 1,0µM (ví dụ, trong ống vi ly tâm, các chất sau nên được bổ sung vào để đạt được 500µl ở nồng độ cuối cùng là 20uM: 100µl đoạn mồi SQ26644 ở nồng độ là 100µM; 100µl đoạn mồi SQ26645 ở nồng độ là 100µM; 300µl nước 18 megôm). Bước 4: 0,2µl đoạn dò FAM™ MGB PB11207-sự kiện 6 (10uM) (được tạo huyền phù lại trong nước 18 megôm đến nồng độ là 10µM đến nồng độ cuối cùng 0,2µM. Bước 5: 0,5µl hỗn hợp của Đoạn mồi nội kiểm-1 và

Đoạn mỗi nội kiểm-2 (được tạo huyền phù lại trong nước 18 mêgôm đến nồng độ là $20\mu\text{M}$ cho mỗi đoạn mỗi) đến nồng độ cuối cùng là $1,0\mu\text{M}$. Bước 6: $0,2\mu\text{l}$ Đoạn dò nội kiểm VICTM ($10\mu\text{M}$) đến nồng độ cuối cùng $0,2\mu\text{M}$ (được tạo huyền phù lại trong nước 18 mêgôm đến nồng độ là $10\mu\text{M}$). Bước 7: $3,0\mu\text{l}$ ADN chiết được (khuôn) cho mỗi mẫu có mỗi một trong số các chất sau đây bao gồm 1. các mẫu lá để phân tích; 2. đối chứng âm (ADN không chuyển gen); 3. đối chứng nước âm (không có khuôn); 4. đối chứng dương ngô chuyển gen chứa ADN có sự kiện MON 87419. Bước 8: điều kiện luân nhiệt là như sau: một chu kỳ ở 50°C trong 2 phút; một chu kỳ ở 95°C trong 10 phút; 10 chu kỳ 95°C trong 15 giây, sau đó là 64°C trong 1 phút với $(-1^{\circ}\text{C}/\text{chu kỳ})$; 30 chu kỳ 95°C trong 15 giây sau đó là 54°C trong 1 phút, tùy ý thêm 10 đến 20 chu kỳ (95°C trong 15 giây, sau đó là 64°C trong 1 phút $(-1^{\circ}\text{C}/\text{chu kỳ})$ có thể gây ra sự phân tách quần thể rõ rệt hơn trong quá trình phân tích TaqMan® điểm cuối cùng); chu kỳ cuối là 10°C .

Ví dụ 4: Thử nghiệm tiếp hợp giao tử

Thử nghiệm tiếp hợp giao tử có thể được sử dụng để xác định xem cây chứa sự kiện ngô chuyển gen MON 87419 là dị hợp tử hay đồng hợp tử đối với sự kiện hoặc alen kiểu hoang. Thử nghiệm phản ứng khuếch đại có thể được thiết kế bằng cách sử dụng thông tin trình tự được cung cấp ở đây. Ví dụ, thử nghiệm PCR này sẽ bao gồm thiết kế gồm ít nhất là 3 đoạn mỗi: đoạn mỗi-1, đoạn mỗi-2, và đoạn mỗi-3, trong đó đoạn mỗi-1 là đặc hiệu với ADN bộ gen ngô trên sườn 3' của sự kiện ngô chuyển gen MON 87419; đoạn mỗi-2 là đặc hiệu với gắn xen gen chuyển có sự kiện ngô chuyển gen MON 87419; và đoạn mỗi-3 là đặc hiệu với alen kiểu hoang. Khi được sử dụng làm cặp đoạn mỗi trong phản ứng khuếch đại, đoạn mỗi-1 với đoạn mỗi-2 sẽ tạo ra phân tử siêu sao chép PCR đặc trưng cho sự kiện ngô chuyển gen MON 87419. Khi được sử dụng làm cặp đoạn mỗi trong phản ứng khuếch đại, đoạn mỗi-1 với đoạn mỗi-3 sẽ tạo ra phân tử siêu sao chép PCR đặc trưng cho alen kiểu hoang. Trong phản ứng PCR được thực hiện trên ADN bộ gen ngô, các phân tử siêu sao chép PCR tương ứng được tạo ra từ (đoạn mỗi-1 + đoạn mỗi-2) và (đoạn mỗi-1 + đoạn mỗi-3) sẽ khác biệt về trình tự và kích thước của phân tử siêu sao chép. Khi 3 đoạn mỗi này được bao gồm trong phản ứng PCR với ADN được chiết từ cây đồng hợp tử với sự kiện ngô chuyển gen MON 87419, chỉ có phân tử siêu sao chép đoạn mỗi-1 + đoạn mỗi-2 sẽ được tạo ra. Khi 3 đoạn mỗi này được bao gồm trong phản ứng PCR có ADN được chiết từ cây dị hợp tử đối với sự kiện ngô chuyển gen MON 87419, cả phân tử siêu sao chép đoạn mỗi-1 + đoạn mỗi-2 và phân tử siêu sao chép đoạn mỗi-1 + đoạn mỗi-3 sẽ được tạo ra. Khi 3 đoạn mỗi này được trộn với nhau trong phản ứng PCR cùng với ADN được chiết từ cây không có sự kiện ngô chuyển

gen MON 87419 (nghĩa là kiểu hoang), chỉ phân tử siêu sao chép đoạn mỗi-1 + đoạn mỗi-3 được tạo ra.

Phương pháp khác để xác định sự tiếp hợp giao tử của cây ngô chuyển gen đối với sự kiện ngô chuyển gen MON 87419 là phản ứng khuếch đại nhiệt TAQMAN® điểm kết thúc. Đối với loại thử nghiệm này, ngoài các đoạn mỗi như được mô tả trên đây, thử nghiệm này sẽ bao gồm hai đoạn dò được đánh dấu huỳnh quang. Đoạn dò-1 sẽ là đặc hiệu với sự kiện ngô chuyển gen MON 87419, và đoạn dò-2 sẽ là đặc hiệu với cây ngô không có sự kiện ngô chuyển gen MON 87419 (kiểu hoang), và trong đó hai đoạn dò này chứa các nhãn huỳnh quang khác nhau, ví dụ nhãn 6-FAM™ hoặc nhãn VIC™. Khi được sử dụng trong thử nghiệm khuếch đại nhiệt TAQMAN® điểm kết thúc, đoạn mỗi-1 + đoạn mỗi-2 + đoạn dò-1 sẽ tạo ra tín hiệu huỳnh quang thứ nhất đặc hiệu cho sự kiện ngô chuyển gen MON 87419. Khi được sử dụng trong phản ứng khuếch đại nhiệt TAQMAN® điểm kết thúc, đoạn mỗi-1 + đoạn mỗi-3 + đoạn dò-2 sẽ tạo ra tín hiệu huỳnh quang thứ hai đặc hiệu cho ngô kiểu hoang. Khi 3 đoạn mỗi và 2 đoạn dò được bao gồm trong phản ứng khuếch đại nhiệt TAQMAN® điểm kết thúc với ADN được chiết từ cây đồng hợp tử đối với sự kiện ngô chuyển gen MON 87419, chỉ có tín hiệu huỳnh quang thứ nhất (đặc hiệu với đoạn mỗi-1 + đoạn mỗi-2 + đoạn dò-1) sẽ được tạo ra. Khi 3 đoạn mỗi này được bao gồm trong phản ứng khuếch đại nhiệt TAQMAN® điểm kết thúc với ADN được chiết từ cây dị hợp tử đối với sự kiện ngô chuyển gen MON 87419, cả tín hiệu huỳnh quang thứ nhất (đặc hiệu cho đoạn mỗi-1 + đoạn mỗi-2 + đoạn dò-1) và tín hiệu huỳnh quang thứ hai (đặc hiệu cho đoạn mỗi-1 + đoạn mỗi-3 + đoạn dò-2) sẽ được tạo ra. Khi 3 đoạn mỗi này được trộn với nhau trong phản ứng khuếch đại nhiệt TAQMAN® điểm kết thúc cùng với ADN được chiết từ cây không có sự kiện ngô chuyển gen MON 87419 (kiểu hoang), chỉ tín hiệu huỳnh quang thứ hai (đặc hiệu cho đoạn mỗi-1 + đoạn mỗi-3 + đoạn dò-2) sẽ được tạo ra.

Một phương pháp khác để xác định sự tiếp hợp giao tử của cây đối với sự kiện ngô chuyển gen MON 87419 là phân tích Southern. Một người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu làm thế nào để thiết kế các đoạn dò lai Southern thứ nhất đặc hiệu với sự kiện ngô chuyển gen MON 87419 và đoạn dò lai Southern thứ hai đặc hiệu với cây ngô không có sự kiện ngô chuyển gen MON 87419 (kiểu hoang). Với phân tích Southern, tín hiệu chỉ được phát hiện từ đoạn dò lai Southern thứ nhất sẽ là dấu hiệu chỉ ra cây đồng hợp tử đối với sự kiện ngô chuyển gen MON 87419; tín hiệu được phát hiện từ cả đoạn dò lai Southern thứ nhất và đoạn dò lai Southern thứ hai sẽ là dấu hiệu chỉ ra cây dị hợp tử đối với sự kiện ngô chuyển gen MON 87419; và tín hiệu chỉ được phát hiện ra từ đoạn dò lai Southern thứ hai sẽ là dấu hiệu chỉ ra ADN được chiết từ cây không có sự kiện ngô chuyển gen MON 87419 (kiểu hoang).

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phân tử ADN tái tổ hợp chứa trình tự được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, và SEQ ID NO:10.
2. Phân tử ADN tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó phân tử ADN này là từ cây hoặc hạt ngô chuyển gen chứa sự kiện ngô chuyển gen MON 87419, mẫu đại diện của hạt chứa sự kiện này đang được lưu trữ với số truy cập ATCC là PTA-120860.
3. Phân tử ADN tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó phân tử ADN này là phân tử siêu sao chép phát hiện sự có mặt của ADN từ sự kiện ngô chuyển gen MON 87419.
4. Phân tử ADN tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó phân tử ADN này nằm trong cây ngô, tế bào ngô, hạt, cây con hoặc một bộ phận của ngô chuyển gen chứa sự kiện ngô chuyển gen MON 87419, mẫu đại diện của hạt chứa sự kiện này đang được lưu trữ với số ATCC là PTA-120860.
5. Phân tử ADN có chiều dài thích hợp chứa trình tự ADN kế tiếp của SEQ ID NO:10 để làm đoạn dò ADN lai trong các điều kiện lai nghiêm ngặt với trình tự ADN được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, và SEQ ID NO:10, trong đó phân tử ADN này không lai trong các điều kiện lai nghiêm ngặt với trình tự ADN không chứa trình tự được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, và SEQ ID NO:10, và trong đó phân tử ADN này chứa SEQ ID NO:1 hoặc SEQ ID NO:2.
6. Cặp phân tử ADN chứa phân tử ADN thứ nhất và phân tử ADN thứ hai, trong đó phân tử ADN thứ nhất là một đoạn của SEQ ID NO:9 và phân tử ADN thứ hai là một đoạn của ADN ngô chuyển gen chứa sự kiện ngô chuyển gen MON 87419, và trong đó mỗi phân tử ADN thứ nhất và thứ hai chứa trình tự ADN có chiều dài thích hợp bao gồm các nucleotit kế tiếp để làm các đoạn mồi ADN khi được sử dụng cùng nhau trong phản ứng khuếch đại với ADN chứa sự kiện ngô chuyển gen MON 87419 để tạo ra phân tử siêu sao chép xác định sự kiện ngô chuyển gen MON 87419 trong mẫu, trong đó phân tử siêu sao chép này chứa SEQ ID NO:1 hoặc SEQ ID NO:2.
7. Phương pháp phát hiện sự có mặt của sự kiện ngô chuyển gen MON 87419 trong mẫu ADN, phương pháp này bao gồm:
 - a) cho mẫu này tiếp xúc với phân tử ADN theo điểm 5;

- b) đưa mẫu này và phân tử ADN vào các điều kiện lai nghiêm ngặt; và
 - c) phát hiện sự lai của phân tử ADN này với phân tử ADN đích trong mẫu, trong đó sự lai của phân tử ADN này với phân tử ADN đích chỉ ra sự có mặt của sự kiện ngô chuyển gen MON 87419 trong mẫu ADN.
8. Phương pháp phát hiện sự có mặt của sự kiện ngô chuyển gen MON 87419 trong mẫu ADN, phương pháp này bao gồm:
- a) cho mẫu này tiếp xúc với cặp phân tử ADN theo điểm 6;
 - b) thực hiện phản ứng khuếch đại đủ để tạo ra phân tử siêu sao chép ADN chứa trình tự được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, và SEQ ID NO:8; và
 - c) phát hiện sự có mặt của phân tử siêu sao chép ADN này trong phản ứng, trong đó sự có mặt của phân tử siêu sao chép ADN trong phản ứng chỉ ra sự có mặt của sự kiện ngô chuyển gen MON 87419 trong mẫu ADN.
9. Kit phát hiện ADN bao gồm:
- a) một phân tử ADN chứa SEQ ID NO:1 hoặc SEQ ID NO:2; hoặc
 - b) cặp phân tử ADN chứa phân tử ADN thứ nhất và phân tử ADN thứ hai, trong đó phân tử ADN thứ nhất là đoạn chứa SEQ ID NO:9 và phân tử ADN thứ hai là một đoạn của ADN ngô chuyển gen chứa sự kiện ngô chuyển gen MON 87419, và trong đó mỗi phân tử ADN thứ nhất và thứ hai chứa trình tự ADN có chiều dài thích hợp bao gồm các nucleotit kế tiếp để làm đoạn mỗi ADN khi được sử dụng cùng nhau trong phản ứng khuếch đại với ADN chứa sự kiện MON 87419 để tạo ra phân tử siêu sao chép phát hiện sự kiện ngô chuyển gen MON 87419 trong mẫu, trong đó phân tử siêu sao chép này chứa SEQ ID NO:1 hoặc SEQ ID NO:2.
10. Cây, hạt, tế bào, bộ phận của cây ngô chuyển gen hoặc sản phẩm hàng hóa từ ngô chuyển gen chứa một phân tử ADN có trình tự ADN được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, và SEQ ID NO:10.
11. Cây, hạt, hoặc tế bào của cây ngô chuyển gen theo điểm 10, trong đó cây, hạt, hoặc tế bào này có khả năng dung nạp với glufosinat hoặc dicamba, hoặc thuốc diệt cỏ dicamba và glufosinat.
12. Cây, hạt, tế bào, bộ phận của cây ngô chuyển gen hoặc sản phẩm hàng hóa từ ngô chuyển gen chứa sự kiện ngô chuyển gen MON 87419, mẫu đại diện của hạt chứa sự kiện này đang được lưu trữ với số truy cập ATCC là PTA-120860.

13. Cây ngô chuyển gen hoặc hạt ngô chuyển gen theo điểm 12, trong đó cây ngô hoặc hạt ngô này là thể lai có ít nhất một cây bố mẹ chứa sự kiện ngô chuyển gen MON 87419.

14. Phương pháp phòng trừ cỏ dại trong một vùng bao gồm trồng cây ngô chuyển gen chứa sự kiện ngô chuyển gen MON 87419 trong vùng này và sử dụng liều hữu hiệu của dicamba, hoặc glufosinat, hoặc thuốc diệt cỏ dicamba và glufosinat để phòng trừ cỏ dại trong vùng này mà không làm hại đến cây ngô chuyển gen này.

15. Phương pháp theo điểm 14, trong đó liều hữu hiệu của thuốc diệt cỏ glufosinat có tổng liều là khoảng 0,1 pound (0,045kg) đương lượng axit trên mỗi mẫu Anh (0,405 hecta) đến khoảng 16 pound (7,2kg) đương lượng axit trên mỗi mẫu Anh (0,405 hecta) thuốc diệt cỏ glufosinat đến hết mùa sinh trưởng.

16. Phương pháp theo điểm 14, trong đó liều hữu hiệu của thuốc diệt cỏ glufosinat có tổng liều là khoảng 0,4 pound (0,18kg) đương lượng axit trên mỗi mẫu Anh (0,405 hecta) đến khoảng 1,59 pound (0,72kg) đương lượng axit trên mỗi mẫu Anh (0,405 hecta) thuốc diệt cỏ glufosinat đến hết mùa sinh trưởng.

17. Phương pháp theo điểm 14, trong đó liều hữu hiệu của thuốc diệt cỏ dicamba có tổng liều là khoảng 0,1 pound (0,045kg) đương lượng axit trên mỗi mẫu Anh (0,405 hecta) đến khoảng 16 pound (7,2kg) đương lượng axit trên mỗi mẫu Anh (0,405 hecta) thuốc diệt cỏ dicamba đến hết mùa sinh trưởng.

18. Phương pháp theo điểm 14, trong đó liều hữu hiệu của thuốc diệt cỏ dicamba có tổng liều là khoảng 0,5 pound (0,22kg) đương lượng axit trên mỗi mẫu Anh (0,405 hecta) đến khoảng 2 pound (0,9kg) đương lượng axit trên mỗi mẫu Anh (0,405 hecta) thuốc diệt cỏ dicamba đến hết mùa sinh trưởng.

19. Phương pháp tạo ra cây ngô chuyển gen có khả năng dung nạp với thuốc diệt cỏ dicamba và glufosinat, phương pháp này bao gồm:

- a) lai hữu tính cây ngô chuyển gen chứa sự kiện ngô chuyển gen MON 87419 với chính nó hoặc cây ngô thứ hai;
- b) thu hoạch hạt được sinh ra;
- c) trồng hạt này để tạo ra cây con;
- d) xử lý cây con bằng glufosinat, hoặc dicamba, hoặc thuốc diệt cỏ dicamba và glufosinat; và
- e) chọn lọc cây con có khả năng dung nạp với thuốc diệt cỏ dicamba và glufosinat.

20. Phương pháp trồng cây ngô chuyển gen có khả năng dung nạp với thuốc diệt cỏ dicamba và glufosinat, phương pháp này bao gồm:

- a) trồng hạt ngô chuyển gen chứa sự kiện MON 87419;
- b) cho cây mọc lên từ hạt này; và
- c) xử lý cây này bằng glufosinat, hoặc dicamba, hoặc thuốc diệt cỏ dicamba và glufosinat.

21. Phương pháp tạo ra cây có khả năng dung nạp với việc sử dụng thuốc diệt cỏ dicamba và glufosinat, phương pháp này bao gồm:

- a) tạo ra cấu trúc ADN chứa đột biến gắn xen gen chuyển được thể hiện trong Fig. 1;
- b) đưa cấu trúc ADN này vào tế bào ngô; và
- c) tái sinh tế bào cây ngô này để tạo ra cây ngô có khả năng dung nạp với việc sử dụng thuốc diệt cỏ dicamba và glufosinat.

22. Phương pháp theo điểm 21, trong đó sự gắn xen gen chuyển bao gồm SEQ ID NO:9.

23. Phương pháp theo điểm 21, trong đó việc đưa cấu trúc ADN này vào tế bào cây ngô tạo ra trình tự được chọn từ SEQ ID NO:1-8 và 10 như là một phần của bộ gen của tế bào ngô.

24. Cây ngô được tạo ra bằng phương pháp theo điểm 21.

25. Cây con, hạt, hoặc bộ phận của cây ngô theo điểm 24, trong đó cây con, hạt, hoặc bộ phận của cây ngô chứa phân tử ADN chứa trình tự được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:1-8 và 10.

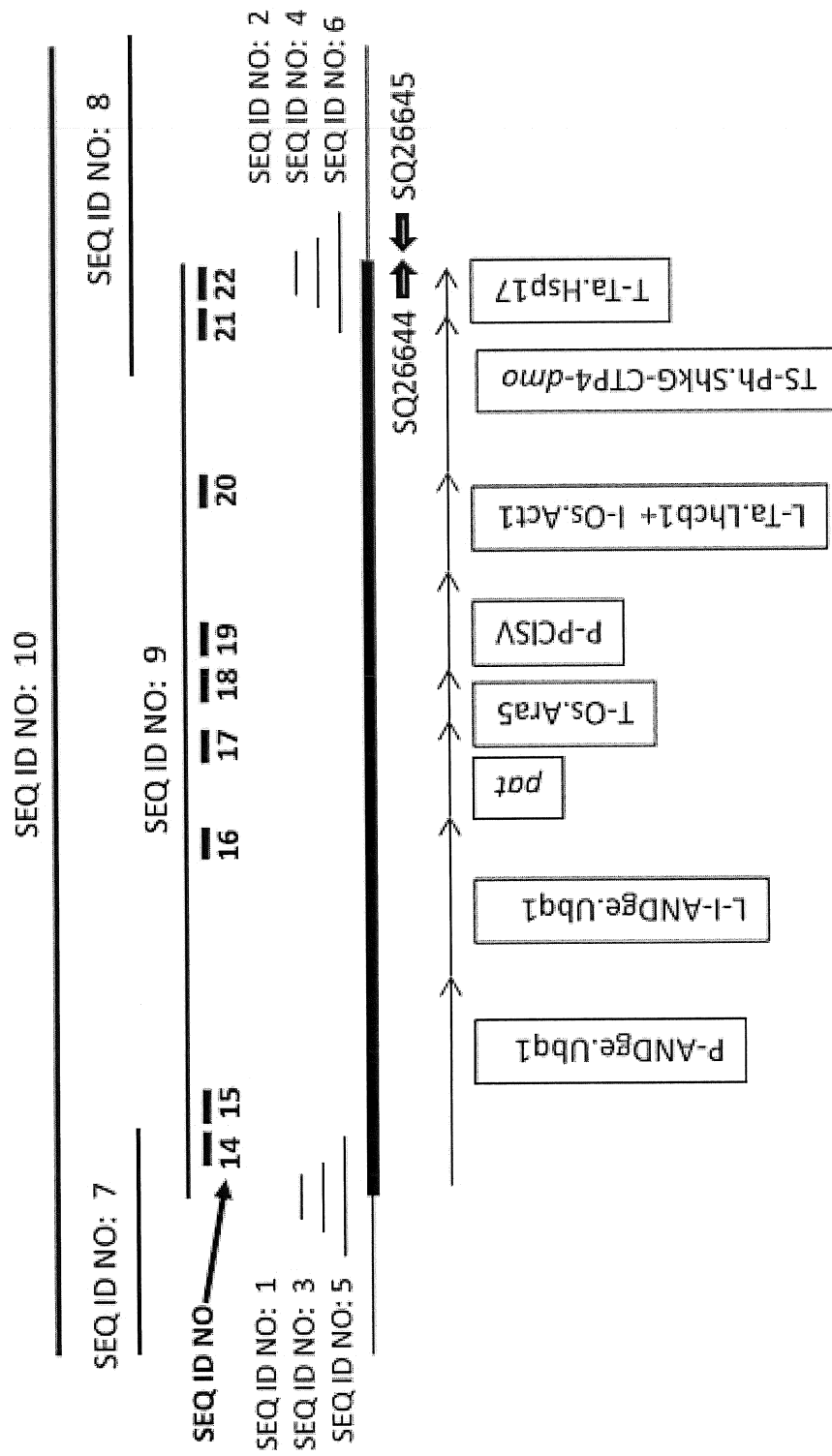


Fig. 1

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Monsanto Technology LLC

<120> PHÂN TỬ ADN TÁI TỔ HỢP, CÂY NGÔ CHUYỂN GEN CHỨA PHÂN TỬ ADN NÀY VÀ PHƯƠNG PHÁP TẠO RA CÂY NGÔ CHUYỂN GEN CÓ KHẢ NĂNG DUNG NẠP VỚI THUỐC DIỆT CỎ DICAMBA VÀ GLUFOSINAT

<130> MONS:362WO

<140> Chưa biết

<141> 2015-03-10

<150> 61/968,342

<151> 2014-03-20

<160> 22

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tái tổ hợp

<400> 1

caggtattga tgtgcgccag tcagcatcat

30

<210> 2

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tái tổ hợp

<400> 2

ttctttttct ccatagcatt cgcaatacag

30

<210> 3

<211> 60
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tái tổ hợp

<400> 3
 gcaggcggtc gctgccaggt attgatgtgc gccagtcagc atcatcacac caaaagtttag 60

<210> 4
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tái tổ hợp

<400> 4
 attggtatt actctttctt tttctccata gcattcgcaa tacagttaga tgcgagtgaa 60

<210> 5
 <211> 100
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tái tổ hợp

<400> 5
 aggggggggt tggcggggtg gcaggcggtc gctgccaggt attgatgtgc gccagtcagc 60
 atcatcacac caaaagtttag gcccgaatag tttgaaatta 100

<210> 6
 <211> 100
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tái tổ hợp

<400>	6	
catttttgaa ttgaaaaaa attggttaatt actctttctt tttctccata gcattcgcaa	60	
tacagttaga tgcgagtga gacagataag tcacaacat	100	
<210>	7	
<211>	1771	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Tái tổ hợp	
<400>	7	
gttgatattt tgacccaaag acatgccatt ctcatgttt tcagttttat cctaccaatg	60	
tagtaacca aacagtttaa ttacaagtga atcaactgga aacaagatct acagactgca	120	
cacagcacat taacaattct gcgccaaatg aatgacagag tgatttatag gcactaagct	180	
ggttttcatc atgaattttg atcagagcat aaacctgtt gacaacagaa tagaatcaaa	240	
caagctgctc agctcagatg gaccaaata atgaacgcg gcacagtata ttgaacaaa	300	
atagtgaacg cacagtagaa aacagacgga gaagctagtg cacactaaaa atagaactca	360	
ctgatgcatt ttttaaccgaa tcattaaaaa acagaccaac atgattagac cagctatcaa	420	
aagacacact gctgagaatc aacaactgct atatgtgtga tctacctgaa ataaacagat	480	
gcagtttttt gtccctacag accaactgtt tttaatcaga atgccaatga taaatcctta	540	
gagatctgga gagcaacta attaaccact gagaatcaac aactgctata atccttagag	600	
atctggagag cacactaatt aaccactgag cctctttggt cagcatgcag aaatcccaa	660	
aactatactg taattcgaaa ccataagcg cacatcaaag caactccatt gttgatggtt	720	
gggaatgtta aaaatatggt tgtggacacc aattgccgta acaaacca cagggagaac	780	
atgagtatga acaatcaaaa ctaacatgaa taagtggatg ttcagattaa gtaaggaaaa	840	
tggtgcacag attaagaaca gagcaatgta tagcacaagt ggaaattaca aacctttttt	900	
cacaaaatta caatctctag acagcacaca gcaagatctt ggaatggatg agggatgatga	960	

atcgggtgaaa aaagacagca cacagcaaga tctctagaac agaacatgaa atgttgaggaga 1020
 gtgggggatgg gttgtagacc taacctctgt ccattcctttt aatagccgtc gctgccaggt 1080
 atggaatagg gcgccgtgag tgccgtcgag ggcgcgcgca ggggcgcggg ttggtgtggg 1140
 cgggataccc ggcgcggtcg ggaaacccca cggcggtcat cacggcgagc cgggggaggg 1200
 gggggttggc ggggtggcag gcggtcgctg ccaggatttg atgtgcgcca gtcagcatca 1260
 tcacacaaaa agttaggccc gaatagtttg aaattagaaa gctcgcaatt gaggtctgtc 1320
 gaggaggtta acctaggtag tgaattaccc tgttatccct aactagatat cgaattctaa 1380
 ctataacggg cctaaggtag cgaatcggtc ttcttgccgc gccaaagacgc aaactcggac 1440
 cggttcaagc cgtcaaggca cttctatgca accacagtca acttgaatgc cgcttgagtg 1500
 ccttctcaag ttttttttctc ttgcaaaaat ctttcttttt ttttaaaaaa agtataattt 1560
 ggatcgtgca aatttctctc taggtgtgtg tgtgactgtg tgagtaacaa tttctctagt 1620
 tgtgcgcgac tgctgcttac tttggagatt acaatatctt tctaaaatgc ttcgattact 1680
 tatttataaa ccgtctctaa ggccaattgc tcaagattca ttcaacaatt gaaacgtctc 1740
 acatgattaa atcatataaa gtttctaagt c 1771

<210> 8

<211> 1767

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tái tổ hợp

<400> 8

gcgagtctga tgagacatct ctgtattgtg tttctttccc cagtgttttc tgtacttgtg 60
 taatcggcta atcgccaaca gattcggcga tgaataaatg agaaataaat tgttctgatt 120
 ttgagtgcaa aaaaaaagga attagatctg tgtgtgtttt ttggatcccc ggggcggccg 180
 cacaacaaac gaatacgtcc tgcttggcct actaggccaa cgcaggcgct ggccgtgacg 240

gccacgagcg aactgatatc gaattctagg gataacaggg taatccacgt gtagctaaac	300
gcgccctcat ctaagcccc atttgacgt gaatgtagac acgtcgaaat aaagatttcc	360
gaattagaat aatttgttta ttgctttcgc ctataaatac gacggatcgt aatttgtcgt	420
tttatcaaaa tgtactttca ttttataata acgctgcgga catctacatt tttgaattga	480
aaaaaaattg gtaattactc tttctttttc tccatagcat tcgcaatata gttagatgcg	540
agtgaagcac gataagtcac aaccataata catactatta gaatccggct ctttgccgag	600
tgcttttttt gggcactcgg caaagacttc tttaccggca aagtcctact ctcggtaacg	660
accacgttta ccgagagcag gacgctcggc acagggagac actcggcaaa gacctctttg	720
tcgagtgcca aacgctcggc aaagggccgt cagcagccgt ctatagcaga tgtttattat	780
ctttgccgag cgccaagcgt tggcactcgg caaaacaagt gttgccgagt gcttaaattg	840
gacactcggc aaaatatatt tttctttttt ctttttgcaa ccaaactttc tgtggtttgt	900
tcctacacta ttagacata catgttccat tttggcaca ttataaaagt gtttgctata	960
aatattagat tttgttcgtt taattgaatt ttctcggata attcagattt gaactacaag	1020
tcactcaaaa aatggaaaac catgaatgca aaaatgatat ccatgttatt tagcacaagt	1080
tacggccgat ttcaggagta gacccgaatt tttgagcacc atgctcacga aacatgactg	1140
tgaacttgtc atccagttgt tttaaaattg tataaaacac aaacaaaatc aaaaaatcat	1200
gaaacttgtc cacatgtcat gatatcatca tatgtagagg ttgtgataaa aagttgaaaa	1260
tatttcgtga aagttgtcca tagttcactg agcctctttg tcgagtgta cactcggcaa	1320
agcctttgtc gagtgcttca gacactcggc aaataagttg tttccagtag tgacattaat	1380
agaaaaagag tgcatagttc gttcacatag ctaactaatt ggttcattac aaagaaacat	1440
tagaacaagc ataatgatga cttggacata atgaaataaa atacataggt tgagggaacc	1500
aaacataatg gaacacagaa caaatagagg acaacatcat agaaaacgac ataacttcac	1560
atgggtttta cgccaattgc tccacgcaa gtccataagt gctcgatgag atcatgttga	1620

agttggttgt atcatttgag actagtgatg ttgtggtggg agcatagcca ctctgtacga 1680
 acttcagga ttgtgatgag agatccacgt gactccaat tgcggcaaac tcaacattac 1740
 ttgcacgtgg gaccttgtcc tcgacaa 1767

<210> 9
 <211> 6762
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tái tổ hợp

<400> 9
 gccagtcagc atcatcacac caaaagttag gcccgatag tttgaaatta gaaagctcgc 60
 aattgaggtc tgctgaggag gttaacctag gtactgaatt accctgttat ccctaactag 120
 atatcgaatt ctaactataa cggtcctaag gtagcgaatc gttcttcttg gcgcgccaag 180
 acgcaaactc ggaccggttc aagccgtcaa ggcaattcta tgcaaccaca gtcaacttga 240
 atgccgcttg agtgccttct caagtttttt tttcttgcaa aaatcatttc ttttttttaa 300
 aaaaagtata atttgatcg tgcaaatttc tctctagggtg tgtgtgtgac tgtgtgagta 360
 acaatttctc tagttgtgcg cgactgctgc ttactttgga gattacaata tctttctaaa 420
 atgcttcgat tacttattta taaaccgtct ctaaggccaa ttgctcaaga ttcatcacaac 480
 aattgaaacg tctcacatga ttaaatacata taaagtttct aagtcttggt tgacaagatt 540
 tttttagatt ttcattctaaa ttggatgaaa ctatcaaaca ctaattttta aaaatataag 600
 agaagctccg gagataaaag gtcgtctatg ttattataag agtaaagtcg tctattctct 660
 tcgtcccaac atatataatt ctaagcatga attgctttct ttttgacaa aaggagcatg 720
 ccacaacaca agaatgatgt caccgtcatg cttggatcct tttatggtta agcttcacct 780
 tctataatct aacaatagag aaatcagga aaaatcatgt tttggttggt tttatttcta 840
 acctccacaa taactttggt ttaccatttt ttgtttgatt ttagtttttag agaagcgttt 900

ataacaggac ctaaaatctt ttttcagtac acagtacaac gcagacgctc atacacgcac	960
gcacactcac ctctatgaac acacgtaaga aaaccctaca ctttgagcac cttcgaagga	1020
ctgagccggt aaatatagag attctcgaag tcactattag cgctctggtg tcaacgggaa	1080
tgctgcttac cacttaaagc ataacgccga gaaatcccgt aataaatcca gtaaaatacg	1140
agcaccctg ccaagttgaa tatttgaacc cgagtgggta gattccaccg caaaggacct	1200
aaccagatca tttcgcaaac aggaactaaa atcggtagag agcccagaca aaagcctttc	1260
ctaagagcca ctccagtga agcccctact ttaggtataa aatgcaatac tagtggggct	1320
cctaaataaa cttctatctt tcatggcctt ctaaaattca ctcccaaacc cctagctata	1380
gaagtctctt atccatcctc taaataaaaa tgggagtcta ttttatttca ccagagtga	1440
tcgtaaattt agtctctcaa attttataag ttgagggtag aggatgactg gagttgctct	1500
aaacggacct atcttcaagt gacctcagt agcccgttta acggcgtcga caagttaat	1560
ctaacggaca ccaaccagag aagagaacca ccgccagcgc cgagccaagc gacgttgaca	1620
tcttggcgcg gcacggcatc tccctggcgt ctggccccct ctcgagactt ccgctccacc	1680
tcccaccggt ggcggtttcc aagtccgttc cgctctctct cacacggcac gaaaccgtga	1740
cgggcaccgg cagcacgggg ggattccttt cccaccgctc cttccctttc cttcctctc	1800
ccgccgctat aaatagccag ccccatcccc agcttctttc cccaacctca tcttctctcg	1860
tgttggtcgg cacaaccga tcgatcccca actccctcgt cgtctctcct cgcgagcctc	1920
gtcgatcccc cgcttcaagg tacggcgatc gattatcttc cctctctcta ctttctctct	1980
cttatagggc ctgctagctc tggtcctggt tttccatggc tgcgaggtag aatagatcgg	2040
cgatccatgg ttagggcctg ctagtgtgtg tcctgttttt ccatggctgc gaggcacaat	2100
agatctgatg gcgttatgat ggttaacttg tcatactctt gcgatctatg gtccctttag	2160
gagtttagga catctattta atttcggata gttcgagatc tgtgatccat ggtagtacc	2220
ctaggcagtg gggttagatc cgtgctgtta tggttcgtag atggattctg attgctcagt	2280

aactgggaat cctgggatgg ttctagctgg ttcgcagata agatcgattt catgatatgc	2340
tatatcttgt ttggttgccg tggttccgtt aaatctgtct gttatgatct tagtcttga	2400
taaggttcgg tcgtgctagc tacgtcctgt gcagcactta attgtcaggt cataattttt	2460
agcatgcctt ttttttattg gtttggtttt gtctgactgg gctgtagata gtttcaatct	2520
ttgtctgact gggctgtaga tagtttcaat ctacctgtcg gtttatttta ttaaatttgg	2580
atctgtatgt gtgtcatata tcttcatctt ttagatatat cgataggttt atatgttgct	2640
gtcggttttt tactgttcct ttatgagata tattcatgct tagatacatg aaacaacgtg	2700
ctgttacagt ttaatagttc ttgtttatct aataaacaaa taaggatagg tatatgctgc	2760
agttagtttt actggtactt tttttgacat gaacctacgg cttaataatt agtcttcac	2820
aaataaaaag catatttttt aattatttcg atatacttga atgatgtcat atgcagcatc	2880
tgtgtgaatt tttggccctg tcttcatatg ctgtttattt gtttgggact gtttctttgg	2940
ttgataactc atcctgttgt ttggtgatcc ttttgcaggt gcaaccatgt ctccggagag	3000
gagaccagtt gagattaggc cagctacagc agctgatatg gccgcggttt gtgatatcgt	3060
taaccattac attgagacgt ctacagtga ctttaggaca gagccacaaa caccacaaga	3120
gtggattgat gatctagaga ggttgcaaga tagataccct tggttggttg ctgaggttga	3180
gggtgttgtg gctggtattg cttacgctgg gccctggaag gctaggaacg cttacgattg	3240
gacagttgag agtactgttt acgtgtcaca taggcatcaa aggttgggccc taggatccac	3300
attgtacaca catttgctta agtctatgga ggcgcaaggt ttttaagtctg tggttgctgt	3360
tataggcctt ccaaacgac catctgttag gttgcatgag gctttgggat acacagccc	3420
gggtacattg cgcgcagctg gatacaagca tgggtggatgg catgatgttg gtttttggca	3480
aagggatttt gagttgccag ctctccaag gccagttagg ccagttaccc agatctgatt	3540
aattaactag gctactgtag ctagctgtgc atgtatgtgg tgtggttact aaaataatta	3600
gtgttttcct tttgtttgga agcatatgtg tggatgaata atgatgaact ccgatgttcc	3660

tctctataaa tcttgatgat tcgctagcta tccgtacgtc gttgttcttt gatttgatga	3720
tgagattgaa aaatggaatg tcatgctaag gagggtgccg cggcccggcc gtgacggcca	3780
cgagcgaact cctgcaggac aacggagcag cctcctcagc aaatcctacc acctcattta	3840
aatagagtga ggttgatttg ctgaggtagc ggccgcgtta acaagcttct gcagaattcg	3900
tcaacgagat cttgagccaa tcaaagagga gtgatgtaga cctaaagcaa taatggagcc	3960
atgacgtaag ggcttacgcc catacgaaat aattaaaggc tgatgtgacc tgtcgggtctc	4020
tcagaacctt tactttttat gtttggcgtg tattttttaa tttccacggc aatgacgatg	4080
tgaccaacg agatcttgag ccaatcaaag aggagtgatg tagacctaaa gcaataatgg	4140
agccatgacg taagggttta cgcccatacg aaataattaa aggctgatgt gacctgtcgg	4200
tctctcagaa cttttacttt ttatatattg cgtgtatttt taaatttcca cggcaatgac	4260
gatgtgacct gtgcatccgc tttgcctata aataagtttt agtttgtatt gatcgacacg	4320
gtcgagaaga cacggccatt ctagaacctt cttccacaca ctcaagccac actattggag	4380
aacacacagg gacaacacac cataagatcc aagggaggcc tccgccgccg ccggtaacca	4440
ccccgcccct ctctcttttc tttctccgtt tttttttccg tctcgggtctc gatctttggc	4500
cttggtagtt tgggtgggcg agaggcggct tcgtgcgcgc ccagatcggg gcgcggggagg	4560
ggcgggatct cgcggtggg gctctcgccg gcgtggatcc ggcccggatc tcgcggggaa	4620
tggggctctc ggatgtagat ctgcgatccg ccgttgttgg gggagatgat ggggggttta	4680
aaatttccgc cgtgctaaac aagatcagga agaggggaaa agggcactat ggtttatatt	4740
tttatatatt tctgctgctt cgtcaggctt agatgtgcta gatctttctt tcttcttttt	4800
gtgggtagaa tttgaatccc tcagcattgt tcatcggtag tttttctttt catgatttgt	4860
gacaaatgca gcctcgtgcg gagctttttt gtaggtagaa gtgatcaacc atggcccaga	4920
tcaacaacat ggcccagggc atccagacct tgaaccctaa ctctaacttc cacaagccgc	4980
aagtgcccaa gtctagctcc ttctcgtgt tcggctccaa gaagctcaag aatagcgcca	5040

attccatgct ggtcctgaag aaagactcga ttttcatgca gaagttctgc tcctttcgca	5100
tcagtgcctt ggttgcgact gcctgcatgc tcaccttctg taggaacgcc tggtagctcg	5160
ccgctctccc tgaggagctg agcgagaagc ctttgggtcg caccatccta gacactccgt	5220
tagcccttta ccgccagcct gacggcgtag tggcggccct gcttgacatc tgcccgcata	5280
ggttcgctcc gctcagcgac ggcacacctg tcaacgggca ttttcagtgc ccgtaccacg	5340
ggctggaatt tgacggcggg gggcagtggt tccacaacc gcacggcaac ggcgcacggc	5400
cagcttccct caacgttagg tcgttccctg ttgtcgagcg cgacgcactg atctggatct	5460
ggcctggcga ccagctctg gccgatccag gagccattcc cgacttcggt tgccgcgtgg	5520
accagccta tcggacgggc ggcgggttac ggcacgtcga ttgtaactat aagctccttg	5580
tggacaacct tatggatttg ggccacgctc agtacgtgca ccgggctaac gctcagactg	5640
acgcctttga ccgtctcgaa agggaggtca tcgtcggcga cggagagatt caggcgctga	5700
tgaagatccc tggaggcacg ccctctgtgc tcatggcgaa gtttctcaga ggcgcgaaca	5760
cgcccgtgga cgcctggaac gacatccgct ggaataaggt ctccgcgatg ctgaacttca	5820
tcgccgttgc gcccgagggc acacccaaag agcagtcaat ccacagcaga gggacccata	5880
ttcttacacc ggaaaccgag gctagtggcc actacttctt cggctcgtca cggaatttcg	5940
ggatagacga tccggagatg gacggtgttc ttcgatcttg gcaagcgcaa gctctcgtca	6000
aggaagataa ggtggtcgtg gaggctatcg agcgtaggcg cgcctacgtt gaggcgaacg	6060
gtattaggcc cgcgatgctg tcctgcgacg aggccgcagt tagagtgtcg cgcgagatag	6120
aaaagctgga gcagctagag gccgcctgag gtaccgagct cgtcaatcac tagtgaattc	6180
tgcattgcgt tggacgtatg ctcatcagg ttggagccaa tttggttgat gtgtgtgcga	6240
gttcttgca gtctgatgag acatctctgt attgtgtttc tttccccagt gttttctgta	6300
cttgtgtaat cggctaatacg ccaacagatt cggcgatgaa taaatgagaa ataaattgtt	6360
ctgattttga gtgcaaaaaa aaaggaatta gatctgtgtg tgttttttgg atccccgggg	6420

cggccgcaca acaaacgaat acgtcctgct tggcctacta ggccaacgca ggcgctggcc 6480
 gtgacggcca cgagcgaact gatatcgaat tctagggata acagggtaat ccacgtgtag 6540
 ctaaacgcgc cctcatctaa gccccattt ggacgtgaat gtagacacgt cgaaataaag 6600
 atttccgaat tagaataatt tgtttattgc tttcgcctat aaatacgacg gatcgtaatt 6660
 tgtcgtttta tcaaaatgta ctttcatttt ataataacgc tgcggacatc tacatttttg 6720
 aattgaaaaa aaattggtaa ttactctttc tttttctcca ta 6762

<210> 10
 <211> 9259
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tái tổ hợp

<400> 10
 gttgatattt tgacccaaag acatgccatt ctcattgttt tcagttttat cctaccaatg 60
 tagtaaccba aacagtttaa ttacaagtga atcaactgga aacaagatct acagactgca 120
 cacagcacat taacaattct gcgccaaatg aatgacagag tgatttatag gcactaagct 180
 ggttttcatc atgaattttg atcagagcat aaacctgtgt gacaacagaa tagaatcaaa 240
 caagctgctc agctcagatg gaccaaata atgaacgcgc gcacagtata ttgaacaaa 300
 atagtgaacg cacagtagaa aacagacgga gaagctagtg cactactaaa atagaactca 360
 ctgatgcatt ttaaccgaa tcattaaaaa acagaccaac atgattagac cagctatcaa 420
 aagacacact gctgagaatc aacaactgct atatgtgtga tctacctgaa ataaacagat 480
 gcagtttttt gtccctacag accaactgtt ttaatcaga atgccaatga taaatcctta 540
 gagatctgga gagcaacta attaaccact gagaatcaac aactgctata atccttagag 600
 atctggagag cactactaatt aaccactgag cctctttggt cagcatgcag aaatcccaa 660
 aactatactg taattcgaaa ccataagcg cacatcaaag caactccatt gttgatggtt 720

gggaatgtta aaaatatggt tgtggacacc aattgccgta aacaaacca cagggagaac	780
atgagtatga acaatcaaaa ctaacatgaa taagtggatg ttcagattaa gtaaggaaaa	840
tggtgcacag attaagaaca gagcaatgta tagcacaagt ggaaattaca aacctttttt	900
cacaaaatta caatctctag acagcacaca gcaagatcctt ggaatggatg agggatgatga	960
atcggtgaaa aaagacagca cacagcaaga tctctagaac agaacatgaa atgttggaga	1020
gtggggatgg gttgtagacc taacctctgt ccatcctttt aatagccgtc gctgccaggt	1080
atggaatagg gcgccgtgag tgccgtcgag ggcgcgcgca ggggcgcggt ttggtgtggg	1140
cgggataccc ggcgcggtcg ggaaacccca cggcgggtcat cacggcgagc cgggggaggg	1200
gggggttggc ggggtggcag gcggtcgctg ccaggatttg atgtgcgcca gtcagcatca	1260
tcacacaaaa agttaggccc gaatagtttg aaattagaaa gctcgcaatt gaggtctgtc	1320
gaggaggtta acctaggtac tgaattaccc tgttatccct aactagatat cgaattctaa	1380
ctataacggt cctaaggtag cgaatcgttc ttcttggcgc gccaaagacgc aaactcggac	1440
cggttcaagc cgtcaaggca cttctatgca accacagtca acttgaatgc cgcttgagtg	1500
ccttctcaag tttttttttc ttgcaaaaat catttctttt ttttaaaaaa agtataattt	1560
ggatcgtgca aatttctctc taggtgtgtg tgtgactgtg tgagtaacaa tttctctagt	1620
tgtgcgcgac tgctgcttac tttggagatt acaatatctt tctaaaatgc ttcgattact	1680
tatttataaa ccgtctctaa ggccaattgc tcaagattca ttcaacaatt gaaacgtctc	1740
acatgattaa atcatataaa gtttctaagt cttgtttgac aagatTTTTT tagatTTTca	1800
tctaaattgg atgaaactat caaacactaa ttttaaaaaa tataagagaa gctccggaga	1860
taaaaggtcg tctatgttat tataagagta aagtcgtcta ttctcttcgt cccaacatat	1920
ataattctaa gcatgaattg ctttcttttt ggacaaaagg agcatgccac aacacaagaa	1980
tgatgtcacc gtcatgcttg gatcctttta tggtaaagct tcaccttcta taatctaaca	2040
atagagaaat cagggaaaaa tcatgttttg gttgttttta tttctaacct ccacaataac	2100

tttggtttac cattttttgt ttgatttttag ttttagagaa gcgtttataa caggacctaa	2160
aatctttttt cagtacacag tacaacgcag acgctcatac acgcacgcac actcacctct	2220
atgaacacac gtaagaaaac cctacacctt gagcaccttc gaaggactga gccggtaaat	2280
atagagattc tcgaagtcac tatttagcgcc tcgttggtcaa cgggaatgtc gcttaccact	2340
taaagcataa cgccgagaaa tcccgtataa aatccagtaa aatacgagca cccgtgccaa	2400
gttgaatatt tgaacccgag tgggtagatt ccaccgcaaa ggacctaacc agatcatttc	2460
gcaaacagga actaaaatcg gtagagagcc cagacaaaag cctttcctaa gagccactcc	2520
agtggaagcc cctacttttag gtataaaatg caatactagt ggggctccta aataaacttc	2580
tatttttcat ggccttctaa aattcactcc caaaccctta gctatagaag tctcttatcc	2640
atcctctaaa taaaaatggg agtctatttt atttcaccag agttgatcgt aaatttagtc	2700
tctcaaattt tataagttga gggtagagga tgactggagt tgctctaaac ggacctatct	2760
tcaagtgacc tcagtgagcc cgtttaacgg cgtcgacaag tttaatctaa cggacaccaa	2820
ccagagaaga gaaccaccgc cagcgccgag ccaagcgacg ttgacatctt ggcgcggcac	2880
ggcatctccc tggcgtctgg cccctctcg agacttccgc tccacctccc accggtggcg	2940
gtttccaagt ccgttccgcc tcctctcaca cggcacgaaa ccgtgacggg caccggcagc	3000
acgggggggat tcctttccca ccgctccttc cttttccctt cctctcccgc cgctataaat	3060
agccagcccc atccccagct tctttccca acctcatctt ctctcgtgtt gttcggcaca	3120
acccgatcga tcccaactc cctcgtcgtc tctcctcgcg agcctcgtcg atccccgct	3180
tcaaggtagc gcgatcgatt atcttccctc tctctacctt ctctctctta tagggcctgc	3240
tagctctgtt cctgtttttc catggctgcg aggtacaata gatcggcgat ccatggtag	3300
ggcctgctag ttgtgttcct gtttttccat ggctgcgagg cacaatagat ctgatggcgt	3360
tatgatgggt aactgtcat actcttgcga tctatgttcc ctttaggagt ttaggacatc	3420
tatttaattt cggatagttc gagatctgtg atccatgggt agtaccctag gcagtggggt	3480

tagatccgtg ctgttatggt tcgtagatgg attctgattg ctcagtaact gggaatcctg	3540
ggatggttct agctggttcg cagataagat cgatttcatg atatgctata tcttgtttgg	3600
ttgccgtggt tccgttaaatt ctgtctgtta tgatcttagt ctttgataag gttcggctgt	3660
gctagctacg tcctgtgcag cacttaattg tcaggtcata attttttagca tgcctttttt	3720
ttattggttt ggttttgtct gactgggctg tagatagttt caatctttgt ctgactgggc	3780
tgtagatagt ttcaatctac ctgtcggttt attttattaa atttgatct gtatgtgtgt	3840
catatatctt catcttttag atatatcgat aggtttatat gttgctgtcg gttttttact	3900
gttcctttat gagatatatt catgcttaga tacatgaaac aacgtgctgt tacagtttaa	3960
tagttcttgt ttatctaata aacaaataag gataggtata tgctgcagtt agttttactg	4020
gtactttttt tgacatgaac ctacggctta ataattagtc ttcatcaaat aaaaagcata	4080
ttttttaatt atttcgatat acttgaatga tgtcatatgc agcatctgtg tgaatttttg	4140
gccctgtctt catatgctgt ttatttgttt gggactgttt ctttggttga taactcatcc	4200
tgttgtttgg tgatcctttt gcaggtgcaa ccatgtctcc ggagaggaga ccagttgaga	4260
ttaggccagc tacagcagct gatatggccg cggtttgtga tatcgttaac cattacattg	4320
agacgtctac agtgaacttt aggacagagc cacaaacacc acaagagtgg attgatgatc	4380
tagagagggt gcaagataga tacccttggt tggttgctga ggttgagggg gttgtggctg	4440
gtattgctta cgctgggccc tggaaggcta ggaacgctta cgattggaca gttgagagta	4500
ctgtttacgt gtcacatagg catcaaagg tgggcctagg atccacattg tacacacatt	4560
tgcttaagtc tatggaggcg caaggtttta agtctgtggt tgctgttata ggccttccaa	4620
acgatccatc tgtaggttg catgaggctt tgggatacac agcccggggg acattgcgcg	4680
cagctggata caagcatggt ggatggcatg atgttggtt ttggcaaagg gattttgagt	4740
tgccagctcc tccaaggcca gttaggccag ttaccagat ctgattaatt aactaggcta	4800
ctgtagctag ctgtgcatgt atgtggtgtg gttactaaaa taattagtgt tttccttttg	4860

tttggagca tatgtgtggt gaataaatga tgaactccga tgttcctctc tataaatctt	4920
gatgattcgc tagctatccg tacgtcgttg ttctttgatt tgatgatgag attgaaaaat	4980
ggaatgtcat gctaaggagg gtgccgcggc ccggccgtga cggccacgag cgaactcctg	5040
caggacaacg gagcagcctc ctcagcaaat cctaccacct catttaaata gagtgagggt	5100
gatttgctga ggtagcggcc gcgttaacaa gcttctgcag aattcgtcaa cgagatcttg	5160
agccaatcaa agaggagtga tgtagaccta aagcaataat ggagccatga cgtaagggct	5220
tacgcccata cgaaataatt aaaggctgat gtgacctgtc ggtctctcag aacctttact	5280
ttttatgttt ggcgtgtatt tttaaatttc cacggcaatg acgatgtgac ccaacgagat	5340
cttgagccaa tcaaagagga gtgatgtaga cctaaagcaa taatggagcc atgacgtaag	5400
ggcttacgcc catacgaaat aattaaaggc tgatgtgacc tgtcggctctc tcagaacctt	5460
tactttttat atttggcgtg tattttttaa tttccacggc aatgacgatg tgacctgtgc	5520
atccgctttg cctataaata agttttagtt tgtattgatac gacacggtcg agaagacacg	5580
gccattctag aaccatcttc cacacactca agccacacta ttggagaaca cacagggaca	5640
acacaccata agatccaagg gaggcctccg ccgccgccgg taaccacccc gccctctcc	5700
tctttctttc tccgtttttt tttccgtctc ggtctcgatc tttggccttg gtagtttggg	5760
tgggcgagag gcggcttcgt gcgcgcccag atcggtgcg cggaggggag ggatctcgcg	5820
gctggggctc tcgccggcgt ggatccggcc cggatctcgc ggggaatggg gctctcgat	5880
gtagatctgc gatccgccgt tgttggggga gatgatgggg ggtttaaaat ttccgccgtg	5940
ctaaacaaga tcaggaagag gggaaaagg cactatggtt tatattttta tatatttctg	6000
ctgcttcgtc aggccttagat gtgctagatc tttctttctt ctttttggg gtagaatttg	6060
aatccctcag cattgttcat cggtagtttt tcttttcatg atttgtgaca aatgcagcct	6120
cgtgcggagc tttttttag gtagaagtga tcaacatgg cccagatcaa caacatggcc	6180
cagggcatcc agaccctgaa ccctaactct aacttcaca agccgcaagt gcccaagtct	6240

agctccttcc tcgtgttcgg ctccaagaag ctcaagaata gcgccaattc catgctggtc	6300
ctgaagaaag actcgatctt catgcagaag ttctgctcct ttcgcatcag tgcttcggtt	6360
gcgactgcct gcatgctcac cttcgttagg aacgcctggg acgtcgccgc tctccctgag	6420
gagctgagcg agaagccctt gggtcgcacc atcctagaca ctccgttagc cctttaccgc	6480
cagcctgacg gcgtagtggc ggccctgctt gacatctgcc cgcatagggt cgctccgctc	6540
agcgacggca tcctcgtcaa cgggcatctt cagtgcccg accacgggct ggaatttgac	6600
ggcgggtggc agtgtgtcca caaccgcac ggcaacggcg cacggccagc ttccctcaac	6660
gtaggtcgt tccctgttgt cgagcgcgac gactgatct ggatctggcc tggcgaccca	6720
gctctggccg atccaggagc cattcccgc ttcggttgcc gcgtggaccc agcctatcgg	6780
acggtcggcg gttacgggca cgtcgattgt aactataagc tccttgtgga caacctatg	6840
gatttgggcc acgctcagta cgtgcaccgg gctaacgctc agactgacgc ctttgaccgt	6900
ctcgaaaggg aggtcatcgt cggcgacgga gagattcagg cgctgatgaa gatccctgga	6960
ggcacgccct ctgtgctcat gggaagttt ctgagaggcg cgaacacgcc cgtggacgcc	7020
tggaacgaca tccgctggaa taaggtctcc gcgatgctga acttcatcgc cgttgcgccc	7080
gagggcacac ccaaagagca gtcaatccac agcagaggga cccatattct tacaccggaa	7140
accgaggcta gttgccacta cttcttcggc tcgtcacgga atttcgggat agacgatccg	7200
gagatggacg gtgttcttcg atcttgcaa gcgcaagctc tcgtcaagga agataagtg	7260
gtcgtggagg ctatcgagcg taggcgcgcc tacgttgagg cgaacggtat taggcccgcg	7320
atgctgtcct gcgacgaggc cgagttaga gtgtcgcgcg agatagaaaa gctggagcag	7380
ctagaggccg cctgaggtag cgagctcgtc aatcactagt gaattctgca tgcgtttgga	7440
cgtatgctca ttcaggttgg agccaatttg gttgatgtgt gtgcgagttc ttgcgagtct	7500
gatgagacat ctctgtattg tgtttctttc ccagtggtt tctgtacttg tgtaatcggc	7560
taatcgccaa cagattcggc gatgaataaa tgagaaataa attgttctga ttttgagtgc	7620

aaaaaaaaag gaattagatc tgtgtgtgtt ttttgatcc ccggggcggc cgcacaacaa	7680
acgaatacgt cctgcttggc ctactaggcc aacgcaggcg ctggccgtga cggccacgag	7740
cgaactgata tcgaattcta gggataacag ggtaatccac gtgtagctaa acgcgccctc	7800
atctaagccc ccatttggac gtgaatgtag acacgtcgaa ataaagattt ccgaattaga	7860
ataatttggt tattgctttc gcctataaat acgacggatc gtaatttgct gttttatcaa	7920
aatgtacttt catTTTTATAA taacgctgcg gacatctaca tttttgaatt gaaaaaaaaat	7980
tggttaattac tctttctttt tctccatagc attcgcaata cagtttagatg cgagtgaagc	8040
acgataagtc acaaccataa tacatactat tagaatccgg ctctttgccg agtgcttttt	8100
ttgggcactc ggcaaagact tctttaccgg caaagtccta ctctcggtaa cgaccacgtt	8160
taccgagagc aggacgctcg gtacagggag acactcggca aagacctctt tgtcgagtgc	8220
caaacgctcg gcaaagggcc gtcagcagcc gtctatagca gatgtttatt atctttgccg	8280
agcgccaagc gttggcactc ggcaaaacaa gtgttgccga gtgcttaaat tggacactcg	8340
gcaaaatata tttttctttt ttctttttgc aaccaaactt tctgtggttt gttcctacac	8400
tatgtagaca tacatgttcc attttggcac aattataaaa gtgtttgcta taaatattag	8460
attttgttcg ttttaattgaa ttttctcgga taattcagat ttgaactaca agtcactcaa	8520
aaaatggaaa accatgaatg caaaaatgat atccatgtta tttagcacia gttacggccg	8580
atttcaggag tagacccgaa tttttgagca ccatgctcac gaaacatgac tgtgaacttg	8640
tcatccagtt gttttaaaat tgtataaaac acaaacaaaa tcaaaaaatc atgaaacttg	8700
tccacatgtc atgatatcat catatgtaga ggttgtgata aaaagttgaa aatatttcgt	8760
gaaagttgtc catagtccac tgagcctctt tgtcgagtgt cacactcggc aaagcctttg	8820
tcgagtgcct cagacactcg gcaaataagt tgtttccagt agtgacatta atagaaaaag	8880
agtgcatagt tcgttcacat agctaactaa ttggttcatt acaaagaaac attagaacaa	8940
gcataatgat gacttggaca taatgaaata aaatacatag gttgagggaa ccaaacataa	9000

tggaacacag aacaaataga ggacaacatc atagaaaacg acataacttc acatggggtt 9060
 tacgccaatt gctccacgcc aagtcataa gtgctcgatg agatcatgtt gaagttgggt 9120
 gtatcatttg agactagtga tgttggtggtg ggagcatagc cactctgtac gaacttcagg 9180
 gattgtgatg agagatccac gtgcactcca attgctggca actcaacatt acttgcacgt 9240
 gggaccttgt cctcgacaa 9259

<210> 11
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tái tổ hợp

<400> 11
 gaattgaaaa aaaattggta attactcttt ctt 33

<210> 12
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tái tổ hợp

<400> 12
 atcgtgcttc actcgcatct aact 24

<210> 13
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tái tổ hợp

<400> 13
 ctccatagca ttcgcaata 19

<210> 14
 <211> 81
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tái tổ hợp

<400> 14
 attagaaagc tcgcaattga ggtctgtcga ggagggttaac ctaggtactg aattaccctg 60
 ttatccctaa ctagatatcg a 81

<210> 15
 <211> 61
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tái tổ hợp

<400> 15
 tggcgcgccca agacgcaaac tcggaccggt tcaagccgtc aaggcacttc tatgcaacca 60
 c 61

<210> 16
 <211> 59
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tái tổ hợp

<400> 16
 atcctgttgt ttggtgatcc ttttgcaggt gcaaccatgt ctccggagag gagaccagt 59

<210> 17
 <211> 56
 <212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tái tổ hợp

<400> 17

ccagtttaggc cagttacca gatctgatta attaactagg ctactgtagc tagctg 56

<210> 18

<211> 99

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tái tổ hợp

<400> 18

aaaaatggaa tgtcatgcta aggaggggtgc gcgggcccg ccgtgacggc cacgagcgaa 60

ctcctgcagg acaacggagc agcctcctca gcaaatacct 99

<210> 19

<211> 56

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tái tổ hợp

<400> 19

tgaggttgat ttgctgaggt agcggccgcg ttaacaagct tctgcagaat tcgtca 56

<210> 20

<211> 55

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tái tổ hợp

<400> 20

aggtagaagt gatcaaccat ggcccagatc aacaacatgg cccagggcat ccaga 55

<210> 21
 <211> 91
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tái tổ hợp

<400> 21
 cgcgagatag aaaagctgga gcagctagag gccgcctgag gtaccgagct cgtcaatcac 60
 tagtgaattc tgcattgcgtt tggacgtatg c 91

<210> 22
 <211> 67
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tái tổ hợp

<400> 22
 ctagggataa cagggtaatc cacgtgtagc taaacgcgcc ctcatctaag ccccatcttg 60
 gacgtga 67