



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ
(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ
(51)^{2020.01} A01H 1/04; C12N 15/82; C12Q 1/68; (13) B
A01H 5/00



1-0045021

(21) 1-2020-06751 (22) 03/09/2014
(62) 1-2016-01146
(86) PCT/EP2014/002386 03/09/2014 (87) WO 2015/032494 12/03/2015
(30) 10 2013 014 637.2 04/09/2013 DE; 10 2014 005 823.9 24/04/2014 DE
(45) 25/04/2025 445 (43) 26/04/2021 397A
(71) 1. KWS SAAT SE (DE)
BDT-LIP, Grimsehlstrasse 31, 37555 Einbeck, Germany
2. Universität Zürich (CH)
Rämistr. 71, CH-8006 Zürich, Switzerland
(72) OUZUNOVA, Milena (DE); SCHEUERMANN, Daniela (DE); KELLER, Beat
(CH); KRATTINGER, Simon (CH); WICKER, Thomas (CH); HERREN, Gerhard
(CH); HURNI, Severine (CH); KESSEL, Bettina (DE); PRESTERL, Thomas (DE);
KNAACK, Carsten (DE).
(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) PHƯƠNG PHÁP NHẬN BIẾT CÂY NGÔ KHÁNG HELMINTHOSPORIUM
TURCICUM

(21) 1-2020-06751

(57) Sáng chế đề xuất cây ngô kháng *Helminthosporium turcicum* và các phần của cây ngô này. Sáng chế cũng đề xuất phương pháp nhận biết cây ngô kháng *Helminthosporium turcicum*, cũng như phương pháp làm tăng năng suất của cây ngô kháng *H. turcicum*.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến lĩnh vực biến đổi cây bằng cách sử dụng các phương pháp sinh học phân tử và công nghệ chỉ thị, cùng với kỹ thuật thiết kế di truyền. Sáng chế đề cập đến cây có tính kháng *Helminthosporium turcicum*, cụ thể là cây ngô chứa polynucleotit có một hoặc nhiều gen truyền tính kháng trên đoạn nhiễm sắc thể cải biến từ giống Pepitilla đăng ký, cũng như tế bào, mô, phần, hạt và hạt giống của nó, polynucleotit được phân lập chứa một hoặc nhiều gen truyền tính kháng *Helminthosporium turcicum*, vectơ, tế bào cây chuyển gen và cây chuyển gen chứa polynucleotit này. Sáng chế cũng bao gồm chỉ thị phân tử thích hợp và ứng dụng của chúng để đưa locus kháng hoặc gen chuyển vào cây, cũng như nhận biết các cây ngô cải tiến chứa đoạn nhiễm sắc thể cải biến.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Ở cây ngô (*Zea mays* L.), có một lượng tác nhân gây bệnh nấm lớn gây bệnh cho lá. Loại nấm có thể gây thiệt hại nhiều nhất trong điều kiện khí hậu nhiệt đới cũng như khí hậu ôn đới, như các điều kiện khí hậu ở phần lớn châu Âu và Bắc Mỹ cũng như ở châu Phi và Ấn Độ, được biết đến là *Helminthosporium turcicum* hay còn gọi là bệnh đốm lá (*Exserohilum turcicum*) (Pass.) Leonard and Suggs (teleomorph: *Setosphaeria turcica* (Luttrell) Leonard & Suggs). *H. turcicum* là nguyên nhân gây bệnh đốm lá được biết đến là “bệnh đốm lá to ở ngô” (Northern Corn Leaf Blight - NCLB), mà có thể xuất hiện ở tầm cỡ dịch bệnh vào các năm mưa nhiều, tấn công các giống ngô dễ bị gây hại và gây thiệt hại lớn và làm giảm năng suất đáng kể 30% và cao hơn trên diện rộng (Perkins & Pedersen, 1987; Raymundo & Hooker, 1981a; Ullstrup & Miles, 1957). Từ sau những năm 1970 thì tính kháng tự nhiên trong vật liệu di truyền đã được tìm kiếm. Hiện nay, đã biết về tính kháng theo định lượng và theo định tính. Mặc dù tính kháng định lượng di truyền một gen và nhiều gen xuất hiện chưa đầy đủ và không đặc hiệu ở kiểu hình theo nòi và bị ảnh hưởng bởi các gen bổ sung và các gen trội một phần, nhưng tính kháng theo định tính thường vẫn đặc hiệu nòi và có thể được di truyền thông qua các gen đơn lẻ, chủ yếu là các gen trội như *Ht1*,

Ht2, *Ht3*, *Htm1* hoặc *Htn1* (Lipps *et al.*, 1997; Welz & Geiger, 2000). Việc lai ngược dòng ở nhiều dòng ngô lai nội dòng thông dụng như W22, A619, B37 hoặc B73 thành công đem đến sự lai nhập gen của các gen HT, trong đó chúng có tính trội một phần và biểu hiện như chức năng của nền di truyền tương ứng (Welz, 1998).

Bất chấp kiến trúc di truyền phức tạp của tính kháng NCLB này ở cây ngô, đến hiện tại thì về cơ bản việc sử dụng gen *Ht1* ở cây ngô cùng với tính kháng định lượng một phần là đủ để kiểm soát helminthosporiosis (Welz, 1998). Cơ sở cho điều này là trên toàn cầu, nòi 0 của *H. turcicum* được sử dụng nhiều (khoảng 55%) (Lipps *et al.*, 1997; Ferguson & Carson, 2007), còn các nòi khác như 2N và 23N chỉ hiếm khi được sử dụng và ngay cả ở vùng bị giới hạn về mặt địa lý (Moghaddam & Pataky, 1994; Jordan *et al.*, 1983; Lipps & Hite, 1982; Thakur *et al.*, 1989; Welz, 1998). Nòi 0 này không có độc lực trên cây ngô mang *Ht1*, sao cho khi được truyền tính kháng định lượng thích hợp vào, thì nó sẽ có đủ tính kháng tổng thể với NCLB. Tuy nhiên, nhiều nghiên cứu đã báo cáo về sự phát tán gia tăng của các nòi ít phổ biến hơn (Jordan *et al.*, 1983; Welz, 1998; Pratt & Gordon, 2006). Nguyên nhân của hiện tượng này có liên hệ với động học của quần thể mầm bệnh mà cho phép thay đổi độc lực của mầm bệnh thông qua các đột biến mới trên các gen không có độc lực và thông qua tổ hợp mới của các gen có độc lực sẵn có. Cuối cùng, việc này có thể dẫn đến sự xuất hiện các nòi gây bệnh mới, thích hợp, đôi khi có tính xâm lấn cao hơn. Ở Brazil chẳng hạn, quần thể *H. turcicum* về thực chất có vẻ đã đa dạng hơn về hợp phần nòi so với, ví dụ, ở Bắc Mỹ. Gianasi *et al.* (1996) đã báo cáo về các nòi *H. turcicum* bị tiêu diệt bởi tính kháng do gen *Ht1* tạo ra. Ngoài ra, các gen kháng có thể không ổn định với một số yếu tố môi trường nhất định như nhiệt độ và cường độ ánh sáng ở một số vùng khí hậu (Thakur *et al.*, 1989). Diễn biến này dẫn tới kết quả là, toàn cầu đang gia tăng tầm quan trọng của việc sử dụng các gen kháng HT mới hoặc các gen mà từ trước đến nay ít được chú ý đến để tạo ra các cây ngô thương mại nhằm có được tính kháng rộng hơn và lâu dài hơn với *H. turcicum* ở cây ngô. Phương pháp đầu tiên cho mục đích này được Pataky *et al.* nỗ lực đưa ra sớm từ năm 1998. Tính kháng NCLB ở cây ngô ưu tú *sh2* được cải thiện bằng cách sử dụng tổ hợp của *Ht1* và *Htn1*.

Nguồn cung cấp tính kháng *Htn1* đơn gen là giống Mehico “Pepitilla” (Gevers, 1975). Các dòng lai nhập gen *Htn1* có bản đồ gen trên nhánh dài của nhiễm sắc thể 8 cách khoảng 10 cM tính từ *Ht2* và 0,8 cM tính từ chỉ thị RFLP umc117 (bin 8.06) (Simcox & Bennetzen, 1993). Trái với các gen kháng HT thông thường, *Htn1* tạo ra tính kháng bằng cách làm chậm quá trình hình thành bào tử, và vì vậy, ngăn chặn sự phát triển của các tổn thương. Kết quả là, sẽ tạo ra tổn thương ít hơn, nhỏ hơn cũng như giảm các vùng hình thành bào tử (Raymundo *et al.*, 1981b, Simcox & Bennetzen, 1993). Không hình thành các tổn thương úa vàng-hoại tử như các tổn thương xuất hiện cùng với tính kháng do *Ht1*, *Ht2* hoặc *Ht3* tạo ra (Gevers, 1975). Tuy nhiên, phản ứng kháng ở trạng thái dị hợp tử của gen *Htn1* cho hiệu quả thấp hơn nhiều so với khi ở trạng thái đồng hợp tử (Raymundo *et al.*, 1981b).

Việc phát triển các chỉ thị đặc hiệu bổ sung mà còn có thể giúp quá trình xác định kiểu gen đơn giản hơn nữa làm cải thiện khả năng kiểm soát sinh sản của gen *Htn1*. Theo đó, công nghệ chọn lọc nhờ chỉ thị (marker assisted selection - MAS) khiến cho việc xếp chồng hoặc tạo tháp cho vài gen kháng có thể đạt hiệu quả (Min *et al.*, 2012). Các dòng lai nhập gen B37*Htn1* hoặc W22*Htn1* được dùng trong nhiều nghiên cứu lập bản đồ cho locus kháng và xác định nguồn kháng (Raymundo *et al.*, 1981a, b; Simcox & Bennetzen, 1993, Bar-Zur *et al.*, 1998; Coates & White, 1998). Tuy nhiên, các thông tin có sẵn về chỉ thị có thể được sử dụng để chọn lọc locus kháng cho *Htn1* từ Pepitilla đăng ký vẫn còn bị hạn chế (Simcox & Bennetzen, 1993). Các chỉ thị đã biết cho *Htn1* mà hữu dụng và chắn locus kháng khỏi Pepitilla đăng ký vẫn được lập bản đồ ở vị trí gần cách 22,2 cM, mà trong trường hợp tốt nhất cho phép chọn lọc đoạn nhiễm sắc thể lớn. Tuy nhiên, có một nguy cơ thường trực bên trong đoạn này, ở giữa các chỉ thị, đó là xảy ra sự tái tổ hợp di truyền đôi mà có thể dẫn đến việc chọn lọc dương tính giả đối với locus kháng *Htn1*. Ngoài ra, trong một số trường hợp, xác suất các vùng di truyền không mong muốn được kết hợp vào dòng lai nhập gen sẽ tăng theo kích cỡ của đoạn nhiễm sắc thể được lai nhập gen và được truyền qua các thế hệ của dòng ưu tú. Các vùng di truyền này, đặc biệt là khi chúng kết hợp nghiêm ngặt với locus *Htn1* và dẫn đến tác động tiêu cực rõ rệt đến một hoặc nhiều đặc tính nông học, được biết đến là liên kết bất lợi. Tuy nhiên, theo các nghiên cứu đã biết mà tiến hành và sử dụng các dòng lai nhập gen mang *Htn1* từ Pepitilla, thì các tác động tiêu cực như vậy

chưa được biết đến. Ngay cả trong công trình nghiên cứu rất toàn diện của Welz (1998), không kể những cái khác, mà cũng được thực hiện trên B37Htn1, cũng mặc nhiên công nhận rằng xét trên khía cạnh chẳng hạn như năng suất và độ chín thì việc lai nhập gen locus *Htn1* không đem đến nhược điểm đáng kể nào. Vì vậy, không có nhiều nỗ lực trong tình trạng kỹ thuật trước đây nhằm rút ngắn đoạn nhiễm sắc thể lớn.

Ngược lại, WO 2011/163590 bộc lộ kiểu gen PH99N dưới dạng nguồn thay thế cho tính kháng NCLB trên nhiễm sắc thể 8 bin 5, tuy nhiên, nó không tương ứng với Pepitilla đăng ký. Về cơ bản, chỉ có tính kháng liên quan tới nòi 0 và nòi 1 của *H. turcicum* là được nhận biết trong các quần thể lai ngược dòng từ PH99N. Thậm chí là kiểu hình kháng vẫn không được xác định rõ ràng. Tuy nhiên, các tác giả đã kết luận rằng tính kháng này là do gen *Htn1*. Nhưng locus kháng ở PH99N bị giới hạn ở duy nhất đoạn nhiễm sắc thể dài ~224kb; tuy nhiên cây ngô có tính kháng lại mang đoạn 224 kb và do đó *Htn1* giả định không được bộc lộ. Ngoài ra, kiểu gen PH99N này cũng không được công khai thông qua nộp lưu.

Một phương pháp thay thế để tạo ra gen *Htn1* hữu ích là nhận biết và tách dòng gen kháng và sử dụng nó trong chiến lược chuyển gen.

Với dự định nhận biết gen kháng cho NCLB, năm 2010, Chung *et al.* 2010 đã công bố nghiên cứu nhằm lập bản đồ chi tiết cho locus kháng bin 8.06. Tuy nhiên đoạn nhiễm sắc thể được nghiên cứu không có nguồn gốc từ Pepitilla mà là từ ngô lai DK888 có tính kháng nhiều bệnh. Các nghiên cứu về tính đặc hiệu nòi *Helminthosporium* ban đầu cho thấy rõ ràng locus kháng trên DK888, được ký hiệu là *qNLB8.06_{DK888}*, liên kết nghiêm ngặt hoặc liên kết chức năng với các gen *Ht2* và *Htn1*, do các chủng *Helminthosporium* 23 và 23N có độc lực (Chung *et al.*, 2008). Tuy nhiên công đoạn phát hiện dương về sự có mặt của *Htn1* không được thực hiện, khi không có thể phân lập N tinh khiết từ *H. turcicum*. Ngoài ra, kiểu hình kháng có *qNLB8.06_{DK888}* cũng không tương ứng với kiểu hình được mong đợi liên quan đến sự xuất hiện các tổn thương gây úa vàng và làm chậm quá trình hình thành tổn thương. Các nghiên cứu khác được thực hiện chi tiết trong Chung *et al.* (2010) cuối cùng đã cung cấp các bằng chứng cho thấy *qNLB8.06_{DK888}* giống hệt với, alen, liên kết nghiêm ngặt hoặc liên kết chức năng với *Ht2*, chứ không với *Htn1*. Locus kháng

qNLB8.06_{DK888} có thể được gán cho đoạn nhiễm sắc thể 0,46 Mb. Chú thích hệ gen của đoạn nhiễm sắc thể này dùng để chỉ 12 khung đọc mở giả định, ba trong số đó có thể tương ứng là gen giống protein kinaza tiếp đôi (GRMZM2G135202; GRMZM2G164612) hoặc gen giống protein phosphataza (GRMZM2G119720) và mỗi khung đọc mở này đều cấu thành các gen ứng viên đầy hứa hẹn cho gen kháng *Ht2* (Chung *et al.*, 2010). Quy trình xác thực chức năng không được mô tả.

Ngoài ra, WO 2011/163590 A1 cũng đã diễn giải gen *Htn1* giả định trong nguồn kháng PH99N là gen giống protein kinaza tiếp đôi (GRMZM2G451147) và nêu trình tự di truyền của nó, nhưng cũng không xác định chức năng của nó, ví dụ, ở cây ngô chuyển gen.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế bắt nguồn từ tình trạng kỹ thuật được mô tả ở trên; mục tiêu của sáng chế là đề xuất cây ngô có tính kháng với mầm bệnh *Helminthosporium turcicum* từ thể cho Pepitilla và trong đó đặc tính nông học của các cây ngô đã biết có thể được phủ tính kháng từ thể cho Pepitilla.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Các phương án và biến thể của sáng chế sẽ được mô tả dựa trên các hình vẽ và trình tự kèm theo, trong đó:

Fig.1: Vùng QTL tính được là 23,11cM trên nhiễm sắc thể 8 bằng cách sử dụng 8 chỉ thị trong 528 cá thể F2 của con lai RP1 x RP1HTN1. Đường màu đen (HtN) thể hiện khoảng tin cậy. Vị trí của các chỉ thị là theo cM.

Fig.2: Thử nghiệm năng suất ủ chua ở 5 vị trí ở Đức và lặp lại hai lần, với bố mẹ thuần hoàn RP3 và phiên bản A của đoạn cho từ B37HTN1 (RP3HTNA) và phiên bản K của đoạn cho từ B37HTN1 (RP3HTNK). Các đường này thể hiện các chênh lệch đáng kể bằng cách sử dụng kiểm định t, với $p = 0,05$.

Fig.3: mô tả các vùng chỉ thị từ M1 đến M6 mà định ra các khoảng nhiễm sắc thể (Int. 1 đến Int. 5) biểu hiện polynucleotit truyền tính kháng trong dòng nhập gen và mang liên kết bất lợi trong đoạn nhiễm sắc thể bắt nguồn từ thể cho. Đoạn nhiễm sắc thể của thể cho (Pepitilla) được thể hiện là các vùng chấm, "Pepitilla" của bố mẹ

tuần hoàn (không có liên kết bất lợi) được thể hiện là các vùng có đường gạch chéo. Khoảng 1 (Int. 1) bao gồm locus kháng HTN1, khoảng 2 (Int. 2) bao gồm vùng trình tự chịu trách nhiệm về liên kết bất lợi trong thời gian ra hoa trong thể cho, khoảng 4 và khoảng 5 (Int. 4 và Int. 5) bao gồm các vùng trình tự chịu trách nhiệm về liên kết bất lợi của năng suất ủ chua trong thể cho.

Fig.4: contig BAC trên ngân hàng RP4HTN1 BAC của nó với chú thích về khung trình tự và gen tương ứng. Các gen ứng viên được thể hiện trong các hộp hình vuông. Các mũi tên màu đen là các gen được diễn giải thêm mà không phải là các gen ứng cử cho tính kháng HTN.

Mô tả chi tiết sáng chế

Một mặt, mục tiêu nêu trên được thực hiện bằng cách tạo ra cây ngô có hệ gen đã được kết hợp đoạn nhiễm sắc thể từ *Pepitilla* cho, trong đó đoạn nhiễm sắc thể này chứa khoảng cho (sau đây được gọi là khoảng thứ nhất hoặc khoảng 1) có các alen cho theo haplotyp thể hiện trong Bảng 2 và polynucleotit tạo ra tính kháng với *Helminthosporium turcicum* ở cây ngô, và trong đó đoạn nhiễm sắc thể này không chứa khoảng cho tiếp tục (sau đây được đặt tên là khoảng thứ hai hoặc khoảng 2) giữa chỉ thị ở vùng chỉ thị thứ nhất (M1) có bên sườn là các chỉ thị SYN14136 và PZE-108076510 và chỉ thị ở vùng chỉ thị thứ hai (M2) có bên sườn là các chỉ thị SYN24931 và PZE-108077560. Giải pháp này và các giải pháp khác cho vấn đề này, được mô tả dưới đây, có thể dựa trên chương trình sinh sản để kết hợp locus *Htn1* từ *Pepitilla* vào dòng ngô. Tuy nhiên, các phương pháp thiết kế di truyền cũng có thể được chọn, cây theo sáng chế có thể được tạo ra nhờ các phương pháp này. Các ví dụ về chiến lược thiết kế di truyền được mô tả chi tiết hơn dưới đây. Để tạo ra cây theo sáng chế, có thể sử dụng nhiều kiểu gen khác nhau từ tình trạng kỹ thuật. Cụ thể là, B37HTN1, chứa locus kháng cho giống “*Pepitilla*”, được sử dụng làm dòng gốc. Bên cạnh chính *Pepitilla* và B37HTN1 (còn được biết trong tình trạng kỹ thuật là B37HtN), thì hầu hết kiểu gen ngô bất kỳ có thể được yêu cầu để kết hợp locus *Htn1* vào hệ gen của cây nhằm tạo ra cây ngô theo sáng chế, cụ thể là trên nhiễm sắc thể 8 bin 5 hoặc 6, thể nhập gen của locus kháng *Htn1* từ *Pepitilla* đã được xen vào. Về vấn đề này, đã có nhiều ví dụ về kiểu gen trong tình trạng kỹ thuật, ví dụ: W22Htn (ví dụ, Bar-Zur et al., 1998);

H6314*Htn* (ví dụ, Bar-Zur et al., 1998), B73*HtN* (ví dụ, Shimoni et al., Journal of Phytopathology 131:4 (1991), 315-321), B68*HtN* và A632*HtN* (ví dụ, Carson, Plant Disease 79 (1995), 717-720) và A619*HtN* (ví dụ, Stanković et al, Genetika 39:2 (2007), 227 -240). Ở cây ngô theo sáng chế, đoạn nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ thể cho Pepitilla; theo một phương án được ưu tiên của cây ngô theo sáng chế, đoạn nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ B37HTN1 cho hoặc một từ kiểu gen ngô khác như trích dẫn ở trên. Ví dụ, B37HTN1 có thể được đặt hàng từ Kho trung tâm Maize Genetics COOP sử dụng ID kho 65749.

Đoạn nhiễm sắc thể kết hợp vào hệ gen của cây ngô theo sáng chế có nguồn gốc từ Pepitilla cho, như đã biết, chứa locus kháng HTN1. Vị trí nhập gen của locus kháng này được định vị trên nhánh dài của nhiễm sắc thể 8, bin 8.05 – 8.06. Đoạn nhiễm sắc thể được kết hợp này chứa khoảng cho thứ nhất mà chứa polynucleotit tạo ra tính kháng *Helminthosporium turcicum* ở cây ngô theo sáng chế. Về vấn đề này, polynucleotit này chứa một hoặc nhiều gen tạo ra tính kháng của locus HTN1 từ Pepitilla (Bảng 1) hoặc các alen gen của nó. Trong điều kiện xâm nhiễm *H. turcicum*, gen hoặc alen gen này có thể tạo ra kiểu hình kháng có các đặc tính điển hình của HTN1. Tốt hơn nếu, polynucleotit này chứa một hoặc nhiều gen tạo ra tính kháng của locus HTN1, tốt hơn nếu từ Pepitilla, được chọn từ RLK1 và EXT1 (xem Bảng 1) hoặc các alen gen của nó mà tạo ra kiểu hình kháng có các đặc tính điển hình của HTN1 trong điều kiện xâm nhiễm *H. turcicum*. Đặc biệt tốt hơn nếu, polynucleotit này chứa trình tự nucleotit mã hóa polypeptit tương ứng với SEQ ID NO: 2 hoặc SEQ ID NO: 6 hoặc thể tương đồng của polypeptit tương ứng với SEQ ID NO: 2 hoặc SEQ ID NO: 6, mà tạo ra kiểu hình kháng có các đặc tính điển hình của HTN1 trong điều kiện xâm nhiễm *H. turcicum*. Ví dụ về các đặc tính điển hình này của HTN1 là làm chậm quá trình hình thành bào tử, làm giảm sự phát triển các tổn thương, phát triển tổn thương nhỏ hơn, làm giảm vùng hình thành bào tử và/hoặc không có tổn thương hoặc chỉ có các tổn thương ủa vàng-hoại tử tách riêng. Về mặt cấu trúc, polynucleotit này đặc trưng ở chỗ nó chứa phân tử axit nucleic (a) chứa trình tự nucleotit tương ứng với các SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 hoặc 15, (b) chứa trình tự nucleotit có độ đồng nhất ít nhất là 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% với một trong các trình tự nucleotit tương ứng với các SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 hoặc

15, tốt hơn là trên toàn bộ chiều dài của trình tự đó, (c) lai với chuỗi bổ trợ của phân tử axit nucleic theo các mục (a) hoặc (b) trong các điều kiện nghiêm ngặt, (d) mã hóa polypeptit với trình tự axit amin tương ứng với các SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 hoặc 16, (e) mã hóa polypeptit với trình tự axit amin có độ đồng nhất ít nhất là 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% với một trong các trình tự axit amin theo mục (d), hoặc (f) chứa một phần trình tự của axit nucleic theo các mục từ (a) đến (e). Theo một phương án được ưu tiên, polynucleotit này đặc trưng ở chỗ nó chứa phân tử axit nucleic (aa) chứa trình tự nucleotit tương ứng với SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 5, (bb) chứa trình tự nucleotit có độ đồng nhất ít nhất là 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% or 99% với một trong các trình tự nucleotit tương ứng với SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 5, tốt hơn là trên toàn bộ chiều dài của trình tự đó, (cc) lai với chuỗi bổ trợ của phân tử axit nucleic theo mục (aa) hoặc (bb) trong các điều kiện nghiêm ngặt, (dd) mã hóa polypeptit với trình tự axit amin tương ứng với SEQ ID NO: 2 hoặc SEQ ID NO: 6, (ee) mã hóa polypeptit với trình tự axit amin có độ đồng nhất ít nhất là 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% or 99% với một trong các trình tự axit amin theo mục (dd), hoặc (ff) chứa một phần trình tự của axit nucleic theo các mục từ (aa) đến (ee). Cụm từ “một phần trình tự của phân tử axit nucleic” như được sử dụng trong sáng chế có thể là ít nhất 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 hoặc ít nhất 100 nucleotit liên tiếp, hơn nữa là ít nhất 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900 hoặc 1000 nucleotit liên tiếp. Polynucleotit này có thể ở trạng thái dị hợp tử hoặc đồng hợp tử trong hệ gen của cây ngô theo sáng chế; tốt hơn nếu, polynucleotit này ở trạng thái đồng hợp tử.

Bảng 1: Các gen tạo ra tính kháng tiềm năng của locus HTN1 từ *Pepitilla*; tên gen (cột 1); tham chiếu tới các SEQ ID No tương ứng trong trình tự exon hệ gen (cột 2); tham chiếu tới các SEQ ID No tương ứng trong trình tự axit amin/protein dự đoán (cột 3); gen đồng đẳng đã diễn giải từ hệ gen tham chiếu B73 (cột 4).

Tên gen	cADN SEQ ID NO:	Trình tự protein SEQ ID NO:	Gen B73 đồng đẳng
RLK1	1	2	GRMZM2G451147
RLK4	3	4	GRMZM2G144028
EXT1	5	6	GRMZM2G445338
DUF1	7	8	AC209075.3_FG007
ZNF1	9	10	GRMZM2G175661
CYT1	11	12	GRMZM2G092018
RET1	13	14	GRMZM2G091973
HYD	15	16	GRMZM2G144021

Hơn nữa, khoảng thứ nhất trong đoạn nhiễm sắc thể mà có alen cho theo kiểu đơn trong Bảng 2 được đặc trưng bởi trình tự của alen cho trong kiểu đơn của Bảng 2, nhưng không bị giới hạn ở trình tự của alen cho theo Bảng 2 này. Điều này có nghĩa là khoảng thứ nhất có ít nhất là alen cho mô tả gen tạo ra tính kháng từ Bảng 1, tùy ý với alen cho của chỉ thị MA0008. Hơn nữa, khoảng thứ nhất này tốt hơn nếu có ít nhất là alen cho theo kiểu đơn trong Bảng 2 từ MA0021 đến MA0022 (tức là MA0021, MA0007, MA0008, MA0009, MA0010, MA0011, MA0012, MA0022) hoặc từ MA0005 đến MA0022 (tức là MA0005, MA0021, MA0007, MA0008, MA0009, MA0010, MA0011, MA0012 và MA0022) hoặc từ MA0005 đến MA0013 (tức là MA0005, MA0021, MA0007, MA0008, MA0009, MA0010, MA0011, MA0012, MA0022 và MA0013) hoặc từ MA0005 đến MA0014 (tức là MA0005, MA0021, MA0007, MA0008, MA0009, MA0010, MA0011, MA0012, MA0022, MA0013 và MA0014) hoặc từ MA0005 đến MA0015 (tức là MA0005, MA0021, MA0007, MA0008, MA0009, MA0010, MA0011, MA0012, MA0022, MA0013, MA0014 và MA0015) hoặc từ MA0005 đến MA0016 (tức là MA0005, MA0021, MA0007, MA0008, MA0009, MA0010, MA0011, MA0012, MA0022, MA0013, MA0014, MA0015 và MA0016), đặc biệt tốt hơn nếu từ MA0005 đến MA0017 (tức

là MA0005, MA0021, MA0007, MA0008, MA0009, MA0010, MA0011, MA0012, MA0022, MA0013, MA0014, MA0015, MA0016 và MA0017), MA0005 đến MA0018 (tức là MA0005, MA0021, MA0007, MA0008, MA0009, MA0010, MA0011, MA0012, MA0022, MA0013, MA0014, MA0015, MA0016, MA0017 và MA0018), MA0005 đến PZE-108095998 (tức là MA0005, MA0021, MA0007, MA0008, MA0009, MA0010, MA0011, MA0012, MA0022, MA0013, MA0014, MA0015, MA0016, MA0017, MA0018 và PZE-108095998), MA0005 đến PZE-108096011 (tức là MA0005, MA0021, MA0007, MA0008, MA0009, MA0010, MA0011, MA0012, MA0022, MA0013, MA0014, MA0015, MA0016, MA0017, MA0018, PZE-108095998 và PZE-108096011) hoặc MA0005 đến MA0019 (tức là MA0005, MA0021, MA0007, MA0008, MA0009, MA0010, MA0011, MA0012, MA0022, MA0013, MA0014, MA0015, MA0016, MA0017, MA0018, PZE-108095998, PZE-108096011 và MA0019), đặc biệt tốt hơn nữa nếu từ MA0005 đến PZE-108096610 (tức là MA0005, MA0021, MA0007, MA0008, MA0009, MA0010, MA0011, MA0012, MA0022, MA0013, MA0014, MA0015, MA0016, MA0017, MA0018, PZE-108095998, PZE-108096011, MA0019 và PZE-108096610), MA0005 đến MA0020 (tức là MA0005, MA0021, MA0007, MA0008, MA0009, MA0010, MA0011, MA0012, MA0022, MA0013, MA0014, MA0015, MA0016, MA0017, MA0018, PZE-108095998, PZE-108096011, MA0019, PZE-108096610 và MA0020), MA0005 đến PZE-108096791 (tức là MA0005, MA0021, MA0007, MA0008, MA0009, MA0010, MA0011, MA0012, MA0022, MA0013, MA0014, MA0015, MA0016, MA0017, MA0018, PZE-108095998, PZE-108096011, MA0019, PZE-108096610, MA0020 và PZE-108096791) hoặc MA0005 đến MA0006 (tức là MA0005, MA0021, MA0007, MA0008, MA0009, MA0010, MA0011, MA0012, MA0022, MA0013, MA0014, MA0015, MA0016, MA0017, MA0018, PZE-108095998, PZE-108096011, MA0019, PZE-108096610, MA0020, PZE-108096791 và MA0006). Kiểu đơn kháng này rõ ràng định rõ và phát hiện nguồn kháng Pepitilla. Cụ thể là, khoảng thứ nhất được định vị ở giữa chỉ thị MA0004 và chỉ thị PZE-108097482, ở giữa chỉ thị MA0004 và chỉ thị MA0022, ở giữa chỉ thị MA0005 và chỉ thị PZE-108097482 hoặc ở giữa chỉ thị MA0005 và chỉ thị MA0022. Tốt hơn nữa, khoảng thứ nhất này mô tả phân đoạn của đoạn nhiễm sắc thể mà có thể

tạo ra tính kháng điển hình của HTN1. Như vậy nó là chất mang của polynucleotit nêu trên.

Bảng 2: Kiểu đơn kháng từ B37HTN1;

Vị trí theo bp trên B73 AGPv02	Alen cho B37HTN1	Ký hiệu chỉ thị
151831049	C	MA0005
151907173	G	MA0021
152045106	T	MA0007
152045141	T	MA0008
152045402	T	MA0009
152045516	C	MA0010
152045912	T	MA0011
152046502	T	MA0012
152046529	A	MA0022
152133057	G	MA0013
152133380	A	MA0014
152144310	A	MA0015
152250992	A	MA0016
152301656	A	MA0017
152304127	A	MA0018
152433358	A	PZE-108095998
152435855	A	PZE-108096011
152630794	C	MA0019
152703579	G	PZE-108096610
152753635	A	MA0020
152887338	G	PZE-108096791
152888374	A	MA0006

Hơn nữa, mọi cây ngô theo sáng chế đều là cây ngô kháng HT. Tính kháng HT được tạo ra bởi sự kết hợp của đoạn nhiễm sắc thể có thể định lượng bằng cách xác định điểm số phân loại trong thí nghiệm kiểu hình theo biểu đồ trong Bảng 3 và ví dụ 1.A); trong ví dụ này, mức kháng giảm từ 1 đến 9. Cây ngô kháng HT theo sáng chế có tính kháng với *H. turcicum* tăng ít nhất là 1 điểm số phân loại, tốt hơn nếu ít nhất là 2 điểm số phân loại hoặc ít nhất là 3 điểm số phân loại và đặc biệt tốt hơn nếu ít nhất là 4 điểm số phân loại. Tốt hơn nữa, cây ngô theo sáng chế có tính kháng với ít nhất một nòi của *Helminthosporium turcicum* mà không tương ứng với nòi đã biết có tính đặc hiệu đã biết trong tình trạng kỹ thuật. Theo một phương án được đặc biệt ưu tiên, cây ngô theo

sáng chế kháng với tất cả các nòi đã biết của *Helminthosporium turcicum*, tức là tính kháng được tạo ra không đặc hiệu nòi và có thể đặc biệt có ích trong việc tạo thành tính kháng rộng với *Helminthosporium turcicum*.

Bảng 3: Biểu đồ điểm số phân loại cho thí nghiệm kiểu hình trong các thử nghiệm trên cánh đồng ở nhiều vị trí khác nhau có cấy ghép *H. turcicum* tự nhiên và nhân tạo (từ Deutsche Maiskomitee (DMK, German maize committee); giống AG 27.02.02; (DMK J. Rath; RP Freiburg H.J. Imgraben)

Điểm số phân loại	Kiểu hình
1	Cây không có triệu chứng của bệnh, 0%
2	Bắt đầu nhiễm, nhìn thấy được các đốm nhỏ đầu tiên (dưới 2 cm). Dưới 5% bề mặt lá bị ảnh hưởng.
3	Một số đốm phát triển ở giai đoạn lá. Từ 5 đến 10% bề mặt lá bị ảnh hưởng.
4	10-20% bề mặt lá bị ảnh hưởng. Các đốm có thể nhìn thấy rõ ở một số giai đoạn lá.
5	20-40% bề mặt lá bị ảnh hưởng. Các đốm bắt đầu hợp lại.
6	40-60% bề mặt lá bị ảnh hưởng. Sự xâm nhiễm có hệ thống có thể nhìn thấy trên lá.
7	60-80% bề mặt lá bị ảnh hưởng. Khoảng một nửa lá bị phá hoại hoặc bị khô do nhiễm nấm.
8	80-90% bề mặt lá bị ảnh hưởng. Hơn một nửa lá bị phá hoại hoặc bị khô do nhiễm nấm.
9	90-100% bề mặt lá bị ảnh hưởng. Các cây hầu hết khô hoàn toàn.

Phần mô tả này bộc lộ cấu trúc di truyền hoặc cấu trúc phân tử của locus HTN1 bằng cách tạo ra kiểu đơn, bằng cách lập bản đồ các chỉ thị nổi bật và cũng bằng cách nhận biết các gen ứng viên để tạo ra tính kháng với mầm bệnh *Helminthosporium turcicum*.

Đáng ngạc nhiên là, các cây ngô theo sáng chế chứng minh tính nông học trong thí nghiệm kiểu hình được thực hiện trên cánh đồng và trong nhà kính. Điều này là do, mặc dù các dòng đã chuyển hóa khác từ chương trình sinh sản để kết hợp locus HTN1 từ Pepitilla cũng như từ các dòng chuyển hóa đã biết trong tình trạng kỹ thuật như B37HTN1, bên cạnh tính kháng HT được tạo ra trong các điều kiện không xâm nhiễm với *H. turcicum* và trong các điều kiện ngoại cảnh tương đương (nhiệt độ, nguồn cấp

đường chất, vị trí v.v.) biểu hiện sự làm chậm đáng kể đối với thời gian ra hoa đực và/hoặc cái so với dòng tương ứng không nhập gen (ví dụ, dòng đẳng gen hoặc dòng gốc), ở cây ngô theo sáng chế thì thời gian ra hoa tương ứng với thời gian ra hoa của cây ngô đẳng gen đối chứng có hệ gen không được kết hợp đoạn nhiễm sắc thể từ thể cho Pepitilla. “Thời gian ra hoa” tương ứng khi chúng chênh nhau ít hơn 2 ngày. Biên độ làm chậm quan sát được trong trường hợp này phụ thuộc chặt chẽ vào loài ngô hoặc kiểu gen ngô, các điều kiện ngoại cảnh ưu thế như điều kiện đất, độ ẩm, độ kết tủa, nhiệt độ v.v. và/hoặc căng thẳng sinh học như sự xâm nhiễm mầm bệnh ngoài *H. turcicum*. Sự chậm này là ít nhất 2 ngày, ít nhất 3 ngày, ít nhất 5 ngày hoặc ít nhất 7 ngày. Sự khác biệt đã thiết lập về thời gian ra hoa này là do liên kết bất lợi dưới dạng một phần của quá trình nhập gen, điều này đặc biệt gây ngạc nhiên do các kết quả quan sát về loại này vẫn chưa được biết đến trong tình trạng kỹ thuật. Thời gian ra hoa là đặc tính nông học quan trọng. Nó có thể ảnh hưởng trực tiếp và về cơ bản đến năng suất tiềm năng của cây ngô. Thời gian ra hoa bị làm chậm thường dẫn đến năng suất giảm.

Để giải thích nguyên nhân di truyền của nhược này và để nhận biết liên kết bất lợi, các chương trình lai ngược dòng bao quát kèm theo xác định kiểu gen và kiểu hình được tiến hành, chẳng hạn. Công việc này được hỗ trợ bởi sự phát triển mạnh của các chỉ thị phân tử cụ thể trên đoạn nhiễm sắc thể mang HTN1. Kỹ thuật chọn lọc dựa trên chỉ thị phân tử (marker aided selection - MAS) và thực hiện các chương trình lai ngược dòng chuyên sâu (ví dụ “tách dòng dựa trên bản đồ di truyền”) có thể được tìm thấy trong tình trạng kỹ thuật (Gupta & Varshney, 2013). QTL có tính kháng HTN1 từ B37HTN1 hoặc Pepitilla cho được định vị với sự trợ giúp của các chỉ thị SSR bnlgl1067, umc1121, MA0002, MA0003, bnlgl1782, umc1287, umc1960 và bnlgl240 ở các đời sau trên nhiễm sắc thể 8 (bin 8.06) ở giữa chỉ thị MA0002 (Bảng 4) và chỉ thị umc1287 (Bảng 5) trong vùng 23,1 cM (xem Fig.1). Ở các cây ngô có thời gian ra hoa chậm, locus của phân đoạn trình tự hệ gen thể cho mà chịu trách nhiệm về liên kết bất lợi đã nhận biết về thời gian ra hoa được xác định thành công là vào khoảng cho thứ hai nữa trên đoạn nhiễm sắc thể (Ví dụ 3B; Fig.3). Ở cây ngô theo sáng chế, đoạn nhiễm sắc thể được kết hợp vào nó không chứa khoảng cho thứ hai. Trong bản mô tả này, khoảng thứ hai bắt nguồn từ, ví dụ, bố mẹ tuần hoàn không mang liên kết bất lợi đối với thời gian ra hoa hoặc từ đoạn ADN tương đồng đã nhập nội ngoại sinh

mà không phải là chất mang của liên kết bất lợi, trên vectơ thể cho thích hợp để tái tổ hợp tương đồng hướng đích. Khoảng thứ hai được kết hợp gần và nghiêm ngặt với locus kháng HTN1 hoặc với khoảng thứ nhất. Khoảng thứ hai là khoảng ở giữa chỉ thị trong vùng chỉ thị thứ nhất (M1) có bên sườn là các chỉ thị SYN14136 và PZE-108076510 và chỉ thị trong vùng chỉ thị thứ hai (M2) có bên sườn là các chỉ thị SYN24931 và PZE-108077560. Các chỉ thị bên sườn này có thể được thấy rõ trong Bảng 4. Các chỉ thị SYN14136, PZE-108076510, SYN24931 và PZE-108077560 là các chỉ thị SNP để sử dụng trong hệ thống KBioscience-KASP (www.lgcgenomics.com/genotyping/KASP-genotyping-reagents/KASP-overview/). Chúng xác định rõ ràng vùng chỉ thị M1 và vùng chỉ thị M2 ở một trong hai bên của phân đoạn trình tự trong thể cho B37HTN1 hoặc Pepitilla mang liên kết bất lợi đối với thời gian ra hoa. Ngoài ra, dưới dạng chỉ thị đa hình, chúng cũng có khả năng biệt hóa giữa alen của thể cho Pepitilla và, ví dụ, alen đối với bố mẹ tuần hoàn. Toàn bộ chi tiết liên quan đến việc sử dụng các chỉ thị này làm chỉ thị KASP có thể thu được từ Bảng 4. Các tham số lai hóa đoạn mồi thích hợp lấy làm ví dụ đối với PCR được nêu trong Ví dụ 2. Hơn nữa, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này cũng có khả năng xác định các tham số lai hóa thích hợp khác. Hơn nữa, việc phát triển các chỉ thị khác, đặc biệt là các chỉ thị đa hình, trong M1 và/hoặc M2 bên cạnh các chỉ thị đã nêu là vấn đề bình thường đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực có kiến thức về vùng chỉ thị đã mô tả. Bằng cách sử dụng các chỉ thị nêu trong bản mô tả này, cụ thể là SYN14136, PZE-108076510, SYN24931 và PZE-108077560 hoặc các chỉ thị tự phát triển trong M1 và/hoặc M2, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể dễ dàng thiết lập xem ở cây ngô có hệ gen đã kết hợp đoạn nhiễm sắc thể với locus kháng HTN1 từ thể cho Pepitilla, thì khoảng cho thứ hai đã mô tả ở trên được chứa trong đó hay không được chứa trong đó. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này cũng sẽ nhận thấy, ví dụ, trong chu trình của quá trình sinh sản hoặc chiến lược thiết kế di truyền để tái tổ hợp có mục đích, khoảng nhiễm sắc thể có thể được loại bỏ khỏi thể cho mà, ví dụ, chứa các trình tự hệ gen gây ra liên kết bất lợi, bằng cách tái tổ hợp di truyền/tương đồng đoạn nhiễm sắc thể được kết hợp. Về vấn đề này, khoảng cho của Pepitilla có thể được thay thế bằng khoảng tương ứng của hệ gen bố mẹ tuần hoàn hoặc bằng đoạn ADN tương đồng được nhập nội ngoại sinh. Các chỉ thị nói

chung và các chỉ thị được bộc lộ trong bản mô tả này một cách cụ thể có thể đặc biệt được sử dụng để chọn lọc về vấn đề này. Ví dụ, cách sử dụng có thể có của các chỉ thị nhằm phát hiện ra alen sẽ được đưa ra dưới đây: việc phát hiện alen có thể được thực hiện bằng cách, ví dụ, (a) phân lập ít nhất một phân tử axit nucleic từ hệ gen của cây hoặc tế bào cây/cây ngô hoặc tế bào cây ngô, và (b) kiểm tra phân tử axit nucleic đã được phân lập có ít nhất một chỉ thị, cũng như tùy ý (c) giải trình tự alen này trong một và/hoặc nhiều kiểu gen, (d) phát hiện một và/hoặc nhiều dạng đa hình và/hoặc (e) giới hạn bằng endonucleaza giới hạn mà có thể tạo ra các đoạn có kích thước khác nhau ở alen chỉ thị.

Theo một phương án được ưu tiên, cây ngô theo sáng chế là cây ngô như được mô tả ở trên, trong đó đoạn nhiễm sắc thể không chứa khoảng cho thứ hai mà có bên sườn là a) chỉ thị SYN14136 và chỉ thị PZE-108077560, b) chỉ thị PZE-108076510 và chỉ thị PZE-108077560, c) chỉ thị SYN14136 và chỉ thị SYN24931 hoặc d) chỉ thị PZE-108076510 và chỉ thị SYN24931.

Theo một phương án được ưu tiên, cây ngô theo sáng chế có thời gian ra hoa được và/hoặc cái lệch so với dòng đã chuyển hóa Pepitilla hoặc cây đã chuyển hóa Pepitilla như B37HTN1 mà chứa khoảng 2 ở giữa chỉ thị trong vùng chỉ thị thứ nhất (M1) có bên sườn là chỉ thị SYN14136 và chỉ thị PZE-108076510, và chỉ thị trong vùng chỉ thị thứ hai (M2) có bên sườn là chỉ thị SYN24931 và chỉ thị PZE-108077560, trong đó thuật ngữ “thời gian lệch” có nghĩa là dòng đã chuyển hóa hoặc cây đã chuyển hóa có độ chậm ít nhất là 2 ngày, ít nhất là 3 ngày, ít nhất là 5 ngày hoặc ít nhất là 7 ngày.

Một phương án được ưu tiên khác của cây ngô theo sáng chế là cây ngô như được mô tả ở trên, trong đó đoạn nhiễm sắc thể không chứa thêm khoảng cho (sau đây được gọi là khoảng thứ ba hoặc khoảng 3) ở giữa chỉ thị trong vùng chỉ thị thứ hai M2 và chỉ thị trong vùng chỉ thị thứ ba M3 có bên sườn là chỉ thị PZE-108093423 (Bảng 4) và chỉ thị PZE-108093748 (Bảng 4). Chỉ thị PZE-108093423 và chỉ thị PZE-108093748 là các chỉ thị SNP để sử dụng trong hệ thống KBioscience-KASP (www.lgcgenomics.com/genotyping/KASP-genotyping-reagents/KASP-overview/). Chúng xác định rõ ràng vùng chỉ thị M3. Là các chỉ thị đa hình, chúng cũng thích hợp

để phân biệt giữa alen cho và, ví dụ, alen đối với bố mẹ tuần hoàn. Tất cả các chi tiết liên quan đến việc sử dụng các chỉ thị này như các chỉ thị KASP có thể có được từ Bảng 4. Các tham số lai hóa đoạn môi thích hợp lấy làm ví dụ đối với PCR được nêu trong Ví dụ 2. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này cũng có thể xác định các tham số lai hóa thích hợp khác. Hơn nữa, việc phát triển các chỉ thị khác, đặc biệt là các chỉ thị đa hình, trong M3 bên cạnh các chỉ thị đã nêu là vấn đề thông thường đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực có hiểu biết về vùng chỉ thị được mô tả. Bằng cách sử dụng các chỉ thị cho M2 như đã nêu ở trên và các chỉ thị PZE-108093423 và PZE-108093748 lưu ý trong bản mô tả hoặc các chỉ thị tự phát triển trong M3, việc thiết lập xem trong cây ngô có hệ gen đã kết hợp đoạn nhiễm sắc thể với locus kháng HTN1 từ thể cho Pepitilla thì chứa hay không chứa khoảng cho thứ ba như được mô tả ở trên sẽ là vấn đề đơn giản đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

Theo một phương án được ưu tiên khác, cây ngô theo sáng chế được đề xuất là cây ngô như được mô tả ở trên trong đó đoạn nhiễm sắc thể không chứa phân đoạn di truyền chứa khoảng cho thứ hai và khoảng cho thứ ba và có bên sườn là a) chỉ thị SYN14136 và chỉ thị PZE-108093423, b) chỉ thị PZE-108076510 và chỉ thị PZE-108093423, c) chỉ thị SYN14136 và chỉ thị PZE-108093748 hoặc d) chỉ thị PZE-108076510 và chỉ thị PZE-108093748.

Theo một khía cạnh khác, các phân đoạn di truyền khác có thể được xác định trên đoạn nhiễm sắc thể mà, trong các điều kiện không xâm nhiễm *H. turcicum*, có thể gây ảnh hưởng tiêu cực đáng kể đến năng suất tiềm năng của cây ngô có hệ gen đã kết hợp đoạn nhiễm sắc thể có locus kháng HTN1 từ thể cho Pepitilla. Vì vậy, không phụ thuộc vào độ chậm đối với thời gian ra hoa được mô tả ở trên, các dòng đã chuyển hóa cũng như các dòng đã chuyển hóa được biết trong tình trạng kỹ thuật như B37HTN1, bên cạnh tính kháng HT đã tạo ra, còn có năng suất giảm về cơ bản, đặc biệt là năng suất ù chua giảm về cơ bản so với dòng tương ứng không nhập gen (ví dụ, dòng đẳng gen hoặc dòng gốc). Đây là trường hợp xảy ra ngay cả với dòng có hệ gen đã kết hợp phân đoạn di truyền của thể cho gồm khoảng 2 (ở giữa chỉ thị từ M1 và M2) hoặc khoảng 2 và 3 (ở giữa chỉ thị từ M1 và M3) không còn hiện diện. Các kết quả quan

sát về kiểu này không được mong đợi bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, do không có chỉ định trong tình trạng kỹ thuật về liên kết bất lợi của kiểu này ở dòng nhập gen HTN1. Để giải thích nguyên nhân di truyền của nhược điểm nông học này, ví dụ, các chương trình lai ngược dòng mở rộng kèm theo xác định kiểu gen và kiểu hình được tiến hành. Công việc này được hỗ trợ bởi sự phát triển mạnh của các chỉ thị phân tử chính xác hơn và đặc hiệu hơn trên đoạn nhiễm sắc thể mang HTN1. Ở các cây ngô có năng suất (năng suất ủ chua) giảm, vị trí của phân đoạn trình tự hệ gen chịu trách nhiệm về liên kết bất lợi của năng suất ủ chua được xác định một cách thành công trên hai khoảng cho khác (sau đây khoảng thứ tư hoặc khoảng 4 và khoảng thứ năm hoặc khoảng 5) trên đoạn nhiễm sắc thể Pepitilla (Ví dụ 3C; Fig.3). Cây ngô theo sáng chế chứa khoảng tương ứng không có liên kết bất lợi, ví dụ từ bố mẹ tuần hoàn, thay cho khoảng cho thứ tư và/hoặc khoảng cho thứ năm mang liên kết bất lợi, không có năng suất ủ chua giảm, và vì vậy năng suất, đặc biệt là năng suất ủ chua, mà bằng hoặc tương đương với dòng không nhập gen (ví dụ, dòng đẳng gen hoặc dòng gốc). So với cây ngô đối chứng có liên kết bất lợi về năng suất ủ chua, thì năng suất ủ chua của cây ngô theo sáng chế không có các khoảng cho thứ tư và/hoặc thứ năm, có thể cao hơn trên 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15% hoặc 20%. Khoảng thứ tư nằm gần và được kết hợp nghiêm ngặt với locus kháng HTN1 hoặc khoảng thứ nhất. Khoảng thứ năm nằm xa và được kết hợp nghiêm ngặt với locus kháng HTN1 hoặc khoảng thứ nhất.

Vì vậy, một phương án được ưu tiên đặc biệt của cây ngô theo sáng chế là cây ngô như được mô tả ở trên trong đó đoạn nhiễm sắc thể không chứa thêm i) khoảng cho thứ tư ở giữa chỉ thị trong vùng chỉ thị thứ ba M3 và chỉ thị trong vùng chỉ thị thứ tư M4 có bên sườn là chỉ thị MA0004 và chỉ thị MA0005, hoặc ii) phân đoạn di truyền có khoảng thứ tư ở giữa chỉ thị trong vùng chỉ thị thứ ba M3 và chỉ thị trong vùng chỉ thị thứ bảy M7 có bên sườn là chỉ thị MA0005 và chỉ thị MA0021, và/hoặc trong đó đoạn nhiễm sắc thể không chứa thêm i) khoảng cho thứ năm ở giữa chỉ thị trong vùng chỉ thị thứ năm M5 có bên sườn là chỉ thị MA0006 và chỉ thị PZE-108097482 và chỉ thị trong vùng chỉ thị thứ sáu M6 có bên sườn là chỉ thị PZE-108107671 và chỉ thị SYN4196, hoặc ii) phân đoạn di truyền có khoảng thứ năm ở giữa chỉ thị trong vùng chỉ thị thứ tám M8 có bên sườn là chỉ thị MA0022 và chỉ thị MA0013 và chỉ thị trong

vùng chỉ thị thứ sáu M6 có bên sườn là chỉ thị PZE-108107671 và chỉ thị SYN4196. Các chỉ thị bên sườn có thể được thấy từ Bảng 4. Các chỉ thị MA0004, MA0005, MA0006, MA0013, MA0021, MA0022, PZE-108097482, PZE-108107671 và SYN4196 là các chỉ thị SNP để sử dụng trong hệ thống KBioscience-KASP (www.lgcgenomics.com/genotyping/KASP-genotyping-reagents/KASP-overview/). Chúng xác định rõ ràng các vùng chỉ thị M4, M5, M6, M7 và M8 mà, cùng với M3, thiết lập các phân đoạn trình tự mang liên kết bất lợi cho năng suất ủ chua ở thể cho B37HTN1 hoặc Pepitilla. Là các chỉ thị đa hình, chúng cũng thích hợp để phân biệt giữa alen cho và, ví dụ, alen đối với bố mẹ tuần hoàn. Tất cả các chi tiết liên quan đến việc sử dụng các chỉ thị này làm chỉ thị KASP có thể được thấy từ Bảng 4. Các tham số lai hóa đoạn mồi thích hợp lấy làm ví dụ đối với PCR được nêu trong Ví dụ 2. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này cũng có thể xác định các tham số lai hóa thích hợp khác. Hơn nữa, việc phát triển các chỉ thị khác, đặc biệt là các chỉ thị đa hình, trong M4, trong M5, trong M6, trong M7 và/hoặc trong M8 là vấn đề thông thường đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực có hiểu biết về vùng chỉ thị được mô tả. Bằng cách sử dụng các chỉ thị MA0004, MA0005, MA0006, MA0013, MA0021, MA0022, PZE-108097482, PZE-108107671 và SYN4196 được mô tả trong bản mô tả này hoặc các chỉ thị tự phát triển trong M4, trong M5, trong M6, trong M7 và/hoặc M8 cũng như các chỉ thị trong M3 được mô tả ở trên, việc thiết lập xem ở cây ngô có hệ gen đã kết hợp đoạn nhiễm sắc thể có locus kháng HTN1 từ thể cho Pepitilla, thì chứa hay không chứa khoảng cho thứ tư như được mô tả ở trên sẽ là vấn đề đơn giản đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

Một phương án được ưu tiên đặc biệt khác của cây ngô theo sáng chế là cây ngô như được mô tả ở trên trong đó đoạn nhiễm sắc thể i) không chứa phân đoạn di truyền chứa khoảng cho thứ hai, khoảng cho thứ ba và khoảng cho thứ tư và có bên sườn là a) chỉ thị SYN14136 và chỉ thị MA0004, b) chỉ thị PZE-108076510 và chỉ thị MA0004, c) chỉ thị SYN14136 và chỉ thị MA0005 hoặc d) chỉ thị PZE-108076510 và chỉ thị MA0005, hoặc (ii) không chứa phân đoạn di truyền chứa khoảng thứ hai và khoảng cho thứ ba và có bên sườn là a) chỉ thị SYN14136 và chỉ thị PZE-108093423, b) chỉ thị PZE-108076510 và chỉ thị PZE-108093423, c) chỉ thị SYN14136 và chỉ thị PZE-108093748 hoặc d) chỉ thị PZE-108076510 và chỉ thị PZE-

108093748, và khoảng cho thứ năm, hoặc (iii) không chứa phân đoạn di truyền chứa khoảng cho thứ hai, khoảng cho thứ ba và khoảng cho thứ tư và có bên sườn là a) chỉ thị SYN14136 và chỉ thị MA0004, b) chỉ thị PZE-108076510 và chỉ thị MA0004, c) chỉ thị SYN14136 và chỉ thị MA0005 hoặc d) chỉ thị PZE-108076510 và chỉ thị MA0005, và khoảng cho thứ năm.

Một phương án được ưu tiên đặc biệt khác của cây ngô theo sáng chế là cây ngô như được mô tả ở trên, trong đó đoạn nhiễm sắc thể chứa (i) không chứa phân đoạn di truyền chứa khoảng cho thứ hai, khoảng cho thứ ba và khoảng cho thứ tư và có bên sườn là a) chỉ thị SYN14136 và chỉ thị MA0021 hoặc b) chỉ thị PZE-108076510 và chỉ thị MA0021, hoặc (ii) không chứa phân đoạn di truyền chứa khoảng cho thứ hai, khoảng cho thứ ba và khoảng cho thứ tư và có bên sườn là a) chỉ thị SYN14136 và chỉ thị MA0021 hoặc b) chỉ thị PZE-108076510 và chỉ thị MA0021, và khoảng cho thứ năm, hoặc (iii) không chứa phân đoạn di truyền chứa khoảng cho thứ hai, khoảng cho thứ ba và khoảng cho thứ tư và có bên sườn là a) chỉ thị SYN14136 và chỉ thị MA0021 hoặc b) chỉ thị PZE-108076510 và chỉ thị MA0021, và phân đoạn di truyền thứ hai chứa khoảng cho thứ năm và có bên sườn là a) chỉ thị MA0022 và chỉ thị PZE-108107671, b) chỉ thị MA0022 và chỉ thị SYN4196, c) chỉ thị MA0013 và chỉ thị PZE-108107671 hoặc chỉ thị MA0013 và chỉ thị SYN4196, hoặc (iv) không chứa phân đoạn di truyền chứa khoảng cho thứ hai và khoảng cho thứ ba và có bên sườn là a) chỉ thị SYN14136 và chỉ thị PZE-108093423, b) chỉ thị PZE-108076510 và chỉ thị PZE-108093423, c) chỉ thị SYN14136 và chỉ thị PZE-108093748 hoặc d) chỉ thị PZE-108076510 và chỉ thị PZE-108093748, và phân đoạn di truyền thứ hai chứa khoảng cho thứ năm và có bên sườn là a) chỉ thị MA0022 và chỉ thị PZE-108107671, b) chỉ thị MA0022 và chỉ thị SYN4196, c) chỉ thị MA0013 và chỉ thị PZE-108107671 hoặc chỉ thị MA0013 và chỉ thị SYN4196, hoặc (v) không chứa phân đoạn di truyền chứa khoảng cho thứ hai, khoảng cho thứ ba và khoảng cho thứ tư và có bên sườn là a) chỉ thị SYN14136 và chỉ thị MA0021 hoặc b) chỉ thị PZE-108076510 và chỉ thị MA0021, và phân đoạn di truyền thứ hai chứa khoảng cho thứ năm và có bên sườn là a) chỉ thị MA0022 và chỉ thị PZE-108107671, b) chỉ thị MA0022 và chỉ thị SYN4196, c) chỉ thị MA0013 và chỉ thị PZE-108107671 hoặc chỉ thị MA0013 và chỉ thị SYN4196.

Mục tiêu tạo nên cơ sở của sáng chế được hoàn thành theo cách khác thông qua cây ngô có hệ gen đã kết hợp đoạn nhiễm sắc thể từ thể cho Pepitilla, trong đó đoạn nhiễm sắc thể này chứa khoảng cho thứ nhất có alen cho theo kiểu đơn trong Bảng 2 và chứa polynucleotit tạo ra tính kháng kháng *Helminthosporium turcicum*, và trong đó đoạn nhiễm sắc thể này không chứa i) khoảng cho thứ tư ở giữa chỉ thị trong vùng chỉ thị thứ ba có bên sườn là chỉ thị PZE-108093423 và chỉ thị PZE-108093748, và chỉ thị trong vùng chỉ thị thứ tư có bên sườn là chỉ thị MA0004 và chỉ thị MA0005, hoặc ii) phân đoạn di truyền có khoảng thứ tư ở giữa chỉ thị trong vùng chỉ thị thứ ba M3 và chỉ thị trong vùng chỉ thị thứ bảy M7 có bên sườn là chỉ thị MA0005 và chỉ thị MA0021. Phần mô tả ở trên, ví dụ, về phần các chỉ thị thì polynucleotit hoặc kiểu hình cũng có khả dụng trong trường hợp này và đối với mọi giải pháp thay thế khác cho vấn đề này, cũng như các phương án đã bộc lộ.

Một phương án được ưu tiên của cây ngô theo sáng chế là cây ngô như được mô tả ở trên, trong đó đoạn nhiễm sắc thể này i) không chứa khoảng cho thứ tư mà có bên sườn là a) b chỉ thị PZE-108093423 và chỉ thị MA0004, b) chỉ thị PZE-108093748 và chỉ thị MA0004, c) chỉ thị PZE-108093423 và chỉ thị MA0005 hoặc d) chỉ thị PZE-108093748 và chỉ thị MA0005, hoặc ii) không chứa phân đoạn di truyền chứa khoảng cho thứ tư và có bên sườn là a) chỉ thị PZE-108093423 và chỉ thị MA0021 hoặc b) chỉ thị PZE-108093748 và chỉ thị MA0021.

Một phương án được ưu tiên khác của cây ngô theo sáng chế là cây ngô như được mô tả ở bên trên, trong đó đoạn nhiễm sắc thể không chứa thêm khoảng cho thứ ba ở giữa chỉ thị trong vùng chỉ thị thứ hai M2 và chỉ thị trong vùng chỉ thị thứ ba M3.

Một phương án được ưu tiên khác của cây ngô theo sáng chế là cây ngô như được mô tả ở trên, trong đó đoạn nhiễm sắc thể không chứa phân đoạn di truyền chứa khoảng thứ ba và khoảng cho thứ tư và có bên sườn là a) chỉ thị SYN24931 và chỉ thị MA0004, b) chỉ thị PZE-108077560 và chỉ thị MA0004, c) chỉ thị SYN24931 và chỉ thị MA0005, d) chỉ thị PZE-108077560 và chỉ thị MA0005, e) chỉ thị SYN24931 và chỉ thị MA0021 hoặc f) chỉ thị PZE-108077560 và chỉ thị MA0021.

Một phương án được ưu tiên khác của cây ngô theo sáng chế là cây ngô như được mô tả ở bên trên, trong đó đoạn nhiễm sắc thể i) không chứa thêm khoảng cho thứ năm ở giữa chỉ thị trong vùng chỉ thị thứ năm M5 và chỉ thị trong vùng chỉ thị thứ sáu M6 hoặc ii) không chứa phân đoạn di truyền có khoảng thứ năm ở giữa chỉ thị trong vùng chỉ thị thứ tám M8 và chỉ thị trong vùng chỉ thị thứ sáu M6.

Một phương án được ưu tiên đặc biệt khác của cây ngô theo sáng chế là cây ngô như được mô tả ở bên trên, trong đó đoạn nhiễm sắc thể i) không chứa phân đoạn di truyền chứa khoảng thứ ba và khoảng cho thứ tư và có bên sườn là a) chỉ thị SYN24931 và chỉ thị MA0004, b) chỉ thị PZE-108077560 và chỉ thị MA0004, c) chỉ thị SYN24931 và chỉ thị MA0005 hoặc d) chỉ thị PZE-108077560 và chỉ thị MA0005, và khoảng thứ năm, hoặc ii) không chứa phân đoạn di truyền chứa khoảng thứ ba và khoảng cho thứ tư và có bên sườn là a) chỉ thị SYN24931 và chỉ thị MA0004, b) chỉ thị PZE-108077560 và chỉ thị MA0004, c) chỉ thị SYN24931 và chỉ thị MA0005 hoặc d) chỉ thị PZE-108077560 và chỉ thị MA0005, và phân đoạn di truyền thứ hai chứa khoảng thứ năm và có bên sườn là a) chỉ thị MA0022 và chỉ thị SYN4196, b) chỉ thị MA0022 và chỉ thị PZE-108107671, c) chỉ thị MA0013 và chỉ thị SYN4196 hoặc chỉ thị MA0013 và chỉ thị PZE-108107671.

Một phương án được ưu tiên đặc biệt khác của cây ngô theo sáng chế là cây ngô như được mô tả ở bên trên, trong đó đoạn nhiễm sắc thể i) không chứa phân đoạn di truyền chứa khoảng thứ ba và khoảng cho thứ tư và có bên sườn là a) chỉ thị SYN24931 và chỉ thị MA00021 hoặc b) chỉ thị PZE-108077560 và chỉ thị MA00021, và khoảng thứ năm, hoặc ii) không chứa phân đoạn di truyền chứa khoảng cho thứ ba và khoảng cho thứ tư và có bên sườn là a) chỉ thị SYN24931 và chỉ thị MA00021 hoặc b) chỉ thị PZE-108077560 và chỉ thị MA00021, và phân đoạn di truyền thứ hai chứa khoảng thứ năm và có bên sườn là a) chỉ thị MA0022 và chỉ thị PZE-108107671, b) chỉ thị MA0022 và chỉ thị SYN4196, c) chỉ thị MA0013 và chỉ thị PZE-108107671 hoặc chỉ thị MA0013 và chỉ thị SYN4196.

Theo cách khác, mục tiêu của sáng chế còn được hoàn thành thông qua cây ngô, có hệ gen đã kết hợp đoạn nhiễm sắc thể từ thể cho Pepitilla, trong đó đoạn nhiễm sắc thể này chứa khoảng cho thứ nhất có alen cho theo kiểu đơn trong bảng 2

và chứa polynucleotit tạo ra tính kháng kháng *Helminthosporium turcicum* ở cây ngô, và trong đó đoạn nhiễm sắc thể này không chứa i) khoảng cho thứ năm ở giữa chỉ thị trong vùng chỉ thị thứ năm có bên sườn là chỉ thị MA0006 và chỉ thị PZE-108097482, và chỉ thị trong vùng chỉ thị thứ sáu có bên sườn là chỉ thị PZE-108107671 và chỉ thị SYN4196, hoặc ii) phân đoạn di truyền có khoảng thứ năm ở giữa chỉ thị trong vùng chỉ thị thứ tám M8 có bên sườn là chỉ thị MA0022 và chỉ thị MA0013, và chỉ thị trong vùng chỉ thị thứ sáu M6 có bên sườn là chỉ thị PZE-108107671 và chỉ thị SYN4196.

Một phương án được ưu tiên khác của cây ngô theo sáng chế là cây ngô như được mô tả ở bên trên, trong đó đoạn nhiễm sắc thể không chứa thêm khoảng cho thứ ba ở giữa chỉ thị trong vùng chỉ thị thứ hai M2 và chỉ thị trong vùng chỉ thị thứ ba M3.

Một phương án được ưu tiên đặc biệt khác của cây ngô theo sáng chế là cây ngô như được mô tả ở trên, trong đó đoạn nhiễm sắc thể có bên sườn là a) chỉ thị trong vùng chỉ thị thứ hai M2 và chỉ thị trong vùng chỉ thị thứ sáu M6, b) chỉ thị trong vùng chỉ thị thứ ba M3 và chỉ thị trong vùng chỉ thị thứ sáu M6, c) chỉ thị trong vùng chỉ thị thứ tư M4 và chỉ thị trong vùng chỉ thị thứ sáu M6, d) chỉ thị trong vùng chỉ thị thứ bảy M7 và chỉ thị trong vùng chỉ thị thứ sáu M6, e) chỉ thị trong vùng chỉ thị M1 và chỉ thị trong vùng chỉ thị M5, f) chỉ thị trong vùng chỉ thị thứ hai M2 và chỉ thị trong vùng chỉ thị thứ năm M5, g) chỉ thị trong vùng chỉ thị thứ ba M3 và chỉ thị trong vùng chỉ thị thứ năm M5, h) chỉ thị trong vùng chỉ thị thứ tư M4 và chỉ thị trong vùng chỉ thị thứ năm M5, i) chỉ thị trong vùng chỉ thị thứ bảy M7 và chỉ thị trong vùng chỉ thị thứ năm M5, j) chỉ thị trong vùng chỉ thị M1 và chỉ thị trong vùng chỉ thị M8, k) chỉ thị trong vùng chỉ thị thứ hai M2 và chỉ thị trong vùng chỉ thị thứ tám M8, l) chỉ thị trong vùng chỉ thị thứ ba M3 và chỉ thị trong vùng chỉ thị thứ tám M8, m) chỉ thị trong vùng chỉ thị thứ tư M4 và chỉ thị trong vùng chỉ thị thứ tám M8, hoặc n) chỉ thị trong vùng chỉ thị thứ bảy M7 và chỉ thị trong vùng chỉ thị thứ tám M8.

Một phương án được ưu tiên đặc biệt khác của cây ngô theo sáng chế là cây ngô như được mô tả trên, trong đó đoạn nhiễm sắc thể có bên sườn là a) chỉ thị SYN24931 và chỉ thị SYN4196, b) chỉ thị PZE-108077560 và chỉ thị SYN4196, c)

chỉ thị SYN24931 và chỉ thị PZE-108107671, d) chỉ thị PZE-108077560 và chỉ thị PZE-108107671, e) chỉ thị PZE-108093423 và chỉ thị SYN4196, f) chỉ thị PZE-108093748 và chỉ thị SYN4196, g) chỉ thị PZE-108093423 và chỉ thị PZE-108107671, h) chỉ thị PZE-108093748 và chỉ thị PZE-108107671, i) chỉ thị MA0004 và chỉ thị SYN4196, j) chỉ thị MA0005 và chỉ thị SYN4196, k) chỉ thị MA0004 và chỉ thị PZE-108107671, l) chỉ thị MA0005 và chỉ thị PZE-108107671, m) chỉ thị MA0021 và chỉ thị SYN4196, n) chỉ thị MA0021 và chỉ thị PZE-108107671, o) chỉ thị PZE-108076510 và chỉ thị MA0006, p) chỉ thị SYN14136 và chỉ thị MA0006, q) chỉ thị PZE-108076510 và chỉ thị PZE-108097482, r) chỉ thị SYN14136 và chỉ thị PZE-108097482, s) chỉ thị SYN24931 và chỉ thị PZE-108097482, t) chỉ thị PZE-108077560 và chỉ thị PZE-108097482, u) chỉ thị SYN24931 và chỉ thị MA0006, v) chỉ thị PZE-108077560 và chỉ thị MA0006, w) chỉ thị PZE-108093423 và chỉ thị PZE-108097482, x) chỉ thị PZE-108093748 và chỉ thị PZE-108097482, y) chỉ thị PZE-108093423 và chỉ thị MA0006, z) chỉ thị PZE-108093748 và chỉ thị MA0006, aa) chỉ thị MA0004 và chỉ thị PZE-108097482, ab) chỉ thị MA0005 và chỉ thị PZE-108097482, ac) chỉ thị MA0004 và chỉ thị MA0006, ad) chỉ thị MA0005 và chỉ thị MA0006, ae) chỉ thị MA0021 và chỉ thị PZE-108097482, af) chỉ thị MA0021 và chỉ thị MA0006, ag) chỉ thị PZE-108076510 và chỉ thị MA0013, ah) chỉ thị SYN14136 và chỉ thị MA0013, ai) chỉ thị PZE-108076510 và chỉ thị MA0022, aj) chỉ thị SYN14136 và chỉ thị MA0022, ak) chỉ thị SYN24931 và chỉ thị MA0013, al) chỉ thị PZE-108077560 và chỉ thị MA0013, am) chỉ thị SYN24931 và chỉ thị MA0022, an) chỉ thị PZE-108077560 và chỉ thị MA0022, ao) chỉ thị PZE-108093423 và chỉ thị MA0013, ap) chỉ thị PZE-108093748 và chỉ thị MA0013, aq) chỉ thị PZE-108093423 và chỉ thị MA0022, ar) chỉ thị PZE-108093748 và chỉ thị MA0022, as) chỉ thị MA0004 và chỉ thị MA0013, at) chỉ thị MA0005 và chỉ thị MA0013, au) chỉ thị MA0004 và chỉ thị MA0022, av) chỉ thị MA0005 và chỉ thị MA0022, aw) chỉ thị MA0021 và chỉ thị MA0013, ax) chỉ thị MA0021 và chỉ thị MA0022.

Một phương án được ưu tiên đặc biệt khác của cây ngô theo sáng chế là cây ngô như được mô tả trên, trong đó đoạn nhiễm sắc thể được định vị a) ở giữa chỉ thị trong vùng chỉ thị thứ hai M2 và chỉ thị trong vùng chỉ thị thứ sáu M6, b) ở giữa chỉ thị trong vùng chỉ thị thứ ba M3 và chỉ thị trong vùng chỉ thị thứ sáu M6, c) ở giữa

chỉ thị trong vùng chỉ thị thứ tư M4 và chỉ thị trong vùng chỉ thị thứ sáu M6, d) ở giữa chỉ thị trong vùng chỉ thị thứ bảy M7 và chỉ thị trong vùng chỉ thị thứ sáu M6, e) ở giữa chỉ thị trong vùng chỉ thị thứ nhất M1 và chỉ thị trong vùng chỉ thị thứ năm M5 f) ở giữa chỉ thị trong vùng chỉ thị thứ hai M2 và chỉ thị trong vùng chỉ thị thứ năm M5, g) ở giữa chỉ thị trong vùng chỉ thị thứ ba M3 và chỉ thị trong vùng chỉ thị thứ năm M5, h) ở giữa chỉ thị trong vùng chỉ thị thứ tư M4 và chỉ thị trong vùng chỉ thị thứ năm M5, i) ở giữa chỉ thị trong vùng chỉ thị thứ bảy M7 và chỉ thị trong vùng chỉ thị thứ năm M5, j) ở giữa chỉ thị trong vùng chỉ thị M1 và chỉ thị trong vùng chỉ thị M8, k) ở giữa chỉ thị trong vùng chỉ thị thứ hai M2 và chỉ thị trong vùng chỉ thị thứ tám M8, l) ở giữa chỉ thị trong vùng chỉ thị thứ ba M3 và chỉ thị trong vùng chỉ thị thứ tám M8, m) ở giữa chỉ thị trong vùng chỉ thị thứ tư M4 và chỉ thị trong vùng chỉ thị thứ tám M8, or n) ở giữa chỉ thị trong vùng chỉ thị thứ bảy M7 và chỉ thị trong vùng chỉ thị thứ tám M8.

Bảng 4: các trình tự đoạn mồi của chỉ thị KASP và gán cho các alen của thể cho B37HTN1 có nguồn gốc từ giống Pepitilla (alen X và alen Y: mô tả các trị số cặp alen của SNP)

Chỉ thị SNP	Vị trí chỉ thị AGPv02 [bp]	Alen đoạn mồi X(5'-3') [SEQ ID NO]	Alen đoạn mồi Y(5'-3') [SEQ ID NO]	Đoạn mồi chung (5'-3') [SEQ ID NO]	Alen cho B37HTN1 (SNP)	Vùng chỉ thị
SYN14136	131681497	17	18	19	A	M1
PZE-108076510	131905855	20	21	22	G	M1
SYN24931	132877982	23	24	25	A	M2
PZE-108077560	133189880	26	27	28	A	M2
PZE-108093423	150279048	29	30	31	A	M3
PZE-108093748	150562764	32	33	34	G	M3
PZE-108107671	161543406	35	36	37	C	M6

SYN4196	161766769	38	39	40	C	M6
MA0004	151688652	41	42	43	A	M4
MA0005	151831049	44	45	46	C	M4/M7
MA0021	151907173	241	242	243	G	M7
MA0006	152888310	47	48	49	A	M5
PZE-108097482	153139646	50	51	52	A	M5
MA0002	147720853	53	54	55	A	
MA0003	151346184	56	57	58	C	
MA0007	152045106	59	60	61	T	
MA0008	152045141	62	63	64	T	
MA0009	152045402	65	66	67	T	
MA0010	152045516	68	69	70	C	
MA0011	152045912	71	72	73	T	
MA0012	152046502	74	75	76	A	
MA0022	152046529	244	245	246	A	M8
MA0013	152133057	77	78	79	G	M8
MA0014	152133380	80	81	82	T	
MA0015	152144310	83	84	85	A	
MA0016	152250992	86	87	88	A	
MA0017	152301656	89	90	91	A	
MA0018	152304127	92	93	94	A	
MA0019	152630794	95	96	97	C	
MA0020	152753635	98	99	100	A	
PZE-108095998	152433358	101	102	103	T	
PZE-108096011	152435855	104	105	106	A	
PZE-108096610	152703579	107	108	109	C	
PZE-108096791	152887338	110	111	112	G	

Ngoài ra, sáng chế đề cập đến hạt giống hoặc hạt, mô, cơ quan, phần và tế bào của các cây ngô theo sáng chế được mô tả ở trên. Về vấn đề này, hạt giống hoặc hạt

này là hạt giống hoặc hạt có hệ gen đã kết hợp đoạn nhiễm sắc thể theo phương án của sáng chế được mô tả ở trên.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp xác định cây ngô kháng *H. turcicum* có hệ gen đã kết hợp đoạn nhiễm sắc thể từ thể cho Pepitilla, bao gồm các đời sau của ít nhất là hai alen trong hệ gen của cây, trong đó ít nhất một alen được định vị trong phân đoạn hệ gen có bên sườn là chỉ thị trong vùng chỉ thị thứ nhất M1, vùng chỉ thị thứ hai M2, vùng chỉ thị thứ ba M3, vùng chỉ thị thứ tư M4 hoặc vùng chỉ thị thứ bảy M7, và polynucleotit được mô tả ở trên mà tạo ra tính kháng với *H. turcicum* ở cây ngô, và trong đó ít nhất một alen được định vị trong phân đoạn hệ gen có bên sườn là chỉ thị trong vùng chỉ thị thứ sáu M6, vùng chỉ thị thứ năm M5 hoặc vùng chỉ thị thứ tám M8. Các vùng chỉ thị và các chỉ thị lấy làm ví dụ trong các miền chỉ thị này được mô tả ở trên. Tốt hơn nếu, cây ngô đã nhận biết là cây ngô theo sáng chế. Hơn nữa, sáng chế cũng quan tâm cây ngô mà đã được nhận biết bằng cách sử dụng phương pháp nhận biết được đề cập.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp gia tăng năng suất của cây ngô kháng *H. turcicum*, có hệ gen đã kết hợp đoạn nhiễm sắc thể từ thể cho Pepitilla, trong đó phương pháp này bao gồm bước loại bỏ khoảng cho thứ hai, khoảng cho thứ tư hoặc khoảng cho thứ năm và trong đó đoạn nhiễm sắc thể này chứa khoảng cho thứ nhất được mô tả ở trên chứa alen cho theo kiểu đơn trong bảng 2 và polynucleotit tạo ra tính kháng với *Helminthosporium turcicum* ở cây ngô. Ví dụ, việc loại bỏ có thể được thực hiện bằng cách tái tổ hợp di truyền trong quy trình lai giữa hai cây ngô, trong đó cây ngô bố mẹ mang locus kháng HTN1 từ Pepitilla. Bên cạnh việc sử dụng kỹ thuật sinh sản thông thường để có được sự tái tổ hợp di truyền có kết quả là thay thế được ít nhất một trong các khoảng cho có liên kết bất lợi nhận biết ở trên bằng các trình tự hệ gen của bố mẹ tuần hoàn mà tốt hơn nếu không có các gen không mong muốn, thì công nghệ sinh học hiện đại cung cấp cho người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này nhiều công cụ có thể giúp cho việc thiết kế di truyền được tiến hành chính xác. Các ví dụ về các công cụ đã biết này là meganucleaza (Silva et al., 2011), endonucleaza về tổ (Chevalier 2002), nucleaza ngón tay kẽm, nucleaza TALE (WO 2010/079430; WO 2011/072246) hoặc CRISPR (Gaj et al., 2013). Các protein dung

hợp nucleaza nhân tạo có khả năng phân tách các phân tử axit nucleic chuỗi đôi như ADN cây và vì vậy tạo ra các lỗi gãy đôi ở vị trí mong muốn trong hệ gen. Bằng cách tận dụng cơ chế của chính tế bào để sửa chữa các lỗi gãy đôi được cảm ứng, việc tái tổ hợp tương đồng hoặc “kết nối đầu cuối có tính chất không tương đồng” có thể được tiến hành, mà có thể dẫn đến việc loại bỏ các khoảng cho mang liên kết bất lợi. Các trình tự đích trong hệ gen thích hợp với miền nhận diện của nucleaza có thể được chọn, ví dụ, từ thông tin trình tự cho các chỉ thị SNP (Bảng 4) hoặc trong các khoảng của chúng. Tuy nhiên, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này cũng có thể biết được các trình tự khác, tốt hơn nếu nằm bên trong hoặc ở giữa sáu vùng chỉ thị được mô tả ở trên, mà thích hợp làm trình tự đích cho các miền nhận diện của nucleaza.

Về vấn đề này, phần mô tả này sẽ mô tả chi tiết hơn về hai phương pháp thiết kế di truyền, có sự trợ giúp trong đó việc loại bỏ các trình tự nucleotit mang liên kết bất lợi từ hệ gen cây được hỗ trợ hoặc thu được trực tiếp. Các phương pháp sau cũng như phương pháp sinh sản thông thường có thể được dùng để tạo ra cây ngô theo sáng chế.

Như đã đề cập, các công cụ phân tử hiện có có khả năng cảm ứng các lỗi gãy đôi ở các vị trí đã xác định trong hệ gen của ADN cây. Về vấn đề này, việc sử dụng nucleaza TALE (TALEN) hoặc nucleaza ngón tay kềm (ZFN) đã cho thấy là đặc biệt có lợi. Miền nhận diện TALE hoặc ZF giúp nó có thể liên kết đặc hiệu với vị trí bất kỳ trong hệ gen. Theo hiểu biết về trình tự trong vùng đích, các miền nhận diện TALE hoặc ZF có thể được biến đổi sao cho chúng liên kết độc quyền với các vị trí mong muốn trong hệ gen. Nếu, ví dụ, trình tự nhận diện được hợp nhất với endonucleaza không đặc hiệu như FokI, thì lỗi gãy đôi (double strand break - DSB) có thể được cảm ứng ở các vị trí đã xác định trong hệ gen, cho phép thiết kế hệ gen có mục đích (Tzfira et al., 2012; Li et al., 2011; Puchta and Hohn 2010). Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ quen với việc xử lý endonucleaza FokI và tạo ra các TALEN và ZFN thích hợp từ tình trạng kỹ thuật.

Lỗi gãy đôi được cảm ứng có thể, ví dụ, kích thích sự tái tổ hợp tương đồng giữa locus gen đích nội sinh (ví dụ, một trong các vùng chỉ thị ở trên) và đoạn ADN tương đồng được nhập nội ngoại sinh mà, ví dụ, không phải là chất mang của liên kết bất lợi (ví dụ, trên vectơ thể cho thích hợp). Công đoạn gọi là thay thế gen hoặc chỉnh

sửa hệ gen này có thể được thực hiện *in vitro* và không cần phải có bất cứ bước lai nào giữa hai cây. Nhằm mục đích này, các cây cần biến đổi một mặt phải được biến nạp tạm thời với axit nucleic mã hóa TALEN hoặc ZFN được chỉ định, và mặt khác là với đoạn ADN ngoại sinh. Đoạn ADN nói đến ở đây có thể bắt nguồn từ cây cùng loài và, ví dụ, tương ứng với phân đoạn nhiễm sắc thể cần được thay thế, nhưng không có liên kết bất lợi. Sau khi hoàn thành quá trình tái tổ hợp tương đồng được cảm ứng, thì các tế bào với hệ gen đã biến đổi có thể được tái sinh vào cây và sau đó được chọn lọc xem liên kết bất lợi có được loại bỏ thành công không và các yếu tố ADN đã biến nạp từ trước có bị mất một lần nữa trong khi phân chia tế bào tái sinh hay không. Các chỉ thị được mô tả ở trên cũng có thể được sử dụng cho mục đích này. Các phương pháp biến nạp và tái sinh là đã biết trong tình trạng thuật và cũng được mô tả thêm dưới đây.

Hơn nữa, các TALEN và ZFN theo sáng chế cũng có thể được nhập nội nhờ chuyển gen trong quy trình giảm phân, trong đó các lỗi gãy đôi được cảm ứng ở các vị trí định trước trong hệ gen và vì thế xác suất tái tổ hợp ở các vị trí này trong quá trình lai qua các bước tăng lên. Theo cách này, việc loại bỏ liên kết bất lợi có thể được trợ giúp đáng kể. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ nhận thấy rằng, sau khi hoàn tất quy trình giảm phân, thì các cây không có liên kết bất lợi và không có TALEN hoặc ZFN được tạo ra từ tế bào đơn bội. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp tạo ra cây ngô theo sáng chế, mà bao gồm các bước sau: (A) chuẩn bị cây ngô thứ nhất có hệ gen đã kết hợp đoạn nhiễm sắc thể từ thể cho Pepitilla, trong đó đoạn nhiễm sắc thể này chứa khoảng cho thứ nhất có alen cho theo kiểu đơn trong bảng 2 và chứa polynucleotit tạo ra tính kháng kháng *Helminthosporium turcicum* trong cây ngô, và trong đó đoạn nhiễm sắc thể này chứa khoảng cho thứ hai và/hoặc khoảng cho thứ tư và/hoặc khoảng cho thứ năm, (B) tạo ra cây ngô thứ hai, (C) lai cây ngô trong bước (A) với cây ngô trong bước (B), và (D) chọn lọc cây ngô theo sáng chế, tốt hơn là bằng cách sử dụng ít nhất một trong các chỉ thị được mô tả ở trên. Theo cách khác, sáng chế đề cập đến phương pháp tạo ra cây ngô theo sáng chế mà bao gồm các bước sau: (A) biến nạp tạm thời tế bào cây ngô với trình tự nucleotit thứ nhất mà mã hóa protein thứ nhất có hoạt tính endonucleaza (ví dụ, protein dung hợp endonucleaza TALE hoặc ZF) có khả năng cảm ứng lỗi gãy đôi ADN ở giữa vùng chỉ thị M2 và vùng chỉ thị M4 trong tế bào cây ngô, và với trình tự nucleotit thứ

hai mã hóa protein thứ hai có hoạt tính endonucleaza (ví dụ, protein dung hợp endonucleaza TALE hoặc ZF) có khả năng cảm ứng lỗi gây đôi ADN trong hệ gen của tế bào cây ngô ở giữa vùng chỉ thị M5 và vùng chỉ thị M6, (B) đưa tạm thời vector cho vào tế bào cây ngô thứ nhất mang đoạn nhiễm sắc thể từ thể cho Pepitilla, trong đó đoạn nhiễm sắc thể chứa khoảng cho thứ nhất có alen cho theo kiểu đơn trong bảng 2 và chứa polynucleotit tạo ra tính kháng kháng *Helminthosporium turcicum* ở cây ngô, và trong đó đoạn nhiễm sắc thể này còn chứa các phân đoạn nhiễm sắc thể của thể cho Pepitilla giữa các vị trí lỗi gây đôi từ bước (A) sao cho quy trình tái tổ hợp tương đồng diễn ra giữa hệ gen của tế bào cây ngô thứ nhất và đoạn nhiễm sắc thể của vector cho, (C) tái sinh cây ngô từ tế bào cây ngô, (D) nhận biết cây ngô theo sáng chế, tốt hơn là bằng cách sử dụng ít nhất một trong các chỉ thị được mô tả ở trên. Đặc biệt tốt hơn nếu, các trình tự axit nucleic thứ nhất và thứ hai và các vector cho đã được nhập nội tạm thời sẽ mất đi sau đó. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ biết làm thế nào để tiến hành việc này và phát hiện ra nó.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế bao gồm các chỉ thị được mô tả ở trên là các oligonucleotit, cụ thể là oligonucleotit đoạn môi. Tốt hơn nếu, các oligonucleotit này là các oligonucleotit đã được phân lập. Oligonucleotit chứa phân tử axit nucleic có trình tự nucleotit được chọn từ một trong các SEQ ID NO: 41-49, 53-100 và 229-250. Hơn nữa, sáng chế đề cập đến oligonucleotit chứa phân tử axit nucleic có trình tự nucleotit được chọn từ một trong các SEQ ID NO: 17-250, sử dụng để nhận biết cây ngô kháng *H. turcicum*. Tốt hơn nếu, tính kháng này có được từ thể cho Pepitilla và là HTN1.

Ngoài ra, vấn đề của sáng chế được giải quyết theo cách khác thông qua cây chuyển gen, cụ thể là cây ngô chuyển gen, chứa tế bào cây chuyển gen như được mô tả dưới đây. Hơn nữa, sáng chế cũng đề cập đến một phần của cây theo sáng chế này, trong đó phần này có thể là tế bào, mô, cơ quan hoặc dạng kết hợp của một vài tế bào, mô hoặc cơ quan. Ví dụ về dạng kết hợp của một vài cơ quan là hoa hoặc hạt giống. Theo một phương án cụ thể, sáng chế đề cập đến hạt giống từ cây chuyển gen, trong đó hạt giống chứa polynucleotit theo sáng chế là gen chuyển, như được mô tả dưới đây. Tốt hơn nếu, cây chuyển gen theo sáng chế, cụ thể là cây thuộc loài *Zea mays*, có tính kháng *H. turcicum* cao hơn so với cây không được biến nạp tương ứng (cây đăng

gen không có gen chuyển). Cây kháng HT chuyển gen theo sáng chế có tính kháng *H. turcicum* tăng ít nhất một điểm số phân loại, tốt hơn nếu ít nhất là 2 điểm số phân loại hoặc ít nhất là 3 điểm số phân loại và đặc biệt tốt hơn nếu ít nhất là 4 điểm số phân loại (xem biểu đồ điểm số phân loại trong Bảng 3).

Ngoài ra, sáng chế đề cập đến phương pháp tạo ra cây chuyển gen bao gồm bước đưa polynucleotit theo sáng chế hoặc vector theo sáng chế được mô tả dưới đây vào tế bào cây, và tùy ý bước chọn lọc tế bào cây chuyển gen. Hơn nữa, phương pháp tạo ra cây chuyển gen kiểu này được đặc trưng bởi bước tiếp theo mà bao gồm việc tái sinh cây chuyển gen từ tế bào cây chuyển gen đã tạo ra trong bước thứ nhất. Các phương pháp tái sinh là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này từ tình trạng kỹ thuật.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế bộc lộ polynucleotit chứa một hoặc nhiều gen tạo ra tính kháng của locus HTN1 từ *Pepitilla* (bảng 1) hoặc được chọn từ RLK1 và EXT1 (xem Bảng 1) hoặc alen gen của chúng. Các gen hoặc alen gen có thể đem lại kiểu hình kháng với đặc tính điển hình của HTN1 trong các điều kiện xâm nhiễm *H. turcicum*. Về mặt cấu trúc, polynucleotit này đặc trưng ở chỗ nó chứa phân tử axit nucleic mà (a) chứa trình tự nucleotit tương ứng với các SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 hoặc 15, (b) chứa trình tự nucleotit có độ đồng nhất ít nhất là 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% với một trong các trình tự nucleotit tương ứng với các SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 và 15, tốt hơn là trên toàn bộ chiều dài trình tự đó, (c) lai với chuỗi bổ trợ của phân tử axit nucleic theo mục (a) hoặc mục (b) trong các điều kiện nghiêm ngặt, (d) mã hóa polypeptit có trình tự axit amin tương ứng với các SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 hoặc 16, hoặc (e) mã hóa polypeptit với trình tự axit amin có độ đồng nhất ít nhất là 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% với một trong các trình tự axit amin theo mục (d). Theo một phương án được ưu tiên, polynucleotit này đặc trưng ở chỗ nó chứa phân tử axit nucleic mà (aa) chứa trình tự nucleotit tương ứng với SEQ ID NO: 1 hoặc 5, (bb) chứa trình tự nucleotit với độ đồng nhất ít nhất là 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% với một trong các trình tự nucleotit tương ứng với SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 5, tốt

hơn nếu là trên toàn bộ chiều dài của trình tự đó, (cc) lai với chuỗi bổ trợ của phân tử axit nucleic theo mục (aa) hoặc mục (bb) trong các điều kiện nghiêm ngặt, (dd) mã hóa polypeptit với trình tự axit amin tương ứng với SEQ ID NO: 2 hoặc SEQ ID NO: 6, hoặc (ee) mã hóa polypeptit với trình tự axit amin có độ đồng nhất ít nhất là 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% với một trong các trình tự axit amin theo mục (dd). Tốt hơn nếu, polynucleotit này có thể được phân lập và/hoặc tinh chế từ môi trường di truyền tự nhiên của nó hoặc về cơ bản có mặt ở dạng tinh khiết hoặc đồng nhất. Tốt hơn nếu, polynucleotit này là ADN, và đặc biệt tốt hơn nếu là cADN, tức là polynucleotit chứa cADN từ một hoặc nhiều gen tạo ra tính kháng (Bảng 1). Tuy nhiên, nó cũng có thể có mặt dưới dạng ARN. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ biết làm thế nào để suy ra trình tự ADN hệ gen từ thông tin trình tự được bộc lộ trong bản mô tả này. Polynucleotit theo sáng chế mã hóa ít nhất một polypeptit mà có khả năng tạo ra tính kháng chống lại mầm bệnh *Helminthosporium turcicum* ở cây trong đó polypeptit này được biểu hiện. Tốt hơn nếu, polypeptit này được mã hóa bởi polynucleotit theo sáng chế hoặc các phần của nó, tốt hơn nếu tạo ra tính kháng với mầm bệnh *Helminthosporium turcicum*, đặc biệt là ở cây thuộc giống *Zea* hoặc cây thuộc loài *Zea mays*.

Ngoài ra, sáng chế cũng đề cập đến polypeptit có khả năng tạo ra tính kháng *H. turcicum* ở cây trong đó polypeptit này được biểu hiện và được mã hóa bằng polynucleotit theo sáng chế hoặc một phần của nó. Tốt hơn nếu, polypeptit này chứa trình tự axit amin tương ứng với các SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 hoặc 16 hoặc, đặc biệt tốt hơn nếu, trình tự axit amin này tương ứng với SEQ ID NO: 2 hoặc SEQ ID NO: 6. Polypeptit này có thể là polypeptit đã phân lập.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến vectơ chứa polynucleotit theo sáng chế. Vectơ này có thể là plasmid, cosmit, thể thực khuẩn hoặc vectơ biểu hiện, vectơ biến nạp, vectơ con thoi hoặc vectơ tách dòng, nó có thể là chuỗi đôi hoặc chuỗi đơn, thẳng hoặc vòng, hoặc nó có thể là vật chủ nhân rải rác hoặc nhân điển hình, bằng cách kết hợp vào hệ gen của nó hoặc biến nạp ngoài nhiễm sắc thể. Tốt hơn nếu, polynucleotit theo sáng chế liên kết điều khiển được trong vectơ biểu hiện với một hoặc nhiều trình tự điều hòa mà cho phép phiên mã và tùy ý cả biểu hiện trong tế bào chủ

nhân rải rác hoặc nhân điển hình. Ví dụ, polynucleotit này có thể là dưới sự kiểm soát của gen khởi đầu hoặc gen kết thúc thích hợp. Gen khởi đầu thích hợp có thể là gen khởi đầu mà cơ bản được cảm ứng (ví dụ: gen khởi đầu 35S từ “virus khảm súp lơ” (Odell et al. 1985); gen khởi đầu đặc biệt thích hợp là các gen khởi đầu dễ cảm ứng mầm bệnh (ví dụ: gen khởi đầu PR1 từ mùi tây (Rushton et al., 1996)). Gen khởi đầu dễ cảm ứng mầm bệnh đặc biệt thích hợp là gen khởi đầu tổng hợp hoặc khảm không có trong tự nhiên, gồm một vài yếu tố và chứa gen khởi đầu tối thiểu cũng như, đầu nghịch của gen khởi đầu tối thiểu, ít nhất một yếu tố điều hòa cis mà đóng vai trò là vị trí liên kết cho các yếu tố phiên mã đặc biệt. Gen khởi đầu khảm được thiết kế tùy chỉnh và được cảm ứng bằng các yếu tố khác nhau hoặc được môi lại. Các ví dụ về các gen khởi đầu này có thể được tìm thấy trong WO 2000/29592 và WO 2007/147395. Ví dụ về gen kết thúc thích hợp là gen kết thúc nos (Depicker et al., 1982).

Bên cạnh vector được mô tả ở trên, sáng chế cũng đề cập đến phương pháp bao gồm bước đưa vector như được mô tả vào tế bào chủ. Vector này có thể, ví dụ, được nhập nội bằng cách liên hợp, huy động, biến nạp bắn gen, biến nạp truyền qua agrobacterium, chuyển nhiễm, tải nạp, thẩm lọc chân không hoặc xung điện. Các phương pháp kiểu này cũng như các phương pháp tạo ra vector đã mô tả là quen thuộc đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này (Sambrook et al. 2001).

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến tế bào chủ chứa polynucleotit theo sáng chế hoặc vector theo sáng chế. Theo ngữ cảnh của sáng chế, tế bào chủ có thể là tế bào nhân rải rác (ví dụ, vi khuẩn) hoặc tế bào nhân điển hình (ví dụ, tế bào cây hoặc tế bào nấm men). Tốt hơn nếu, enzym là agrobacterium như *Agrobacterium tumefaciens* hoặc *Agrobacterium rhizogenes*, hoặc tế bào cây chứa polynucleotit theo sáng chế hoặc vector theo sáng chế. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã quen với nhiều phương pháp như liên hợp hoặc xung điện để đưa polynucleotit theo sáng chế hoặc vector theo sáng chế vào agrobacterium, và cả các phương pháp như các phương pháp biến nạp khác nhau (biến nạp bắn gen, biến nạp truyền qua agrobacterium) mà polynucleotit theo sáng chế hoặc vector theo sáng chế có thể được nhập nội vào tế bào cây bằng các phương pháp đó (Sambrook et al. 2001).

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến tế bào cây chuyển gen chứa polynucleotit theo sáng chế là gen chuyển hoặc vector theo sáng chế. Tế bào cây chuyển gen thuộc loại này là, ví dụ, tế bào cây được biến nạp với polynucleotit theo sáng chế hoặc với vector theo sáng chế, tốt hơn nếu theo cách ổn định. Theo một phương án được ưu tiên của tế bào cây chuyển gen, polynucleotit liên kết điều khiển được với một hoặc nhiều trình tự điều hòa mà cho phép phiên mã và tùy ý cả biểu hiện trong tế bào cây. Toàn bộ cấu tạo của polynucleotit theo sáng chế và (các) trình tự điều hòa sau đó có thể cấu thành gen chuyển. Các ví dụ về trình tự điều hòa thuộc loại này là gen khởi đầu hoặc gen kết thúc. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ quen với nhiều gen khởi đầu và gen kết thúc chức năng mà có thể được sử dụng trong cây. Tốt hơn nếu, tế bào cây chuyển gen theo sáng chế, cụ thể là tế bào cây thuộc loài *Zea mays*, có tính kháng *H. turcicum* cao hơn so với tế bào cây không được biến nạp tương ứng (tế bào cây (đẳng gen) không có gen chuyển). Tế bào cây kháng HT chuyển gen theo sáng chế có tính kháng *H. turcicum* tăng lên ít nhất một điểm số phân loại, tốt hơn nếu ít nhất là 2 điểm số phân loại hoặc ít nhất là 3 điểm số phân loại và đặc biệt tốt hơn nếu ít nhất là 4 điểm số phân loại (xem biểu đồ phân loại ở Bảng 3). Hơn nữa, sáng chế cũng đề cập đến phương pháp tạo ra tế bào cây chuyển gen theo sáng chế, bao gồm bước đưa polynucleotit theo sáng chế hoặc vector theo sáng chế vào tế bào cây này. Ví dụ, bước đưa vào này có thể được thực hiện bằng cách biến nạp, tốt hơn nếu bằng cách biến nạp ổn định. Kỹ thuật thích hợp để đưa vào như biến nạp bắn gen, biến nạp truyền qua *agrobacterium* hoặc xung điện là đã biết với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này (Sambrook et al. 2001).

Theo một khía cạnh khác, sáng chế cũng đề cập đến phương pháp truyền hoặc tăng tính kháng *H. turcicum* ở cây, tốt hơn nếu là cây thuộc loài *Zea mays*, bao gồm bước biến nạp tế bào cây với polynucleotit theo sáng chế hoặc với vector theo sáng chế. Tốt hơn nếu, phương pháp này thu được tính kháng *H. turcicum* tăng lên ít nhất là 1 điểm số phân loại, tốt hơn nếu ít nhất là 2 điểm số phân loại hoặc ít nhất là 3 điểm số phân loại và đặc biệt tốt hơn nếu ít nhất là 4 điểm số phân loại (xem biểu đồ phân loại ở Bảng 3).

Theo một khía cạnh khác, sáng chế cũng bao gồm phương pháp biến đổi kiểu hình kháng của cây, cụ thể là cây ngô, với mầm bệnh *Helminthosporium turcicum*, bao gồm bước đột biến gen truyền tính kháng của locus HTN1 từ Pepitilla hoặc alen gen được chứa trong đó. Tốt hơn nữa, gen truyền tính kháng của locus HTN1 từ Pepitilla này mã hóa polypeptit tương ứng với SEQ ID NO: 2 hoặc thể tương đồng của polypeptit tương ứng với SEQ ID NO: 2 mà tạo ra kiểu hình kháng với đặc tính điển hình của HTN1 trong các điều kiện xâm nhiễm *H. turcicum*. Gen truyền tính kháng của locus HTN1 từ Pepitilla hoặc alen gen của nó có thể chuyển gen hoặc nội sinh trong hệ gen của cây. Sự biến đổi kiểu hình kháng có thể có nghĩa là sự thay đổi về tính đặc hiệu giống của mầm bệnh và/hoặc sự thay đổi về mức kháng, được đo dưới dạng điểm số phân loại dựa trên các đặc trưng kiểu hình như bề mặt lá bị ảnh hưởng (xem Bảng 3) hoặc được đo dưới dạng giá trị AUDPC (xem Ví dụ 1.C). Tốt hơn nữa, mức kháng sau khi biến đổi kiểu hình kháng ở khoảng giữa mức kháng của cây biểu hiện gen truyền tính kháng không đột biến của locus HTN1 từ Pepitilla và mức kháng của cây đẳng gen không biểu hiện gen truyền tính kháng của locus HTN1 từ Pepitilla; tuy nhiên, mức kháng này cũng có thể cao hơn mức kháng của cây biểu hiện gen truyền tính kháng không đột biến của locus HTN1 từ Pepitilla. Đặc biệt tốt hơn nữa, mức kháng này ở khoảng giữa mức kháng của cây biểu hiện polypeptit tương ứng với SEQ ID NO: 2 và mức kháng của cây đẳng gen không biểu hiện polypeptit tương ứng với SEQ ID NO: 2; tuy nhiên, mức kháng này cũng có thể cao hơn mức kháng của cây biểu hiện polypeptit tương ứng với SEQ ID NO: 2. Cụm từ “gây đột biến” như được sử dụng trong bản mô tả này có thể là sự thay đổi được con người thực hiện trong trình tự di truyền (đột biến). Các ví dụ về vấn đề này là các cây, tế bào cây hoặc các phần cây nhận các chất hóa học, phóng xạ hoặc chất gây đột biến khác với liều cao và sau đó chọn lọc thể đột biến. Theo cách khác, đột biến cũng có thể được thực hiện với, ví dụ, sự trợ giúp của nucleaza TILLING, nucleaza TALE, nucleaza ngón tay kềm hoặc hệ thống CRISPR/Cas, hoặc bằng cách dung hợp, cài xen, làm khuyết hoặc trao đổi trong trình tự ADN hoặc trình tự axit amin. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể có được chỉ dẫn kỹ thuật thích hợp từ tình trạng kỹ thuật liên quan đến quy trình thực hiện các bước đột biến. Tốt hơn nữa, đột biến của gen truyền tính kháng của locus HTN1 từ Pepitilla tạo ra ít nhất một cái biến trao đổi axit amin, ít nhất là hai cái biến

trao đổi axit amin, ít nhất là ba cái biến trao đổi axit amin, hoặc ít nhất là năm hoặc nhiều hơn năm cái biến trao đổi axit amin. Trong trường hợp nhiều cái biến trao đổi axit amin, thì chúng có thể được thực hiện trên các alen gen khác nhau đối với gen truyền tính kháng của locus HTN1 từ Pepitilla, tức là đột biến này có thể là dị hợp tử hoặc nó cũng có thể là đồng hợp tử.

Theo một phương án được ưu tiên của phương pháp biến đổi kiểu hình kháng của cây, đột biến của gen truyền tính kháng của locus HTN1 từ Pepitilla tạo ra đột biến điểm trong trình tự nucleotit tương ứng với SEQ ID NO: 1 ở vị trí 1365 với cái biến trao đổi bazơ của G cho A hoặc ở vị trí 1490 với cái biến trao đổi bazơ của G cho A. Hơn nữa, phương án này cũng đề cập đến đột biến dẫn đến cái biến trao đổi axit amin trong trình tự axit amin tương ứng với SEQ ID NO: 2 ở vị trí 455 từ M (methionin) sang I (isoleuxin) hoặc ở vị trí 497 từ G (glyxin) sang E (axit glutamic). Theo một phương án được ưu tiên khác của phương pháp này, đột biến của gen truyền tính kháng của locus HTN1 từ Pepitilla tạo ra đột biến điểm, dẫn đến cái biến trao đổi axit amin trong trình tự nucleotit tương ứng với SEQ ID NO: 1 giữa vị trí 1365 và vị trí 1490, hoặc phương án đề cập đến đột biến dẫn đến cái biến trao đổi axit amin trong trình tự axit amin tương ứng với SEQ ID NO: 2 giữa vị trí 455 và vị trí 497.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp tạo ra cây, cụ thể là cây ngô, có kiểu hình kháng được cải biến liên quan đến mầm bệnh *Helminthosporium turcicum*, bao gồm bước đột biến gen truyền tính kháng của locus HTN1 từ Pepitilla hoặc alen gen của nó ở ít nhất một tế bào của cây hoặc ở ít nhất một tế bào mà cây được tái sinh từ đó. Ngoài ra, phương pháp này vì thế mà có thể bao gồm bước tái sinh ít nhất một cây từ ít nhất một tế bào đột biến và bước chọn lọc các cây đã tái sinh trên cơ sở kiểu hình kháng đã cải biến liên quan đến mầm bệnh *Helminthosporium turcicum*. Tốt hơn nếu, gen truyền tính kháng của locus HTN1 từ Pepitilla này mã hóa polypeptit tương ứng với SEQ ID NO: 2 hoặc thể tương đồng của polypeptit tương ứng với SEQ ID NO: 2, tạo ra kiểu hình kháng với đặc tính điển hình của HTN1 trong các điều kiện xâm nhiễm *H. turcicum*. Gen truyền tính kháng của locus HTN1 từ Pepitilla hoặc alen gen của nó có thể hiện diện trong cây theo hướng chuyển gen hoặc nội sinh. Biến đổi kiểu hình kháng có thể có nghĩa là sự thay

đổi về tính đặc hiệu giống của mầm bệnh và/hoặc sự thay đổi về mức kháng, được đo dưới dạng điểm số phân loại dựa trên các đặc trưng kiểu hình như bề mặt lá bị ảnh hưởng (xem Bảng 3) hoặc được đo dưới dạng giá trị AUDPC (xem Ví dụ 1.C). Tốt hơn nữa, mức kháng của kiểu hình kháng được cải biến nằm giữa mức kháng của cây biểu hiện gen đã truyền tính kháng không đột biến của locus HTN1 từ Pepitilla và mức kháng của cây đẳng gen mà không biểu hiện gen đã truyền tính kháng của locus HTN1 từ Pepitilla; tuy nhiên, mức kháng này có thể cao hơn mức kháng của cây biểu hiện gen đã truyền tính kháng không đột biến của locus HTN1 từ Pepitilla. Đặc biệt tốt hơn nữa, mức kháng này ở giữa mức kháng của cây biểu hiện polypeptit tương ứng với SEQ ID NO: 2 và mức kháng của cây đẳng gen không biểu hiện polypeptit tương ứng với SEQ ID NO: 2; tuy nhiên, mức kháng này cũng có thể cao hơn mức kháng của cây biểu hiện polypeptit tương ứng với SEQ ID NO: 2. Cụm từ “đột biến” trong bản mô tả này có thể hiểu là sự thay đổi về trình tự di truyền (đột biến) được thực hiện bởi con người. Các ví dụ về vấn đề này là cây, tế bào cây hoặc các phần cây nhận chất hóa học, phóng xạ hoặc chất gây đột biến khác với liều cao và sau đó được chọn lọc các thể đột biến. Theo cách khác, đột biến cũng có thể được tiến hành, ví dụ, với sự trợ giúp của nucleaza TILLING, nucleaza TALE, nucleaza ngón tay kềm hoặc hệ thống CRISPR/Cas hoặc bằng cách dung hợp, cài xen, làm khuyết hoặc trao đổi trong trình tự ADN hoặc trình tự axit amin. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể có được chỉ dẫn kỹ thuật thích hợp từ tình trạng kỹ thuật liên quan đến quy trình thực hiện các bước đột biến. Tốt hơn nữa, đột biến gen truyền tính kháng của locus HTN1 từ Pepitilla tạo ra ít nhất một cải biến trao đổi axit amin, ít nhất là hai cải biến trao đổi axit amin, ít nhất là ba cải biến trao đổi axit amin, ít nhất là năm hoặc nhiều hơn năm cải biến trao đổi axit amin. Trong trường hợp có nhiều cải biến trao đổi axit amin, thì chúng cũng có thể hiện diện trên các alen gen khác nhau của gen truyền tính kháng của locus HTN1 từ Pepitilla, tức là đột biến này có thể là dị hợp tử hoặc thậm chí là đồng hợp tử.

Theo một phương án được ưu tiên của phương pháp tạo ra cây có kiểu hình kháng được cải biến về mầm bệnh *Helminthosporium turcicum*, đột biến của gen truyền tính kháng của locus HTN1 từ Pepitilla tạo ra đột biến điểm trong trình tự nucleotit tương ứng với SEQ ID NO: 1 ở vị trí 1365 với cải biến trao đổi bazơ của G cho A hoặc ở vị trí 1490 với cải biến trao đổi bazơ của G cho A. Hơn nữa, phương

án này cũng đề cập đến đột biến tạo ra cải biến trao đổi axit amin trong trình tự axit amin tương ứng với SEQ ID NO: 2 ở vị trí 455 từ M (methionin) sang I (isoleucin) hoặc ở vị trí 497 từ G (glyxin) sang E (axit glutamic). Theo một phương án được ưu tiên khác của phương pháp này, đột biến của gen truyền tính kháng của locus HTN1 từ Pepitilla tạo ra đột biến điểm, mà dẫn đến cải biến trao đổi axit amin trong trình tự nucleotit tương ứng với SEQ ID NO: 1 ở giữa vị trí 1365 và vị trí 1490, hoặc phương án này đề cập đến đột biến mà dẫn đến cải biến trao đổi axit amin trong trình tự axit amin tương ứng với SEQ ID NO: 2 ở giữa vị trí 455 và vị trí 497.

Sáng chế cũng đề cập đến cây hoặc các phần của nó mà có thể được tạo ra bằng phương pháp tạo ra cây với kiểu hình kháng được cải biến về mầm bệnh *Helminthosporium turcicum*.

Ngoài ra, sáng chế bao gồm cây hoặc phần của nó chứa đột biến trong gen truyền tính kháng của locus HTN1 từ Pepitilla hoặc alen gen của nó. Tốt hơn nếu, đột biến này đem lại kiểu hình kháng được cải biến như được mô tả ở trên. Tốt hơn nếu, gen truyền tính kháng của locus HTN1 từ Pepitilla mã hóa polypeptit tương ứng với SEQ ID NO: 2 hoặc thể tương đồng của polypeptit tương ứng với SEQ ID NO: 2, tạo ra kiểu hình kháng với đặc tính điển hình của HTN1 trong các điều kiện xâm nhiễm *H. turcicum*. Gen truyền tính kháng của locus HTN1 từ Pepitilla hoặc alen gen của nó có thể hiện diện trong cây theo hướng chuyển gen hoặc nội sinh. Theo một phương án được ưu tiên của cây hoặc bộ phận của nó, đột biến này là đột biến điểm trong trình tự nucleotit tương ứng với SEQ ID NO: 1 ở vị trí 1365 với cải biến trao đổi bazơ của G cho A hoặc ở vị trí 1490 với cải biến trao đổi bazơ của G cho A. Hơn nữa, phương án này cũng đề cập đến đột biến mà dẫn đến cải biến trao đổi axit amin trong trình tự axit amin tương ứng với SEQ ID NO: 2 ở vị trí 455 từ M (methionin) sang I (isoleucin) hoặc ở vị trí 497 từ G (glyxin) sang E (axit glutamic). Theo một phương án được ưu tiên khác của cây hoặc bộ phận của nó, đột biến của gen truyền tính kháng của locus HTN1 từ Pepitilla là đột biến điểm mà dẫn đến cải biến trao đổi axit amin trong trình tự nucleotit tương ứng với SEQ ID NO: 1 giữa vị trí 1365 và vị trí 1490, hoặc phương án này đề cập đến đột biến mà dẫn đến cải biến trao đổi axit amin trong trình tự axit amin tương ứng với SEQ ID NO: 2 giữa vị trí 455 và vị trí 497.

Một số thuật ngữ được sử dụng trong bản mô tả này sẽ được giải thích chi tiết hơn:

Thuật ngữ “alen” dùng để chỉ một hoặc hai hoặc nhiều trình tự nucleotit ở locus cụ thể trong hệ gen. Alen thứ nhất là ở trên nhiễm sắc thể, alen thứ hai ở trên nhiễm sắc thể thứ hai ở cùng vị trí. Nếu hai alen này khác nhau, thì chúng là dị hợp tử, và nếu chúng giống nhau, thì chúng là đồng hợp tử. Các alen khác nhau của gen (alen gen) khác nhau ở ít nhất một SNP. Tùy thuộc vào ngữ cảnh của bản mô tả, alen cũng có nghĩa là SNP đơn mà, ví dụ, cho phép phân biệt giữa thể cho của HTN1 (Pepitilla) và bố mẹ tuần hoàn.

Cụm từ “đoạn nhiễm sắc thể” có nghĩa là phân đoạn ADN nhiễm sắc thể cụ thể của nhiễm sắc thể cụ thể mà chứa ít nhất một gen. Đoạn nhiễm sắc thể được kết hợp có nguồn gốc từ nguồn cho. Theo ngữ cảnh của sáng chế, chuỗi tuần tự của các gen bên trong đoạn nhiễm sắc thể được kết hợp này tương ứng với trình tự như hiện diện trong đoạn nhiễm sắc thể gốc của nguồn cho. Theo cách này, đoạn nhiễm sắc thể được kết hợp này có thể hiện diện trên toàn bộ chiều dài không đổi so với đoạn nhiễm sắc thể tương ứng trong nguồn cho. Đoạn nhiễm sắc thể hoặc một phần của nó có thể cấu thành “kiểu đơn” cụ thể, trong đó đoạn nhiễm sắc thể này có thể chứa các SNP cụ thể mà thông qua đó kiểu đơn này cũng có thể được quy định và nhận biết rõ ràng.

Thuật ngữ “xa” và “gần” mô tả vị trí của khoảng nhiễm sắc thể hoặc phân đoạn di truyền liên quan đến điểm tham chiếu cụ thể (ví dụ, polynucleotit cụ thể, một khoảng nhiễm sắc thể khác hoặc gen) trên toàn bộ nhiễm sắc thể; “xa” có nghĩa là khoảng hoặc phân đoạn đó được định vị ở phía bên điểm tham chiếu cách xa tâm động của nhiễm sắc thể, và “gần” có nghĩa là khoảng hoặc đoạn đó được định vị ở phía bên điểm tham chiếu gần tâm động của nhiễm sắc thể.

“Được kết hợp gần” hoặc “được liên kết nghiêm ngặt” nghĩa là hai locus, hai khoảng, hai phân đoạn di truyền hoặc hai chỉ thị (locus chỉ thị) cách nhau ít hơn 15 cM, ít hơn 12 cM, ít hơn 10 cM, ít hơn 8 cM, ít hơn 7 cM, ít hơn 6 cM, ít hơn 5 cM, ít hơn 4 cM, ít hơn 3 cM, ít hơn 2 cM, ít hơn 1 cM, ít hơn 0,5 cM, ít hơn 0,2 cM, ít hơn 0,1

cM, được thiết lập bằng cách sử dụng IBM2 lân cận 4 bản đồ di truyền đã được công khai trên trang web Maize GDB.

Thuật ngữ “năng suất” như được sử dụng trong ngữ cảnh của sáng chế dùng để chỉ sức sản xuất trên một đơn vị diện tích của sản phẩm cây cụ thể có giá trị thương mại. Ví dụ, năng suất của cây ngô thường được xác định theo tấn hạt giống hoặc hạt trên mỗi hecta (ha) và mùa hoặc theo tấn sinh khối khô trên mỗi hecta (ha) và mùa. Trừ khi nêu cụ thể khác đi hoặc được quy định rõ, năng suất có thể nghĩa là vật chất sạch hoặc khô tuyệt đối, vật chất tương đối sạch hoặc khô, năng suất ủ chua (còn được biết đến là năng suất ngô ủ chua hoặc tổng năng suất vật chất khô) hoặc năng suất hạt. Năng suất bị ảnh hưởng bởi các yếu tố di truyền và ngoại cảnh và về nguyên tắc là tổ hợp của nhiều tính chất nông học mà hình thành từ các đặc điểm dựa trên yếu tố di truyền của cây và góp phần vào năng suất cuối trong mùa. Các ví dụ về các tính chất nông học riêng rẽ này là sự nảy mầm hạt giống, sức sống thực vật, khả năng dung chịu căng thẳng, khả năng kháng hoặc dung chịu bệnh, khả năng kháng thuốc diệt cỏ, xu hướng phân nhánh, thời gian ra hoa, cụm hạt giống, mật độ hạt, độ ổn định và khả năng lưu kho, khả năng đập (chín đồng đều), v.v..

Cụm từ “phân đoạn di truyền có” khoảng được quy định chính xác hơn cần được hiểu có nghĩa là phân đoạn di truyền mà bao gồm hoặc chứa khoảng được quy định chính xác hơn này, tức là không bị giới hạn bởi khoảng được quy định chính xác hơn này. Ví dụ, “phân đoạn di truyền có khoảng thứ năm giữa chỉ thị trong vùng chỉ thị thứ tám M8 có bên sườn là chỉ thị MA0022 và chỉ thị MA0013, và chỉ thị trong vùng chỉ thị thứ sáu M6 có bên sườn là chỉ thị PZE-108107671 và chỉ thị SYN4196” có nghĩa là phân đoạn di truyền chứa khoảng thứ năm và phân đoạn di truyền được định vị giữa chỉ thị trong vùng chỉ thị thứ tám M8 có bên sườn là chỉ thị MA0022 và chỉ thị MA0013 và chỉ thị trong vùng chỉ thị thứ sáu M6 có bên sườn là chỉ thị PZE-108107671 và chỉ thị SYN4196.

Thuật ngữ “lai hóa” hoặc “sự lai hóa” cần được hiểu nghĩa là quá trình trong đó phân tử axit nucleic chuỗi đơn kết tụ với chuỗi axit nucleic bổ trợ nhất có thể, tức là cặp bazơ có nó. Các ví dụ về các phương pháp tiêu chuẩn để lai hóa đã được mô tả vào năm 2001 bởi Sambrook et al. Tốt hơn nếu, điều này cần được hiểu có nghĩa là

ít nhất 60%, tốt hơn nữa nếu ít nhất 65%, 70%, 75%, 80% hoặc 85%, đặc biệt tốt hơn nếu 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% các bazơ của phân tử axit nucleic tiến hành bắt cặp bazơ với chuỗi axit nucleic bổ trợ nhất có thể đó. Khả năng kết tụ này phụ thuộc vào độ nghiêm ngặt của các điều kiện lai hóa. Thuật ngữ “độ nghiêm ngặt” dùng để chỉ các điều kiện lai hóa. Độ nghiêm ngặt cao là khi việc ghép cặp bazơ khó khăn hơn, độ nghiêm ngặt thấp là khi việc ghép cặp bazơ dễ hơn. Độ nghiêm ngặt của các điều kiện lai hóa phụ thuộc vào, ví dụ, nồng độ muối hoặc cường độ ion và nhiệt độ. Nói chung, độ nghiêm ngặt này có thể gia tăng bằng cách tăng nhiệt độ và/hoặc bằng cách giảm hàm lượng muối. Thuật ngữ “các điều kiện lai hóa nghiêm ngặt” cần được hiểu nghĩa là các điều kiện trong đó quy trình lai hóa diễn ra chủ yếu là chỉ giữa các phân tử axit nucleic đồng đẳng. Thuật ngữ “các điều kiện lai hóa” theo khía cạnh này không những được dùng để chỉ các điều kiện thực tế chiếm ưu thế trong quá trình kết tụ axit nucleic thực tế, mà còn được dùng để chỉ cả các điều kiện chiếm ưu thế trong các bước rửa tiếp theo. Các ví dụ về các điều kiện lai hóa nghiêm ngặt là các điều kiện trong đó chủ yếu là chỉ các phân tử axit nucleic có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 70%, tốt hơn nếu ít nhất là 75%, ít nhất là 80%, ít nhất là 85%, ít nhất là 90% hoặc ít nhất là 95% là trải qua quá trình lai hóa. Các điều kiện lai hóa nghiêm ngặt là, ví dụ: 4 x SSC ở nhiệt độ 65°C và rửa nhiều lần tiếp đó trong 0,1 x SSC ở nhiệt độ 65°C trong khoảng 1 giờ. Thuật ngữ “các điều kiện lai hóa nghiêm ngặt” như được sử dụng trong bản mô tả này cũng có thể có nghĩa là: quá trình lai hóa ở nhiệt độ 68°C trong natri phosphat 0,25M, độ pH = 7,2, SDS 7%, EDTA 1mM và BSA 1% trong 16 giờ và sau đó rửa hai lần với 2 x SSC và SDS 0,1% ở nhiệt độ 68°C. Tốt hơn nếu, quá trình lai hóa diễn ra trong các điều kiện nghiêm ngặt.

Thuật ngữ “khoảng” hoặc “khoảng nhiễm sắc thể” có nghĩa là phân đoạn thẳng liên tục trên ADN hệ gen mà có mặt trong từng nhiễm sắc thể của cây hoặc trên đoạn nhiễm sắc thể và thường được xác định thông qua hai chỉ thị là các điểm cuối của khoảng này ở phía xa và phía gần. Về vấn đề này, bản thân các chỉ thị xác định các đầu của khoảng này cũng có thể là một phần của khoảng đó. Hơn nữa, hai khoảng khác nhau có thể chồng lên nhau. Trong phần mô tả này, khoảng được quy định bằng câu “ở giữa chỉ thị A và chỉ thị B”. Chỉ thị ở đầu của khoảng cũng có thể được định vị trong vùng chỉ thị đã được xác định về một phía của khoảng. Sau đó vùng chỉ thị được xác

định bằng cách bố trí hai chỉ thị bên sườn và cấu thành phân đoạn nhiễm sắc thể mà có thể định vị nhiều chỉ thị hơn, ngoài các chỉ thị bên sườn này. Các chỉ thị bên sườn xác định điểm cuối của vùng chỉ thị và bản thân chúng vẫn là một phần của vùng chỉ thị đó. Nếu cả hai chỉ thị ở đầu của khoảng là chỉ thị trong các vùng chỉ thị khác nhau ở cả hai phía của khoảng, thì phần mô tả nêu rõ khoảng này bằng câu “ở giữa chỉ thị trong vùng chỉ thị X có bên sườn là chỉ thị C và chỉ thị D và chỉ thị trong vùng chỉ thị Y có bên sườn là chỉ thị E và chỉ thị F”. Vùng chỉ thị có thể kéo dài lên đến 500 000 cặp bazơ (bp), và tốt hơn nếu có thể có kích cỡ nằm trong khoảng từ 100 000 đến 400 000 bp, hoặc đặc biệt tốt hơn nếu có thể có kích cỡ nằm trong khoảng từ 140 000 đến 315 000 bp.

Thuật ngữ “sự nhập gen” như được sử dụng liên quan đến sáng chế nghĩa là sự truyền ít nhất một alen gen mong muốn trên locus di truyền của nền di truyền vào nền khác. Ví dụ, sự nhập gen của alen gen mong muốn ở locus cụ thể có thể được truyền vào thế hệ con bằng cách lai giống giữa hai bố mẹ của cùng một loài. Theo cách khác, ví dụ, việc truyền alen gen cũng có thể diễn ra bằng cách tái tổ hợp giữa hai hệ gen thể cho trong tế bào nguyên sinh dung hợp, trong đó ít nhất một tế bào nguyên sinh thể cho mang alen gen mong muốn trong hệ gen của nó. Trong từng trường hợp, các thế hệ con mà sau đó chứa alen gen mong muốn, sau đó có thể được lai ngược dòng một lần nữa với dòng chứa nền di truyền được ưu tiên và có thể được chọn lọc alen gen mong muốn. Kết quả là cố định được alen gen mong muốn trong nền di truyền đã chọn lọc được.

Thuật ngữ “phân tử axit nucleic được phân lập” hoặc “thể phân lập polynucleotit” nên được hiểu có nghĩa là phân tử axit nucleic hoặc polynucleotit được loại ra khỏi môi trường tự nhiên hoặc môi trường gốc của nó. Thuật ngữ này còn bao hàm phân tử axit nucleic được sản sinh theo phương pháp tổng hợp. “Polypeptit được phân lập” nên được hiểu có nghĩa là polypeptit đã được loại ra khỏi môi trường tự nhiên hoặc môi trường gốc của nó. Thuật ngữ này còn bao hàm polypeptit được sản sinh theo phương pháp tổng hợp.

Thuật ngữ “lây nhiễm mầm bệnh” nên được hiểu có nghĩa là thời điểm sớm nhất mà tại đó mầm bệnh tương tác với mô chủ của cây. Các ví dụ trong nấm như nấm nang hoặc nấm nước là sự sinh trưởng của sợi nấm hoặc sự hình thành các cấu trúc lây nhiễm

cụ thể như sợi nấm xâm nhập và sợi áp. Cụ thể là, sự lây nhiễm *Helminthosporium turcicum* có thể được nghiên cứu bằng cách sử dụng các kỹ thuật nhuộm khác nhau (ví dụ, xanh trypan) (Chung et al., *BMC Plant Biology* 10 (2010), 103; Walsh et al. (2008), Poster Presentation P192, 50th Maize Genetics Conference in Washington D.C.).

“Thế cho Pepitilla”, “Pepitilla đăng ký” hoặc “Pepitilla” nghĩa là, bên cạnh bản thân giống Pepitilla, các kiểu gen cây ngô khác mà hệ gen của nó, cụ thể là trên nhiễm sắc thể 8 bin 5 hoặc 6, được cài xen thế nhập gen của locus kháng *HTN1*, tốt hơn nếu từ Pepitilla. Các ví dụ về chúng là W22Htn (ví dụ, Bar-Zur et al. 1998), H6314Htn (ví dụ, Bar-Zur et al. 1998), B73Htn (ví dụ, Shimoni et al., *Journal of Phytopathology* 131:4 (1991), 315-321), B68Htn và A632Htn (ví dụ, Carson, *Plant Disease* 79 (1995), 717-720) và A619Htn (ví dụ, Stanković et al, *Genetika* 39:2 (2007), 227 - 240). Hơn nữa, Pepitilla bao gồm nguồn kháng bất kỳ mang lại kiểu hình kháng với các đặc tính điển hình của HTN1 sau khi nhập gen vào dòng ngô/cây ngô dễ bị gây hại. Các ví dụ về các đặc tính đặc hiệu đối với HTN1 này là làm chậm sự hình thành bào tử, làm giảm sự phát triển tổn thương, phát triển tổn thương nhỏ hơn, làm giảm vùng hình thành bào tử và/hoặc không có hoặc chỉ các tổn thương ủa vàng-hoại tử tách riêng.

"Locus" là vị trí trên nhiễm sắc thể trong đó tìm thấy một hoặc nhiều gen được gây ra đặc tính nông học hoặc đặc tính ảnh hưởng. Cụ thể là, "locus" như được sử dụng trong bản mô tả nghĩa là locus kháng HTN1 truyền tính kháng chống lại mầm bệnh *Helminthosporium turcicum* hoặc ít nhất là chống lại nòi *Helminthosporium turcicum*.

“Cây ngô” nên được hiểu nghĩa là cây từ loài *Zea mays* cũng như loài con của nó như, ví dụ, *Zea mays* ssp. *mays*, *Zea mays* ssp. *mehicoa* hoặc *Zea mays* ssp. *parviglumis*.

“Chỉ thị” là trình tự nucleotit được sử dụng để làm điểm tham chiếu hoặc điểm định hướng. Chỉ thị dùng để nhận diện sự kiện tái tổ hợp nên thích hợp để giám sát sự khác nhau hoặc hiện tượng đa hình trong quần thể cây. Đối với các chỉ thị, các khác nhau này là ở cấp độ ADN và, ví dụ, là sự khác nhau về trình tự polynucleotit như, ví dụ, SSR (chuỗi lặp lại đơn giản), RFLP (đa hình chiều dài đoạn cắt giới hạn), FLP

(đa hình chiều dài đoạn cắt) hoặc SNP (đa hình nucleotit đơn). Các chỉ thị này có thể có nguồn gốc từ axit nucleic hệ gen hoặc axit nucleic được biểu hiện như ARN cắt nối, ADN bổ trợ hoặc EST và có thể là dựa trên axit nucleic dùng làm đầu dò hoặc cặp đoạn mồi và như thích hợp để khuếch đại đoạn trình tự bằng cách sử dụng các phương pháp dựa trên PCR. Các chỉ thị liên quan đến đa hình di truyền giữa các quần thể có thể được phát hiện ra bằng cách sử dụng các phương pháp đã được thiết lập từ tình trạng kỹ thuật (An Introduction to Genetic Analysis. 7th Edition, Griffiths, Miller, Suzuki et al., 2000). Các phương pháp này bao gồm, ví dụ: giải trình tự ADN, khuếch đại đặc hiệu trình tự dựa trên PCR, thử nghiệm RFLP, thử nghiệm đa hình polynucleotit bằng cách sử dụng kỹ thuật lai hóa đặc hiệu alen (ASH), dò SSR, SNP hoặc AFLP. Các phương pháp phát hiện EST (nhân trình tự được biểu hiện) và RAPD (ADN đa hình được khuếch đại ngẫu nhiên) cũng là đã biết. Tùy vào ngữ cảnh, thuật ngữ “chỉ thị” trong phần mô tả cũng có thể có nghĩa là vị trí nhiễm sắc thể đặc hiệu trong hệ gen của loài mà chỉ thị đặc hiệu này (ví dụ, SNP) có thể được tìm thấy. Vị trí chỉ thị thuộc loại này có thể được sử dụng để giám sát sự có mặt của locus được kết hợp, ví dụ, locus đã kết hợp mà góp phần biểu hiện đặc tính kiểu hình đặc hiệu (ví dụ, HTN1 hoặc liên kết bất lợi). Ví dụ, locus chỉ thị này cũng có thể được sử dụng để quan sát sự phân ly alen ở locus (QTL hoặc cá thể gen) mà được kết hợp nghiêm ngặt về mặt di truyền hoặc vật lý với vị trí chỉ thị.

“Được liên kết điều khiển được” nghĩa là được liên kết trong phân tử axit nucleic chung theo cách sao cho các yếu tố được liên kết được định vị và định hướng đối với nhau sao cho có thể diễn ra quá trình phiên mã của phân tử axit nucleic. ADN được liên kết điều khiển được với gen khởi đầu là dưới sự kiểm soát phiên mã của gen khởi đầu này.

Các ví dụ về “bộ phận” của cây là lá, thân cây, thân, rễ, chồi sinh dưỡng, mô phân sinh, phôi, bao phấn, noãn hoặc quả. “Các phần” của cây có nghĩa là dạng kết hợp của một vài bộ phận, ví dụ, hoa hoặc hạt giống hoặc một phần của bộ phận, ví dụ, đoạn cắt từ thân. Các ví dụ về “mô” cây là mô sần, mô mềm, mô phân sinh, mô lá, mô chồi, mô rễ, mô bấu cây hoặc mô sinh sản. Thuật ngữ “tế bào” nên được hiểu có nghĩa là tế

bào cây được phân lập với thành tế bào hoặc thể kết tụ của nó hoặc tế bào nguyên sinh chẳng hạn.

Trong ngữ cảnh của sáng chế, trừ khi có quy định khác, “cây” có thể là loài bất kỳ trong số cây hai lá mầm, cây một lá mầm hoặc cây hạt trần. Tốt hơn nữa, các cây này là cây một lá mầm và đang được quan tâm trong nông nghiệp hoặc nông trại hoặc để sản xuất năng lượng sinh học (etanol sinh học, bioga, v.v.). Ví dụ là *Gossypium* sp., *Zea mays*, *Brachypodium distachyon*, *Triticum* sp., *Hordeum vulgare*, *Oryza sativa*, *Sorghum* sp., *Musa* sp., *Saccharum officinarum*, *Secale cereale*, *Avena* sp., cỏ cảnh và cỏ gia súc. Cây được ưu tiên theo sáng chế là cây có nguồn gốc từ giống *Zea*, cụ thể là loài *Zea mays*, hoặc *Sorghum*.

Liên quan với sáng chế, thuật ngữ “trình tự điều hòa” có nghĩa là trình tự nucleotit ảnh hưởng đến tính đặc hiệu và/hoặc độ bền biểu hiện, ví dụ, tới mức mà trình tự điều hòa này mang lại tính đặc hiệu mô cụ thể. Trình tự điều hòa kiểu này có thể được định vị ngược dòng với điểm bắt đầu phiên mã của gen khởi đầu tối thiểu, nhưng cũng cả xuôi dòng của nó, ví dụ, trong trình tự dẫn đầu được phiên mã nhưng không dịch mã hoặc trong intron.

Cụm từ “tính kháng” hoặc “kháng” liên quan đến mầm bệnh nên được hiểu có nghĩa là khả năng kháng các tác động phá hại của mầm bệnh ở cây hoặc tế bào cây và kéo dài từ thời điểm bệnh chậm phát triển đến khi ức chế hoàn toàn sự phát triển của bệnh. Liên quan đến sáng chế, cây/tế bào cây kháng hoặc cây/tế bào cây có tính kháng đối với mầm bệnh *Helminthosporium turcicum* (*H. turcicum* hoặc *HT*), tức là bệnh ở lá gọi là bệnh đốm lá ở cây ngô (NCLB). Tính kháng này được truyền lại nhờ một hoặc nhiều protein được mã hóa bằng gen hoặc bằng các gen (gen truyền tính kháng) từ *Pepitilla* đăng ký. Tính kháng này có thể là hoàn toàn hoặc cục bộ và có thể đặc hiệu hoặc không đặc hiệu đối với nòi mầm bệnh. Trong sự kiện tính kháng đặc hiệu với nòi mầm bệnh, thì nòi có độc lực của *Helminthosporium turcicum* có thể, ví dụ, bao gồm N, 1N, 2N, 23N hoặc 123N; nòi không có độc lực có thể, ví dụ, bao gồm 0, 1, 2, 3, 12, 23 hoặc 123. Tính kháng được truyền lại có thể là tính kháng được di truyền mới hoặc tính kháng tăng thêm một phần so với hiện có.

“Cây chuyển gen” là cây đã được kết hợp vào hệ gen của nó ít nhất một polynucleotit, tốt hơn nếu là polynucleotit khác loại. Tốt hơn nếu, polynucleotit này đã được kết hợp theo cách ổn định, có nghĩa là polynucleotit đã kết hợp vẫn ổn định trong cây, được biểu hiện và cũng có thể được di truyền một cách ổn định cho các đời sau. Quá trình nhập nội polynucleotit một cách ổn định vào hệ gen của cây còn bao gồm bước kết hợp vào hệ gen của cây thế hệ bố mẹ trước đó, nhờ đó polynucleotit này có thể tiếp tục được di truyền theo cách ổn định. Thuật ngữ “khác loại” có nghĩa là polynucleotit đã nhập nội có nguồn gốc từ, ví dụ, tế bào hoặc cơ quan có nền di truyền khác thuộc cùng loài hoặc từ một loài khác, hoặc đồng đẳng với tế bào chủ nhân rải rác hoặc nhân điển hình, nhưng sau đó được định vị trong môi trường di truyền khác nhau và do đó khác với polynucleotit có trong tự nhiên tương ứng có thể có bất kỳ. Polynucleotit khác loại có thể có mặt ngoài gen nội sinh tương ứng.

1. Thí nghiệm kiểu hình

A) Thực hiện các thử nghiệm trên cánh đồng để xác định tính kháng HT trong các điều kiện cây ghép/lây nhiễm tự nhiên và nhân tạo và thời gian ra hoa:

Ở một vị trí, ít nhất 20 cá thể trong mỗi kiểu gen ngô cần được nghiên cứu được trồng thành hàng. Tiến hành cấy ghép theo phương pháp tự nhiên hoặc nhân tạo. Quá trình cấy ghép/lây nhiễm tự nhiên được thực hiện bằng cách sử dụng các bào tử có trong tự nhiên của *H. turcicum*. Quá trình cấy ghép/lây nhiễm nhân tạo được thực hiện bằng cách sử dụng vật liệu lá được lây nhiễm và trên đất mà được sử dụng cho cây cần được thử nghiệm. Kiểu cấy ghép nhân tạo cho phép mô phỏng sự xâm nhiễm *H. turcicum* tương đương trong năm thử nghiệm khác nhau và ở các vị trí khác nhau không phụ thuộc vào các điều kiện xâm nhiễm tự nhiên chiếm ưu thế ở đó. Bố mẹ dễ bị gây hại và bố mẹ có sự nhập gen HTN1 được canh trường từ thể cho B37HTN1 để làm kiểu gen đối chứng, tùy thuộc vào quần thể con lai thử nghiệm. Điểm số phân loại về đặc tính kháng HT được ghi lại ít nhất là ba lần trong giai đoạn sinh dưỡng. Chỉ có biểu đồ điểm số phân loại được thể hiện trong Bảng 3 được sử dụng.

Thể cho B37HTN1 dưới dạng nguồn của tính kháng HT được lai vào các nền di truyền khác nhau từ dòng ưu tú với các mức độ dễ bị gây hại khác nhau đối với *H.*

turcicum và dòng gần đẳng gen được phát triển mà khác với dòng gốc dễ bị gây hại về cơ bản chỉ bằng cách nhập gen từ B37HTN1. Trong thí nghiệm kiểu hình, sau quá trình cây ghép nhân tạo như được mô tả ở trên, các dòng được chọn lọc mà biểu hiện tính kháng HT cải thiện ít nhất là 2 đến 3 điểm số phân loại, tốt hơn nếu từ 3 đến 4 điểm số phân loại bằng cách đưa thể nhập gen truyền tính kháng từ B37HTN1 vào. Sáng chế được mô tả chi tiết hơn dưới đây thông qua ví dụ sử dụng hai bố mẹ tuần hoàn được chọn lọc RP1 và RP3. Các kết quả của thí nghiệm kiểu hình được mô tả này được tóm tắt trong Bảng 5. Bố mẹ tuần hoàn RP1 không có sự nhập gen biểu hiện điểm số phân loại trung bình nằm trong khoảng từ 7 đến 9, được cải thiện 3 đến 4 điểm số phân loại nhờ quá trình nhập gen từ B37HTN1. Bố mẹ tuần hoàn RP3 có điểm số phân loại nằm trong khoảng từ 4 đến 6 không có sự nhập gen và cải thiện 2 đến 3 điểm số phân loại nhờ quá trình nhập gen. Bố mẹ tuần hoàn RP4 có điểm số phân loại là 6 không có sự nhập gen và cải thiện 2 đến 3 điểm số phân loại nhờ quá trình nhập gen.

Bảng 5: Dữ liệu kiểu hình đối với tính kháng HT từ các kiểu gen RP1, RP3, và RP4 có và không có sự nhập gen truyền tính kháng từ B37HTN1 (điểm số phân loại được xác định theo biểu đồ trong Bảng 3).

Kiểu gen	Điểm số phân loại trung bình (n=20) không có sự nhập gen từ B37HTN1	Tính kháng HT cải thiện với sự nhập gen từ B37HTN1
RP1	7 đến 9	3 đến 4
RP3	4 đến 6	2 đến 3
RP4	6	2 đến 3

Ngoài tính kháng HT, đối với mỗi kiểu gen, thời gian cây cái và cây đực ra hoa được xác định là “ngày sau khi gieo hạt”. Thời gian ra hoa đối với cây cái được xác định bằng sự xuất hiện râu; còn thời gian ra hoa đối với cây đực là bằng sự biểu hiện chùy. Các kết quả được thể hiện chi tiết hơn trong Ví dụ 3.B).

B) Thực hiện các thử nghiệm trên cánh đồng để xác định sản lượng hạt và sản lượng ủ chua:

Bên cạnh dữ liệu liên quan đến tính kháng HT và thời gian ra hoa nêu trên, dữ liệu sản lượng đối với RP3 chứa các đoạn nhập gen truyền tính kháng có chiều dài khác

nhau từ B37HTN1 hoặc Pepitilla và đối với dòng đối chứng ưu tú được xác định. Các dòng RP3, RP3HTNA và RP3HTNK được rắc phần tử thử nghiệm (ngô đá, con lai đơn nhóm trung gian) của nhóm gen bổ trợ (ngô đá) để tạo ra hạt giống cây dùng cho các thể lai thử nghiệm. Mỗi thể lai thử nghiệm này được cho sinh trưởng lặp lại trong thử nghiệm trên cánh đồng ở năm vị trí tiêu biểu đối với cây ngô ở Đức. Các thể lai thử nghiệm được biến đổi thích nghi với các vùng sinh trưởng này về độ chín. Thử nghiệm trên cánh đồng được thực hiện hai lần trong các mảnh đất 4 luống riêng rẽ dài 6m và rộng 0,75m. Mật độ là 9 cây/m² trong lần thứ nhất và 11 cây/m² trong lần lặp lại thứ hai. Tại thời điểm thu hoạch ngô ủ chua, chỉ hai luống ở giữa của mỗi mảnh đất được thu hoạch để giảm thiểu tối đa tác động cạnh tranh. Trọng lượng trong mỗi mảnh đất và hàm lượng nước được xác định đối với vật liệu được thu hoạch để tính năng suất ngô ủ chua (còn được biết đến là năng suất ủ chua hoặc tổng sản lượng chất khô) và hàm lượng chất khô (tổng hàm lượng chất khô).

C) Thực hiện các thử nghiệm trong nhà kính để xác định tính kháng HT:

20 cá thể trong mỗi kiểu gen được cho sinh trưởng trong chậu. Các đối chứng là kiểu gen của bố mẹ dễ bị gây hại và bố mẹ gần đẳng gen (NIL) có thể nhập gen truyền tính kháng từ B37HTN1, phụ thuộc vào con lai. 14 ngày sau khi gieo hạt, tiến hành lây nhiễm nhân tạo (tham khảo ở trên). Sau 2 đến 3 tuần nữa, các triệu chứng đầu tiên của bệnh phát triển. Từ thời điểm biểu hiện các triệu chứng đầu tiên, mỗi ngày sau đó, điểm số phân loại về đặc tính kháng HT cũng như số lượng cây có các triệu chứng này được xác định. Từ đó, AUDPC (*diện tích dưới đường cong tiến triển bệnh*) được xác định. Tần suất xâm nhiễm (ở dạng %/thời gian × giai đoạn) được sử dụng để phân loại các cây trong khảo sát này; ở đây, AUDPC từ 0 – 100 là kháng, 101 – 450 là dị hợp tử, và > 450 là dễ bị gây hại.

2. Sự phát triển chỉ thị đối với vùng đích HTN1

Bên cạnh các thử nghiệm điểm số phân loại, vùng đích quanh locus kháng HTN1 trên nhiễm sắc thể 8 (bin 8.06) trong nhiều kiểu gen cũng được thử nghiệm chi tiết hơn và được lập bản đồ một cách đồng đều bằng cách sử dụng chỉ thị phân tử mới và/hoặc chỉ thị phân tử được tối ưu hóa. Chỉ thị phân tử được sử dụng trong bản mô tả

này được phát triển dựa trên dạng đa hình nucleotit đơn (SNP) hoặc chỉ thị chuỗi lặp lại đơn giản (SSR) đã có sẵn trên thị trường:

ADN từ các kiểu gen để sử dụng làm chỉ thị được phân lập bằng cách sử dụng phương pháp NucleoSpin 96 Plant II theo chỉ dẫn của nhà sản xuất (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Đức) hoặc bằng cách sử dụng phương pháp Klear Gene DNA Extraction 384 (LGC Genomics GmbH, Đức).

Các trình tự đoạn môi đối với các chỉ thị SSR là đã biết từ cơ sở dữ liệu công khai của Trung tâm Thông tin Kỹ thuật sinh học Quốc gia (NCBI) tại <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/unists>; các trình tự đoạn môi đối với các chỉ thị bnlgl1782, umc1960, bnlgl240, umc1121, bnlgl1067 và umc1287, được sử dụng để thử nghiệm vùng đích, được tóm tắt trong Bảng 6, cũng như các biến đổi được tạo ra.

Bảng 6: Trình tự đoạn môi đối với chỉ thị SSR (NED: phenyl-1.4-diclo-6-carboxyfluorescein được dung hợp 2'-clo-5'-flo-7',8'; FAM: 6-carboxyfluorescein; M13: trình tự lõi đối với thể thực khuẩn M13)

Chỉ thị	trình tự đoạn môi thuận (5'-3') [SEQ ID NO]	Biến đổi	Trình tự đoạn môi nghịch (5'-3') [SEQ ID NO]	Biến đổi	Đoạn môi bổ sung + biến đổi
bnlg1782	113	NED	114	không	
umc1960	115	NED	116	không	
bnlg240	117	FAM	118	không	
umc1121	119	FAM	120	không	
bnlg1067	121	FAM	122	không	
umc1287	123	không	124	không	M13 + FAM

Thể tích của hỗn hợp phản ứng PCR của bnlgl1782, umc1960, bnlgl240, umc1121 và bnlgl1067 là 10µl và gồm nồng độ đơn lẻ là 4x chất đệm B (Solis BioDyne, Estonia), 0,5pmol đoạn môi thuận, 0,5pmol đoạn môi nghịch, 10-30 ng ADN, 0,25 đơn vị HotFirepol TAQ-Polymeraza (Solis BioDyne, Estonia). Thể tích của hỗn hợp phản ứng của umc1287 là 10µl và gồm nồng độ đơn lẻ của 4x chất đệm

B (Solis BioDyne, Estonia), 0,5pmol đoạn mỗi nghịch, 2,5pmol đoạn mỗi nghịch, 0,3pmol đoạn mỗi bổ sung M13, 10-30 ng ADN, 0,25 đơn vị HotFirepol TAQ-Polymeraza (Solis BioDyne, Estonia).

Phản ứng PCR được thực hiện với thời gian biến tính ban đầu là 900 giây ở nhiệt độ 94°C, chu kỳ khuếch đại là 25 đến 40 chu kỳ với 15 giây ở nhiệt độ 94°C, 30 giây ở nhiệt độ từ 50 đến 55°C và 120 giây ở nhiệt độ 72°C, và bước cuối cùng là 300 giây ở nhiệt độ 72°C. Tiếp theo, hỗn hợp phản ứng PCR được ủ trong thời gian 2 giờ ở nhiệt độ 65°C. Các sản phẩm PCR được tách ra trên ABI3730xl (Life Technologies™, USA) theo chỉ dẫn của nhà sản xuất để tách các đoạn 50 đến 400 bp.

Các chỉ thị SNP được phát triển và được sử dụng (a) từ nguồn sẵn có trên thị trường (b) từ quá trình giải trình tự amplicon đối chứng hoặc (c) từ quá trình so sánh trình tự của các trình tự BAC từ RP4HTN1 (tham khảo đoạn Phân tích phân tử) và hệ gen tham chiếu B73 AGPv02 (www.maizesequence.org).

(a) Các SNP được biến nạp vào các chỉ thị KASP (LGC Genomics GmbH, Đức) từ nguồn SNP sẵn có trên thị trường của Maize Community 50K-Illumina-Chip (Ganal et al., 2011). Nhằm mục đích này, các đoạn mỗi mới được phát triển mà đảm bảo sự khuếch đại của các alen mang tính quyết định trong thử nghiệm chỉ thị KASP (tham khảo Bảng 4). Toàn bộ thao tác được thực hiện bằng cách sử dụng phần mềm Kraken™ (LGC Genomics GmbH, Đức). Đối với thử nghiệm chỉ thị KASP, 5-20 ng ADN, 0,02µl hỗn hợp thử nghiệm oligo (12µM alen đoạn thuận 1 (thuận); 12µM alen đoạn mỗi 2 (thuận); 30µM đoạn mỗi nghịch) và 1,5µl bộ kit chất phản ứng 1xKASPar dùng cho 1536 đĩa được sử dụng. Điều kiện cài đặt PCR tiêu chuẩn gồm có nhiệt độ 94°C trong 15 phút, 10 chu kỳ ở nhiệt độ 94°C trong 20 giây, hạ xuống 61-55°C trong 1 phút, 26 chu kỳ ở nhiệt độ 94°C trong 20 giây và 55°C trong 1 phút. Quá trình đánh giá alen trong mỗi kiểu gen được thực hiện bằng cách sử dụng phần mềm Kraken™ (LGC Genomics GmbH, Đức).

(b) Quá trình giải trình tự amplicon đối chứng được thực hiện bằng cách sử dụng kỹ thuật giải trình tự Sanger. Mỗi kiểu gen trong các trình tự đối chứng chứa thể cho B37HTN1 cũng như các thể cho B37, RP1, RP1HTN1, RP3, RP3HTN1 (phiên

bản A, B, K), RP4, RP4HTN1. ADN được phân lập từ các hạt trên đất bằng cách sử dụng phương pháp CTAB (Maniatis et al., 1982). Các trình tự đoạn môi để giải trình tự amplicon được liệt kê trong Bảng 4. Phương pháp PCR tiêu chuẩn để khuếch đại các vùng tương ứng bao gồm bước làm biến tính ở nhiệt độ 94°C trong 5 phút, 35 chu kỳ, mỗi chu kỳ ở nhiệt độ 94°C trong 1 phút, 60°C trong 1 phút và 72°C trong 2 phút và bước tiếp theo ở nhiệt độ 72°C trong 10 phút. Các sản phẩm PCR được giải trình tự bằng phương pháp Sanger (Sanger & Coulson, 1975). Quá trình đánh giá trình tự được thực hiện bằng cách sử dụng phần mềm DNASTar Lasergene (DNASTAR Inc., USA). Các dạng đa hình phát hiện được được biến đổi thành các chỉ thị KASP như được mô tả trong mục (a).

(c) Các contig trình tự BAC được nhằm chống lại hệ gen tham chiếu B73 AGPv02 bằng cách sử dụng thuật toán Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) để phát hiện dạng đa hình nucleotit đơn (SNP). Dạng đa hình này được phát hiện bằng cách sử dụng phần mềm Lasergene (DNASTAR Inc., USA) và được thể hiện trong Bảng 4 cùng với trình tự bên sườn. Các đoạn môi được phát triển đối với trình tự bên sườn của SNP và các SNP đã nhận biết được được biến nạp vào các chỉ thị KASP như được mô tả trong mục (a).

3. Định vị locus kháng HTN1 trên nhiễm sắc thể 8 bằng cách sử dụng chỉ thị SSR

A) Định vị locus kháng HTN1:

Locus kháng HTN1 từ các thể cho B37HTN1 được lai vào các dòng ưu tú như được mô tả trong ví dụ 1.A) và được định vị trên nhiễm sắc thể 8 (bin 8.06) với sự trợ giúp của các chỉ thị SSR và SNP từ ví dụ 2 (xem Fig.1). Các NIL từ các con lai RP1 x RP1HTN1 và RP3 x RP3HTN1 được lập kiểu hình lặp lại hai lần ở hai vị trí qua vài năm trong các điều kiện lây nhiễm tự nhiên bằng cách sử dụng biểu đồ điểm số phân loại trong bảng 3. Các NIL thể hiện, trên trung bình, đáp ứng kháng mà cải thiện 4 điểm số phân loại so với dòng gốc. Sự phát triển của các tổn thương cục bộ trên lá được dịch chuyển khoảng 2 tuần so với kiểu gen dễ bị tổn thương. Quy trình lập bản đồ QTL được thực hiện với 528 cá thể F2 (lai RP1 x RP1HTN1) bằng cách sử dụng 8 chỉ thị (bảng 4 và bảng 6 là từ các chỉ thị lập bản đồ QTL trên Fig.1). Vùng

QTL mà bao gồm locus kháng HTN1 được định vị trên nhiễm sắc thể 8 giữa chỉ thị MA0002 và chỉ thị umc1287, trong vùng 23,1 cM.

B) Lai đoạn thể cho B37HTN1 vào dòng ngô ưu tú và nhận biết và loại bỏ liên kết bất lợi làm chậm thời gian ra hoa:

Thể cho B37HTN1 được lai với KWS.elite, dòng ngô ưu tú từ KWS SAAT AG (Đức) và sau đó được lai ngược dòng qua năm đời với KWS.elite. Ở mỗi đời lai ngược dòng, chỉ thị phân tử được sử dụng để chọn lọc các cây mà là dị hợp tử đối với vùng đích HTN. Kế tiếp, cây đã được chọn lọc từ đời lai ngược dòng thứ năm được tự thụ tinh và các cây đồng hợp tử đối với vùng đích HTN được nhận biết bằng các chỉ thị phân tử.

Các dòng này được kiểm định trong các thử nghiệm trên cánh đồng ở một vài vị trí. Về vấn đề này, đối với các kiểu gen B37HTN1, KWS.elite và KWS.elite.B37HTN1, dữ liệu kiểu hình về tính kháng HT và thời gian ra hoa được xác định như được mô tả trong ví dụ 1. Các kiểu gen có thể nhập gen HTN1 biểu hiện tính kháng HT theo mong đợi với điểm số phân loại là từ 1 đến 3, trong khi dòng gốc KWS.elite có điểm số phân loại là từ 5 đến 7. Ngoài ra, so với KWS.elite, bất ngờ là KWS.elite.B37HTN1 có thời gian ra hoa đối với cả hoa cái và hoa đực mà dịch chuyển ít nhất là 2 ngày. Thời gian ra hoa dịch chuyển này cấu thành đặc tính nông học tiêu cực cho cây ngô dựa trên liên kết bất lợi chưa được mô tả ở dạng nhập gen sau này của tính kháng HT từ B37HTN1. Phân tích chỉ thị tìm ra sự định vị của liên kết bất lợi mà chịu trách nhiệm về việc làm chậm thời gian ra hoa ở vùng nằm giữa hai vùng chỉ thị trên phần nhập gen từ B37HTN1, giữa M1 và M2. Về vấn đề này, các kiểu gen B37HTN1, KWS.elite và KWS.elite.B37HTN1, ví dụ, được phân tích bằng các chỉ thị KASP SYN14136, PZE-108076510, SYN24931 và PZE-108077560 (xem Fig.3 và bảng 4). SYN14136 và PZE-108076510 được sử dụng để phát hiện cụ thể vùng chỉ thị M1, SYN24931 và PZE-108077560 để phát hiện cụ thể vùng M2. Theo đó, vùng chỉ thị M1 nằm ở đầu 5' từ locus của liên kết bất lợi và vùng chỉ thị M2 nằm ở đầu 3' từ đó. Phân tích chỉ thị đã cho thấy rằng B37HTN1 và KWS.elite.B37HTN1, đều có thời gian ra hoa chậm hai ngày, biểu hiện alen chung cho vùng M1 và vùng M2 cũng như

khoảng giữa các vùng này, trong khi KWS.elite có thời gian ra hoa bình thường và có các alen khác nhau cho vùng M1 và vùng M2 và khoảng giữa chúng.

Thế cho B37HTN1 được lai với RP3 và sau đó được lai ngược dòng qua ba đời với RP3. Chỉ thị phân tử được sử dụng trong mỗi đời lai ngược. Ban đầu, cây dị hợp tử với vùng đích HTN1 được chọn lọc và sau đó các cây này được khảo sát với các chỉ thị mà đã được phân phối đồng đều trên toàn hệ gen để chọn lọc dựa trên hệ gen thế cho. Tiếp theo, cây đã được chọn lọc từ đời lai ngược dòng thứ ba được tự thụ tinh và các cây đồng hợp tử với vùng đích HTN1 được nhận biết bằng các chỉ thị phân tử.

Hơn nữa, thế cho B37HTN1 cũng được lai với bố mẹ tuần hoàn RP3 và RP4 và dòng RP3HTNA và RP4HTNA đã tạo ra qua một vài bước lai ngược dòng. Việc xác định kiểu hình trên tính kháng HT đã thể hiện sự cải thiện về điểm số phân loại từ 5 đến 7 đối với dòng gốc RP3 đến 1 đến 3 đối với RP3HTNA và sự cải thiện về điểm số phân loại từ 6 đối với dòng gốc RP4 đến 2 đến 3 đối với RP4HTNA. Việc xác định kiểu hình cho thời gian ra hoa có thời gian ra hoa tương đương đối với RP3 và RP3HTNA và RP4 và RP4HTNA. Việc sử dụng các chỉ thị KASP SYN14136, PZE-108076510, SYN24931 và PZE-108077560 đã cho thấy rằng RP3 và RP3HTNA mang alen chung cho vùng M1 và vùng M2. Các alen này không tương ứng với thế cho B37HTN1. Kết quả là, sau đó, đoạn nhiễm sắc thể làm chậm thời gian ra hoa của thế nhập gen từ B37HTN1 nằm trên khoảng nhiễm sắc thể giữa vùng chỉ thị M1 và vùng chỉ thị M2. Với dòng RP3HTNA, thì liên kết bất lợi này được loại bỏ một cách thành công. Các chỉ thị KASP được sử dụng, SYN14136, PZE-108076510, SYN24931 và PZE-108077560, cho thấy là các công cụ hiệu quả cho quy trình “chọn lọc có trợ giúp”.

Việc xác định kiểu hình của RP3 và RP3HTNA cũng bao gồm việc ghi lại năng suất hạt và ủ chua. Mặc dù năng suất hạt trong các kiểu gen không khác nhau đáng kể, đặc tính năng suất ủ chua trong RP3HTNA đã có sự giảm rõ ràng, có ý nghĩa về mặt thống kê ít nhất là 14 deciton trên hecta (dt/ha) so với RP3, hoặc giảm hơn 5%.

Với sự trợ giúp của các chỉ thị KASP đã thiết kế SYN14136, PZE-108076510, SYN24931 và PZE-108077560, dòng RP1HTN1 có thể được chọn lọc từ con lai của

B37HTN1 và bố mẹ tuần hoàn RP1 mà không có thêm bất kỳ liên kết bất lợi làm chậm thời gian ra hoa nào nữa, thay vào đó làm giảm năng suất ủ chua, như được quan sát đối với RP3HTNA. Với mục đích nhằm mô tả đặc điểm phân tử chính xác hơn, RP1HTN1 được phát triển thêm và quần thể F2 được thành lập với 724 cá thể từ con lai RP1 x RP1HTN1. Tiếp theo, đời F3 được tự thụ tinh và các cây F4 đã được chọn lọc được xác định kiểu gen và kiểu hình. Quy trình xác định kiểu gen được thực hiện bằng cách sử dụng các chỉ thị từ bảng 6 trong vùng QTL phát hiện được bằng 23,1 cM. Quy trình xác định kiểu hình được thực hiện ở một vài vị trí lặp lại hai lần (xem ví dụ 1). Các cây tái tổ hợp đối với vùng QTL được chọn lọc và tương quan với dữ liệu kiểu hình. Việc chọn lọc bao gồm các cây gồm các vùng khác nhau của vùng đích cũng như các cây dị hợp tử, với mục đích thu được các cây tái tổ hợp mới. Mỗi năm, hai phép lai ngược dòng với RP1 được thực hiện và các cá thể cây được chọn lọc, và vì vậy các thể tái tổ hợp mới được tạo ra. Các thể tái tổ hợp mới được xác định kiểu hình trong các thử nghiệm trên cánh đồng và trong nhà kính (xem mục 1.) và xác định kiểu gen để phát triển chỉ thị phân tử mới theo mục 2.

Việc sử dụng các chỉ thị mới này trên kiểu gen RP3HTNA cho phép vùng chỉ thị M3 được nhận biết mà giới hạn sự nhập gen trong vùng 5' và có thể được mô tả bằng các chỉ thị bên sườn PZE-108093423 và PZE-108093748. Về vấn đề này, PZE-108093423 cần có alen của bố mẹ tuần hoàn RP3 và PZE-108093748 cần có alen của thể cho B37HTN1. Trong vùng 3', sự nhập gen của RP3HTNA bởi các chỉ thị PZE-108107671 và SYN4196 trong vùng chỉ thị khác M6 được mô tả (xem Fig.3). Về vấn đề này, PZE-108107671 mang alen của thể cho B37HTN1 và SYN4196 mang alen của bố mẹ tuần hoàn RP3. Sự nhập gen từ RP3HTNA (sau đây gọi là phiên bản A) tương ứng, giữa vùng chỉ thị M3 và vùng chỉ thị M6, với thể cho B37HTN1, nhưng ngoài vùng này thì nó tương ứng với bố mẹ tuần hoàn hoặc một dòng khác mà không mang alen trong vùng của thể cho B37HTN1 giữa M1 và M2. Phiên bản A này được nhập nội vào nhiều nền di truyền khác và thử nghiệm năng suất sạch, xác định kiểu hình kháng và xác định thời gian ra hoa được thực hiện. Các kết quả này tương đương với các kết quả được mô tả đối với RP3HTNA. Vì vậy, thời gian ra hoa không thay đổi so với dòng tương ứng không nhập gen và dòng này có tính kháng

Helminthosporium turcicum cải thiện so với dòng gốc, hoặc ít nhất là giảm năng suất ủ chua.

C) Nhận biết và loại bỏ liên kết bất lợi để giảm năng suất ủ chua:

Thể cho được sử dụng là dòng RP3HTNA. Dòng này được lai với RP3 và tự thụ tinh qua sáu đời nữa. Ở mỗi đời tự thụ tinh, chỉ thị phân tử được sử dụng trong vùng đích để làm giảm đoạn cho. Do tất cả các vùng của hệ gen bên ngoài vùng đích đã được chọn lọc trong dòng RP3HTNA trên hệ gen RP3, nên chỉ có vùng xung quanh vùng đích HTN được khảo sát bằng các chỉ thị. Về vấn đề này, các cây đồng hợp tử được nhận biết cho vùng đích HTN đã giảm. Đồng thời cũng tiến hành phát triển chỉ thị mạnh ở vùng đích. Bên cạnh nhiều dòng khác, dòng RP3HTNK được nhận biết mà đã mô tả đoạn cho B37HTN1 từ vùng chỉ thị M4 có bên sườn là chỉ thị MA0004 và chỉ thị MA0005, trong đó MA0004 mô tả alen của bố mẹ tuần hoàn RP3 và MA0005 mô tả alen của thể cho B37HTN1 trong RP3HTNK, lên đến vùng chỉ thị M5, có bên sườn là chỉ thị MA0006 và chỉ thị PZE-108097482, trong đó MA0006 mô tả alen của thể cho B37HTN1 và PZE-108097482 mô tả alen của bố mẹ tuần hoàn RP3. Trong RP3HTNK, sự nhập gen từ RP3HTNK (sau đây gọi là phiên bản K) tạo ra tính kháng HTN1 cải thiện từ 3 đến 4 điểm số phân loại so với RP3, thời gian ra hoa giống như dòng gốc RP3 của nó (không chậm ra hoa) và không làm giảm năng suất ủ chua đáng kể thêm nữa (xem Fig.2). Ngoài ra, với sự trợ giúp của các chỉ thị được mô tả, dòng không có liên kết bất lợi có thể được tạo ra từ dòng gốc RP1 bằng cách lai, các dòng đó có sự nhập gen phiên bản K.

D) Kiểu đơn truyền tính kháng từ B37HTN1 hoặc từ Pepitilla

Bản K có kiểu đơn từ B37HTN1 hoặc từ Pepitilla mà mang alen cho được mô tả trong bảng 4 ở các vị trí vật lý đối với B73 AGPv02 theo bp. Ví dụ, kiểu đơn ở chỉ thị MA0008 sẽ được mô tả: sử dụng chỉ thị MA0008 và định rõ các alen cho B37HTN1, RP3, RP3HTNA, RP3HTNK, sau đó alen “T” là cho B37HTN1, RP3HTNA, RP3HTNK và alen “C” cho RP3. Đối với locus này, chỉ thị này cũng phân biệt nguồn kháng HTN1 giả định PH99N (WO 2011/163590), mà cũng chứa alen “C” ở vị trí này, với nguồn kháng được sử dụng trong bản mô tả.

4. Phân tích phân tử của vùng được lập bản đồ đồng đều

Ngoài ra, đoạn nhiễm sắc thể đã được cài xen và cắt ngắn do nhập gen được khảo sát về mức độ phân tử. Locus kháng *Htn1* từ *Pepitilla* đăng ký vì thế giảm xuống đến vùng đích riêng biệt, khoảng nhiễm sắc thể 700 kb, và được giải trình tự trong kiểu gen RP4HTN1. Như được mô tả chi tiết hơn dưới đây, dòng vô tính BAC từ RP4HTN1 được phân lập, giải trình tự và lắp ráp thành khung trình tự. Khung trình tự này được diễn giải và các gen đã diễn giải trong khoảng này được thiết lập dựa trên thông tin trình tự EST/cADN. Sau đó các nghiên cứu về sự biểu hiện khác biệt được thực hiện từ vô số các gen đã diễn giải để nhận biết các gen ứng viên (xem bảng 1).

A) Kết cấu ngân hàng và tập hợp BAC, sàng lọc ngân hàng BAC, giải trình tự BAC

Ngân hàng BAC được tạo ra từ kiểu gen RP4HTN1. Tiếp theo đó là xây dựng kết cấu ngân hàng BAC này và tập hợp ma trận 3D từ vật liệu lá cũng như sàng lọc tập hợp ma trận 3D đó. Các đoạn mỗi để sàng lọc tập hợp ma trận 3D là dựa trên trình tự B73 AGPv01 từ 149957158 bp đến 152977351 bp trên nhiễm sắc thể 8 (www.maizesequence.org) và chương trình đoạn mỗi 3 (<http://simgene.com/primer3>; Rozen & Skaletsky, 2000). Các tham số để lựa chọn đoạn mỗi là hàm lượng GC trung bình bằng 50%, chiều dài đoạn mỗi nằm trong khoảng từ 20 đến 25 bp, nhiệt độ nóng chảy nằm trong khoảng từ 70 đến 90°C và chiều dài amplicon nằm trong khoảng từ 70 đến 80 bp. Bằng cách sử dụng các cặp đoạn mỗi ở bảng 7, các tập hợp 3D được sàng lọc bằng cách sử dụng phương pháp RT-PCR. Các trị số của hai tham số, là nhiệt độ nóng chảy và giá trị CP, được đưa ra đối với dòng vô tính BAC. 26 dòng vô tính BAC có thể được nhận biết cho vùng được chọn. Tất cả các dòng vô tính BAC này được phân lập từ ngân hàng BAC và được sử dụng như môi trường nuôi cấy *E.coli* để phân lập ADN và giải trình tự. Quy trình giải trình tự được thực hiện với bộ kit titan tiêu chuẩn GS-FLX (454 Life Sciences, USA). Thông tin trình tự thu được đối với các dòng vô tính BAC 144N24, 119F13, 219G11, 86N21, 16B06, 84L18, 128D02, 25M23, 96H10, 19J24, 136A01, 75H06, 135F07 được tổng kết ở bảng 8.

Bảng 7: Các cặp đoạn mồi dùng để phát hiện các dòng vô tính BAC từ ngân hàng RP4HTN BAC

ID dòng vô tính BAC	Cặp đoạn mồi 1	Trình tự, cặp đoạn mồi 1 (5'-3')	Nhiệt độ nóng chảy, °C (50% amplicon là chuỗi đơn) trong kiểu gen RP4HTN1	Giá trị CP (chu kỳ khi pha mũ của PCR bắt đầu)	Kích thước amplicon (bp)
	Cặp đoạn mồi 2				
58A1 4	579ZMPM0_2F; 579ZMPM0_2R	125; 126	77,4	28,5	74
	579ZMPM0_4F; 579ZMPM0_4R	127; 128	80,96	26,52	77
144N 24	579ZMPM0_5F; 579ZMPM0_5R	129; 130	79,09	27,09	76
	579ZMPM0_17F; 579ZMPM0_17R	131; 132	83,06	25,53	78
219G 11	579ZMPM0_16F; 579ZMPM0_16R	133; 134	84,7	25,96	78
	579ZMPM0_25F; 579ZMPM0_25R	135; 136	78,95	26,09	80
119F 13	579ZMPM0_22F; 579ZMPM0_22R	137; 138	80,89	25,98	73
	579ZMPM0_34F; 579ZMPM0_34R	139; 140	80,1	24,43	76
86N2 1	579ZMPM0_35F; 579ZMPM0_35R	141; 142	80,9	25,27	70
	579ZMPM0_38F; 579ZMPM0_38R	143; 144	83,86	26,01	71
16B6	579ZMPM0_37F; 579ZMPM0_37R	145; 146	79,22	25,71	80
	579ZMPM0_41F; 579ZMPM0_41R	147; 148	75,93	26,6	74
84L1 8	579ZMPM0_41F; 579ZMPM0_41R	149; 150	75,93	26,6	74
	579ZMPM0_46F; 579ZMPM0_46R	151; 152	80,54	25,68	78
128D 2	579ZMPM0_180F; 579ZMPM0_180R2	153; 154	84,41	25,99	77
	579ZMPM0_48F; 579ZMPM0_48R	155; 156	83,96	25,33	77
25M2 3	579ZMPM0_48F; 579ZMPM0_48R	157; 158	83,96	25,33	77
	579ZMPM0_56F; 579ZMPM0_56R	159; 160	77	29,12	79

19J24	579ZMPM0_51F; 579ZMPM0_51R	161; 162	87,76	27,75	77
	579ZMPM0_199F; 579ZMPM0_199R	163; 164	82,49	26,56	79
96H1 0	579ZMPM0_63F; 579ZMPM0_63R	165; 166	85,78	26,08	63
	579ZMPM0_208F; 579ZMPM0_208R	167; 168	79,87	26,84	79
136A 1	579ZMPM0_206F; 579ZMPM0_206R	169; 170	89,81	32,09	70
	579ZMPM0_86F; 579ZMPM0_86R	171; 172	81,81	30,07	71
135F 7	579ZMPM0_79F; 579ZMPM0_79R	173; 174	75,82	25,43	72
	579ZMPM0_278F; 579ZMPM0_278R	175; 176	78,13	22,69	78
75H6	579ZMPM0_209F; 579ZMPM0_209R	177; 178	75,41	24,93	77
	579ZMPM0_86F; 579ZMPM0_86R	179; 180	81,81	30,07	71
117O 2	579ZMPM0_87F; 579ZMPM0_87R	181; 182	81,89	27,7	76
	579ZMPM0_91F; 579ZMPM0_91R	183; 184	80,13	26,93	75
173H 23	579ZMPM0_216F; 579ZMPM0_216R	185; 186	82,3	25,76	80
	579ZMPM0_95F; 579ZMPM0_95R	187; 188	79,5	24,97	73
118N 19	579ZMPM0_99F; 579ZMPM0_99R	189; 190	76,84	24,69	80
	579ZMPM0_244F; 579ZMPM0_244R	191; 192	80,07	25,38	80
42L2 3	579ZMPM0_241F; 579ZMPM0_241R	193; 194	81,16	25,79	79
	579ZMPM0_109F; 579ZMPM0_109R	195; 196	77,89	25,28	74
112N 13	579ZMPM0_109F; 579ZMPM0_109R	197; 198	77,89	25,28	74
	579ZMPM0_247F; 579ZMPM0_247R	199; 200	80,76	24,82	71
97K2 3	579ZMPM0_112F; 579ZMPM0_112R	201; 202	79,22	25,2	77
	579ZMPM0_125F; 579ZMPM0_125R	203; 204	83,44	28,17	74

18J17	579ZMPM0_253F; 579ZMPM0_253R	205; 206	77,5	32,34	71
	579ZMPM0_125F; 579ZMPM0_125R	207; 208	83,44	28,17	74
5M22	579ZMPM0_128F; 579ZMPM0_128R	209; 210	77,99	24,05	77
	579ZMPM0_136F; 579ZMPM0_136R	211; 212	78,65	26,46	78
146I6	579ZMPM0_131F; 579ZMPM0_131R	213; 214	76,58	26,54	78
	579ZMPM0_137F; 579ZMPM0_137R	215; 216	83,7	25,42	73
147O 15	579ZMPM0_138F; 579ZMPM0_138R	217; 218	79,38	24,8	79
	579ZMPM0_147F; 579ZMPM0_147R	219; 220	79,63	26,77	80
88K1 7	579ZMPM0_145F; 579ZMPM0_145R	221; 222	81,51	27,61	76
	579ZMPM0_262F; 579ZMPM0_262R	223; 224	75,7	25,82	80
180G 22	579ZMPM0_161F; 579ZMPM0_161R	225; 226	80,21	25,16	73
	579ZMPM0_265F; 579ZMPM0_265R	227; 228	79,3	24,7	79

Bảng 8: Hàm lượng trình tự của 13 dòng vô tính BAC được phân tích

BAC	# Kết quả đo	# Kết quả đo khi không có <i>E.coli</i>	Hàm lượng trình tự theo bp	Hàm lượng trình tự theo bp khi không có <i>E.coli</i>
144N24	10967	10849	3646226	3591222
119F13	17987	17847	6033910	5957456
219G11	32904	32484	10553629	10381924
86N21	39606	39106	12991596	12750077
16B06	36198	35849	12523123	12357036
84L18	50537	34162	15991645	10776458
128D02	15998	15847	5138442	5064677
25M23	22551	22416	7864493	7786402
96H10	7723	7614	2569604	2525488
19J24	21953	21775	7327364	7234315
136A01	31998	31724	10298869	10158900
75H06	24345	24121	8021727	7920125
135F07	29702	29484	9721708	9604010

B) Lắp ráp trình tự BAC, diễn giải và chọn lọc gen ứng viên:

Sản xuất khung trình tự: các dòng vô tính BAC 144N24, 119F13, 219G11, 86N21, 16B06, 84L18, 128D02, 25M23, 19J24, 96H10, 136A01, 75H06, 137F07 được giải trình tự bằng cách sử dụng kỹ thuật 454 (Margulies et al., 2005).

Quy trình lắp ráp tự động các trình tự nguyên của dòng vô tính BAC được thực hiện với phần mềm “Newbler” (phần mềm 454 runAssembly, phần mềm giải phóng 2.3). Các contig trình tự BAC pro sản xuất theo cách này được sắp xếp một cách chính xác bằng cách phân tích thủ công, trong đó các kỹ thuật sau được sử dụng:

1. Trình tự của các BAC chồng lắp có thể tạm chia thành vùng chồng lắp và vùng không chồng lắp.

2. Các contig trình tự từ các BAC chồng lắp khác nhau được so sánh trong các vùng chồng lắp. Khoảng 20% các contig trình tự có thể được sắp xếp theo cách này và khoảng trống giữa chúng có thể được thu hẹp (ví dụ, khi contig của một BAC bao phủ hoặc được liên kết với hai contig của các BAC khác).

3. Tất cả các contig trình tự được diễn giải thủ công. Về vấn đề này, ban đầu chỉ có các yếu tố lắp (transposon và retrotransposon, được viết tắt là “TE”) là được diễn giải. Do các khoảng trống trình tự xuất hiện chủ yếu ở các TE, nên việc diễn giải TE có thể giúp sắp xếp đúng các contig trình tự. Điều này có nghĩa là khi một đầu của TE là ở trên một contig trình tự và đầu còn lại ở trên contig kia, thì hai contig này có thể được sắp xếp thứ tự một cách thích hợp. Trong các trường hợp này, trình tự của 100 Ns lần lượt được cài xen vào để lấp đầy khoảng trống giữa các contig trình tự. Ngoài ra, thông tin từ các TE được lồng vào nhau (tức là các TE đã được cài xen vào các TE khác) được sử dụng để sắp xếp các contig trình tự.

4. Ở một số vùng, cả thông tin từ các BAC chồng lắp lẫn diễn giải TE đều không thể được sử dụng (đây là trường hợp, ví dụ, ở các vùng mà chỉ được bao phủ bởi một BAC). Trong bản mô tả này, các contig trình tự được sắp xếp tùy ý và các khoảng trống giữa chúng được lấp đầy bằng các trình tự 200 Ns.

5. Nhiều trong số các TE trong hệ gen ngô là các retrotransposon “lặp đoạn cuối dài” (long terminal repeat - LTR) có bên sườn là các trình tự LTR dài (1-2 kb).

Các LTR này có thể đồng nhất lên đến 100%. Trong một số trường hợp, thì, các trình tự nguyên của hai LTR này được lắp ráp thành trình tự liên ứng (tức là bản sao của LTR không có mặt trong cụm lắp ráp đó). Trong các trường hợp này, các khoảng trống trình tự được lấp đầy bằng một số lượng Ns mà tương ứng với chiều dài của LTR thứ hai.

6. Các gen được diễn giải thủ công. Nhằm mục đích này, các trình tự mã hóa (CDS) cho hệ gen ngô B73 đã công bố được sử dụng để tham khảo (http://www.maizegdb.org/gene_model.php). CDS được căn thẳng với trình tự RP4HTN bằng cách sử dụng DotPlot (<http://www.dotplot.org/>) và do đó các vị trí của exon và intron được xác định. Một mặt các gen ứng viên được xác định bằng cách mô tả chức năng của chúng (nếu đã được biết đến công khai). Mặt khác, CDS của RP4HTN kháng được so sánh với B73 AGPv02 để bị gây hại. Nếu xuất hiện sự khác biệt, thì gen tương ứng được cho trong danh sách các ứng viên. Trình tự đã chuẩn bị có chiều dài 1'328'253 bp. Danh sách các gen ứng viên được đưa ra trong bảng 1.

5. Phân tích phân tử các gen ứng viên:

Phân tích biểu hiện: sự biểu hiện của nhiều gen ứng viên khác nhau được thử nghiệm trên các cây 21 ngày tuổi (sau gieo hạt), không bị lây nhiễm (ngày lây nhiễm = 0 dpi) và trên cả các cây 36 ngày tuổi đã bị nhiễm và cũng không bị nhiễm *H. turcicum* (15 ngày sau khi lây nhiễm = 15 dpi inf/ni).

ARN từ lá thứ hai được chiết xuất từ các cây ngô thử nghiệm, được phiên mã ngược thành cADN và sự biểu hiện được xác định bằng cách sử dụng phương pháp qPCR. Trong mỗi trường hợp thì lá thứ hai được thu hoạch, làm đông lạnh và ARN được chiết, định lượng và thử nghiệm về chất lượng và độ tinh khiết bằng cách sử dụng bộ kit SV Total RNA Isolation System Kit (Z3100; Promega, Dübendorf, Thụy Sĩ), chính xác như được mô tả (Brunner et al., 2011; Risk et al., 2012).

1 µg ARN được phiên mã ngược bằng cách sử dụng iScript RT Supermix (170-8841; Bio-Rad, Cressier, Thụy Sĩ) trong thể tích phản ứng là 20 µl, theo chỉ dẫn của nhà sản xuất. Để loại trừ khả năng nhiễm tạp bởi ADN hệ gen (RT âm), thì đồng thời, hỗn hợp phản ứng không bổ sung transcriptaza ngược được ủ với mỗi mẫu.

Phương pháp PCR định lượng thời gian thực (quantitative real time PCR - RT-qPCR) được thực hiện lặp kỹ thuật ba lần hoặc nhiều lần ở thể tích phản ứng 10 μ l và có bổ sung 4 μ l cADN pha loãng tỷ lệ 1:10 (Tris HCL10mM độ pH=8, EDTA 0,1mM), 5 μ l SsoFast EvaGreen® Supermix (172-5201; Bio-Rad, Thụy Sĩ) và nồng độ đoạn mồi 400nM trên C1000 Touch Cyclor (Bio-Rad, Thụy Sĩ). Để khuếch đại, chương trình sau được sử dụng: 95°C trong 30 giây, tiếp theo là 40 chu kỳ ở 95°C trong 3 giây, sau đó 60-63°C (xem bảng 2) trong 5 giây. Để phân tích đường cong nóng chảy (loại trừ dime đoạn mồi), sản phẩm PCR được gia nhiệt trong các bước 0,5°C từ 65°C đến 95°C. Các đường cong khuếch đại và các đường cong nóng chảy được kiểm tra trong chương trình CFX Manager V 3.0 (Bio-Rad, Thụy Sĩ) và các trị số C_q (chu kỳ lượng hóa) được xuất vào chương trình qbasePLUS V 2.3 (Biogazelle, Zwijnaarde, Belgium) để xác định mức biểu hiện tương đối.

Các đoạn mồi dùng cho các gen ứng viên được xác định với sự trợ giúp của đoạn mồi BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), để loại trừ sự khuếch đại không đặc hiệu trên các bản phiên đã biết càng lâu càng tốt. Để đánh giá các amplicon thích hợp, các sản phẩm PCR được tách bằng cách sử dụng phương pháp điện di gel agarosa và các kích thước của chúng được kiểm tra bằng cách sử dụng các dải giao thoa được phân lập. Hơn nữa, các amplicon từ RP1HtN và cả NILHtN như quy định trong bảng 1 được giải trình tự. Để chuẩn hóa dữ liệu biểu hiện, các gen tham chiếu từ 1 đến 3 (LUG, MEP, FPGS) được sử dụng (Manoli et al., 2012).

Tất cả các gen ứng viên đều được biểu hiện trong kiểu gen dễ bị gây hại RP1 và trong kiểu gen kháng RP1HTN. Sự biểu hiện khác biệt giữa RP1 và RP1HTN có thể được chứng minh cho RLK1. RLK1 ở các cây dễ bị gây hại được biểu hiện mạnh hơn lên đến 4 lần so với ở cây kháng.

Bảng 9: Các cặp đoạn mồi cho các gen ứng viên, với chiều dài amplicon của chúng theo bp và nhiệt độ ủ thích hợp.

Tên gen	Tên đoạn mồi	SEQ ID NO:	Các trình tự đoạn mồi (F = Trình tự thuận; R = Trình tự nghịch)	Chiều dài (theo bp) trong RP1	Chiều dài (theo bp) trong RP1HTN	Nhiệt độ ủ
ZNF1	GH034 GH033	229 230	F: TGGTTGGTGTCTGAAGCTGAG R: ATTTATCCCGGCCTTTGCAT	130	130	60°C
HYD	GH039 GH040	231 232	F: GATCTACAGGGAAGCCCACTGA R: TTTTCCTTGAGGCAGTTATATGCT	74	74	60°C
RLK4	GH220 GH221	233 234	F: TTGTGCAGCGGAGGGAA R: CCAGGGCACCAGCAAGAAT	91	85	63°C
EXT1	GH168 GH170	235 236	F: CGACTACAAGACGCGTACC R: GGTGTCGATGGTGAGGTTC	103	103	60°C
RLK1	GH138 GH139	237 238	F: TATTGTTGGTGCTGTTGCCG R: GGACTCAATCCTTGTCCTG	121	121	60°C
RET1	GH055 GH056	239 240	F: CGCTCGTTTGCCAGATAGCC R: CACGGTGTGTGCCAGTTTGT	165	165	60°C

Sàng lọc quần thể TILLING và phát hiện thể đột biến: đối với các gen ứng viên (Bảng 1), tiến hành sàng lọc quần thể TILLING gồm 10000 cây mang thể nhập gen từ Pepitilla trên nhiễm sắc thể 8 ở vùng từ 151688552 đến 153139596 bp so với B73 tham chiếu AGPv02 (www.maizesequence.org) (RP3HTN1) và có tính kháng *Helminthosporium turcicum*. Các đột biến có thể là cải biến trao đổi nucleotit câm, cải biến trao đổi axit amin hoặc cải biến chặn codon và được hoạt động để phát hiện ra chức năng của các gen ứng viên.

Biến nạp: Các gen ứng viên có thể, ví dụ, được nhập nội vào kiểu gen dễ bị gây hại A188 thông qua biến nạp truyền *Agrobacterium tumefaciens*. Kiểu gen này

được đặc trưng bởi các trị số AUDPC 702 trong kiểm định GWH (n=18 cây), sao cho sự biến nạp gen kháng tạo ra đáp ứng kháng rõ ràng.

6. Xác định tính đặc hiệu nòi: chứng minh rằng HTN1 cũng truyền tính kháng không đặc hiệu nòi

Quy trình sàng lọc các kiểu gen với gen HtN được thực hiện ở nhiều vị trí trong tất cả các vùng xâm nhiễm ở châu Âu. Cho tới nay, tính kháng này không bị phá vỡ, do đó các tác giả sáng chế bắt đầu với giả định rằng cho tới nay chúng không đặc hiệu nòi cho tới khi nòi N được phát hiện ra. Nòi 1 chiếm ưu thế ở châu Âu, nhưng ở một số vùng riêng biệt, thì các nòi 2 hoặc 3 hoặc tổ hợp của chúng có thể được tìm thấy (Hanekamp et al., 2013).

7. Thử nghiệm kiểu hình trên các cây tái tổ hợp khác

Các cây tái tổ hợp mới được thử nghiệm đối với vùng QTL và tương quan với số liệu kiểu hình. Việc chọn lọc bao gồm các cây gồm các vùng khác nhau của vùng đích. Các cây tái tổ hợp có thể được nhận biết trong đó các cây này có thể nhập gen của thể cho B37HTN1 giữa các chỉ thị MA0005 và MA0021 – vùng chỉ thị M7 và các chỉ thị MA0013 và MA0022 – vùng chỉ thị M8, trong nền di truyền của RP1. Fig.4 thể hiện rằng vùng này chỉ chứa ba gen RLK4, EXT1 và RLK1. Các cây tái tổ hợp này, mà bao gồm vùng M7 – M8, có kiểu hình kháng ở cả thử nghiệm trên cánh đồng có cây ghép nhân tạo và ở cả thử nghiệm trong nhà kính.

8. Nhận biết gen ứng viên truyền tính kháng

Để nhận biết gen truyền tính kháng, tiến hành sàng lọc quần thể TILLING gồm 10000 cây đã có thể nhập gen từ Pepitilla trên nhiễm sắc thể 8 ở vùng từ 151688552 đến 153139596 bp so với B73 tham chiếu AGPv02 (<http://www.genome.arizona.edu>) (RP3HTN1) và tính kháng đối với *Helminthosporium turcicum*.

Các amplicon được phát triển cho các gen RLK4 và RLK1 (bảng 10) và sau khi khuếch đại ADN của từng cây riêng lẻ của quần thể TILLING, chúng được giải trình tự bằng phương pháp giải trình tự Sanger.

Bảng 10: Các trình tự đoạn mồi cho các amplicon

Tên gen	Tên đoạn mồi	SEQ ID NO:	Các trình tự đoạn mồi (F = Trình tự thuận; R = Trình tự nghịch)	Chiều dài của amplicon (theo bp)	Nhiệt độ ủ (°C)
RLK4	MA04916-6f MA04916-6r	247	F: TGTTTCAGGAATCACGCAAC	399	60
		248	TGGA R: GCACCACGCCATGACCAAC ATC		
RLK1	TG10013-10.f TG10013-11.r	249	F: CTTCCTACAGAAGACGAG	804	60
		250	AGT R: TTCCTCACGAGCTCTGTGGT C		

Các trình tự amplicon được đánh giá bằng cách sử dụng phần mềm DNASTAR Lasergene và các đột biến bazơ được nhận biết. Bảng 11 liệt kê các đột biến chọn lọc được tìm ra.

Bảng 11: Các đột biến được nhận biết cho các gen RLK4 và RLK1

Tên gen	Tên đột biến	Vị trí của đột biến trong cADN của RP3HTN1 (bp)	Cải biến trao đổi bazơ	Vị trí của đột biến trong trình tự protein của RP3HTN1 (bp)	Tác động trao đổi axit amin
RLK4	RLK4d	977 trong SEQ ID NO: 3	G > A	326 trong SEQ ID NO: 4	G > D
	RLK4f	1169 trong SEQ ID NO: 3	C > T	390 trong SEQ ID NO: 4	T > I
RLK1	RLK1b	1365 trong SEQ ID NO: 1	G > A	455 trong SEQ ID NO: 2	M > I
	RLK1d	1490 trong SEQ ID NO: 1	G > A	497 trong SEQ ID NO: 2	G > E

Các thể đột biến đã nhận biết được tự thụ tinh trong nhà kính và hạt giống cây được thu hoạch từ các cây đồng hợp tử với alen kiểu dại và alen đột biến trong mỗi sự kiện đột biến cho thử nghiệm kiểu hình.

15 cây riêng lẻ đồng hợp tử có alen kiểu dại và alen đột biến cho các thể đột biến RLK1b, RLK1d, RLK4d và RLK4f và các đối chứng RP1 và RP1HTN1 được cấy ghép *H. turcicum* như được mô tả ở trên, trong nhà kính. Trong giai đoạn từ 11 đến 25 ngày sau cấy ghép, sự xâm nhiễm được xác định hằng ngày. Các trị số AUDPC của tất cả các cây thử nghiệm được tổng kết trong bảng 12. Sự thay đổi axit amin ở bộ mẹ kháng của quần thể RP3HTN1 TILLING được mong đợi là làm cho các thể đột biến đồng hợp tử dễ bị gây hại.

Bảng 12: các trị số AUDPC đối với các cây đồng hợp tử có alen kiểu dại và alen đột biến của các gen RLK1 và RLK4. Trong cột kiểu hình, 0 – 100 nghĩa là kháng, 101 – 450 nghĩa là dị hợp tử, và > 450 nghĩa là dễ bị gây hại.

Tên thể đột biến	Alen	AUDPC	Kiểu hình
RLK4d	Hom. thể đột biến	33,3	kháng
	Hom. kiểu dại	0,0	kháng
RLK4f	Hom. thể đột biến	46,7	kháng
	Hom. kiểu dại	96,7	kháng
RLK1b	Hom. thể đột biến	346,7	dị hợp tử
	Hom. kiểu dại	46,4	kháng
RLK1d	Hom. thể đột biến	406,7	dị hợp tử
	Hom. kiểu dại	83,3	kháng
RP1		1030,0	dễ bị gây hại
RP1HTN1		0,0	kháng

Tài liệu tham khảo

- Bar-Zur, A, Tadmor, Y, Juvik, JA, Shimoni, M, & Reuveni, R (1998). "Resistance to northern leaf blight in maize (*Zea mays*) conditioned by the *HtN* gene and the association with isoperoxidases." *Canadian Journal of Plant Pathology* 20(1): 28-34.
- Brunner, S., Hurni, S., Herren, G., Kalinina, O., from Burg, S., Zeller, S.L., Schmid, B., Winzeler, M. and Keller, B. (2011) Transgenic *Pm3b* wheat lines show resistance to powdery mildew in the field. *Plant Biotechnology Journal*, no-no.
- Chevalier, BS, Kortemme, T, Chadsey, MS, Baker, D, Monnat, RJ, Stoddard, BL (2002). "Design, activity, and structure of a highly specific artificial endonuclease". *Mol. Cell* 10 (4): 895–905. doi:10.1016/S1097-2765(02)00690-1.
- Carson, ML (1995) "A new gene in maize conferring the chlorotic halo reaction to infection by *Exserohilum turcicum*. *Plant Disease* 79: 717-720.
- Chung, C-L, Poland, J, Wisser, R, Kolkman, J, and Nelson, R (2008). "Analysis of qEt8.06, a Major QTL for Resistance to Northern Leaf Blight in Maize" Poster, Annual Research Meeting of Generation Challenge Programme, Bangkok, Thailand.
http://www.plantpath.cornell.edu/labs/nelson_r/Docs/01_CLC_08GCP_12Sep08_2.pdf
- Chung, C-L, Jamann, T, Longfellow, J and Nelson, R (2010). "Characterization and fine-mapping of a resistance locus for northern leaf blight in maize bin 8.06" *Theoretical and Applied Genetics* 121(2): 205-227.
- Coates, ST and White DG (1998). "Inheritance of resistance to gray leaf spot in crosses involving selected resistant inbred lines of corn." *Phytopathology* 88(9): 972-982.
- Depicker A, Stachel S, Dhaese P, Zambryski P, Goodman HM (1982) Nopaline synthase: transcript mapping and DNA sequence. *J Mol Appl Genet.* 1(6): 561-73.

Ferguson, LM and Carson ML (2007). "Temporal Variation in *Setosphaeria turcica* Between 1974 and 1994 and Origin of Races 1, 23, and 23N in the United States." *Phytopathology* 97: 1501-1511.

Gevers, HO (1975). "A new major gene for resistance to *Helminthosporium turcicum* leaf blight of maize." *Plant Dis Rep* 59: 296-300.

Gaj, T, Gersbach, CA and Barbas III, CF (2013). ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends in biotechnology*.

Ganal MW, Durstewitz G, Polley A, Bérard A, Buckler ES, Charcosset A, Clarke JD, Graner E-M, *et al.* (2011) "A large maize (*Zea mays* L.) SNP genotyping array: Development and germplasm genotyping, and genetic mapping to compare with the B73 reference genome." *PLoS ONE* 6 e28334.

Gianasi, L, de Castro, HA and da Silva, HP (1996). "Raças fisiológicas de *Exserohilum turcicum* identificadas em regiões produtoras de milho no Brasil, Safra 93/94." [Physiological races of *Exserohilum turcicum* identified in maize-producing regions of Brazil, Safra 93/94] *Summa Phytopathol.* 22: 214-217.

Griffiths, AJF, Miller, JH, Suzuki, DT, Lewontin, RC and Gelbart, WM (2000) *An Introduction to Genetic Analysis*, 7th edition, New York: W. H. Freeman; ISBN-10: 0-7167-3520-2

Gupta, PK and Varshney, R (2013) *Cereal Genomics II*. Springer Science+Business Media Dordrecht, Netherlands; DOI: 10.1007/978-94-007-6401-9_1.

Hanekamp H., Kessel B., Koopmann B., von Thiedemann A.: *Turcicum Blattdürre an Mais: Rassenbestimmung und regionales Auftreten von Exserohilum turcicum in Europa* [Turcicum leaf blight in maize: race determination and regional occurrence of *Exserohilum turcicum* in Europe]; 28.01.2013, PG Krankheiten an Getreide, Vortrag; Blattdürre.

Jordan, EG, Perkins, JM, Schall, RA and Pedersen, WL (1983). "Occurrence of race 2 of *Exserohilum turcicum* on corn in the central and eastern United States." *Plant Disease* 67: 1163-1165.

Li, T., Huang, S., Jiang, W. Z., Wright, D., Spalding, M. H., Weeks, D. P., & Yang, B. (2011). TAL nucleases (TALNs): hybrid proteins composed of TAL effectors and FokI DNA-cleavage domain. *Nucleic acids research*, 39(1), 359-372.

Lipps, PE, and Hite, RE (1982). "*Exserohilum turcicum* virulent on corn with the HT resistance gene in Ohio." *Plant Disease* 66: 397-398.

Lipps, PE, Pratt, RA and Hakiza, JJ (1997). "Interaction of *HT* and partial resistance to *Exserohilum turcicum* in maize." *Plant Disease* 81: 277-282.

Maniatis, T, Fritsch, EF, Sambrook, J (1982) Molecular cloning. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York

Manoli A., Sturaro A., Trevisan S., Quaggiotti S., Nonis A. (2012) Evaluation of candidate reference genes for qPCR in maize, *Journal of Plant Physiology*, Volume 169, Issue 8, 15 May 2012, Pages 807-815.

Margulies, M, Egholm, M, Altman, WE, Attiya, S, Bader, JS, Bemben, LA et al. and Volkmer, GA (2005) "Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors." *Nature*, 437(7057), 376-380.

Moghaddam, FP and Pataky, JK (1994). "Reactions for isolates from mating of races 1 and 23N of *Exserohilum turcicum*." *Plant Disease* 78: 767-771.

Min, J, Chunyu, Z, Khalid, H, Nan, L., Quan, S, Qing, M, Suwen, W and Feng, L (2012). "Pyramiding resistance genes to Northern Leaf Blight and Head Smut in maize." *Int. J. Agric. Biol.* 14(3): 430-434.

Odell JT, Nagy F, Chua N-H (1985) Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* 313, 810 – 812

Pataky, JK, Raid, RN, du Toit, LJ and Schueneman, TJ (1998). "Disease severity and yield of sweet corn hybrids with resistance to Northern Leaf Blight." *Plant Disease* 82(1): 57-63.

Perkins, JM and Pedersen, WL (1987). "Disease development and yield losses associated with northern leaf blight on corn." *Plant Disease* 71: 940-943.

Pratt, R and Gordon, S (2006). "Breeding for resistance to maize foliar pathogens." *Plant Breed Rev.* 27: 119-173.

Puchta, H and Hohn, B (2010). Breaking news: Plants mutate right on target. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(26), 11657-11658.

Raymundo, AD and Hooker, AL (1981a). "Measuring the relationship between northern corn leaf blight and yield losses." *Plant Disease* 65: 325-327.

Raymundo, AD, Hooker, AL and Perkins, JM (1981b). "Effect of Gene HtN on the Development of Northern Corn Leaf Blight Epidemics." *Plant Disease* 65(4): 327-329.

Risk, J.M., Selter, L.L., Krattinger, S.G., Viccars, L.A., Richardson, T.M., Buesing, G., Herren, G., Lagudah, E.S. and Keller, B. (2012) Functional variability of the *Lr34* durable resistance gene in transgenic wheat. *Plant Biotechnology Journal*, 10, 477-487.

Rozen, S and Skaletsky, HJ (2000) primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386

Rushton, PJ, Torres, JT, Parniske, M, Wernert, P, Hahlbrock, K and Somssich, IE (1996) Interaction of elicitor-induced DNA-binding proteins with elicitor response elements in the promoters of parsley PR1 genes. *EMBO J.* 15(20): 5690–5700.

Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular Cloning. A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3. Aufl. 2001. Sanger, F and Coulson, AR. (1975) *J. molec. Biol.* 94, 414–418.

Silva, G, Poirot, L, Galetto, R, Smith, J, Montoya, G, Duchateau, P, & Pâques, F (2011) Meganucleases and other tools for targeted genome engineering: perspectives and challenges for gene therapy. *Current gene therapy*, 11(1), 11.

Simcox, KD, and Bennetzen, JL (1993). "The use of molecular markers to study *Setospaeria turcica* resistance in maize." *Phytopathology* 83: 1326-1330.

Shimoni, M, Bar-Zur, A, & Reuveni, R (1991). The association of peroxidase activity and resistance of maize to *Exserohilum turcicum*. *Journal of phytopathology*, 131(4), 315-321.

Stanković, S, Lević, J, & Ivanović, D (2007). Genetic variability of maize pathogens in Serbia. *Genetika*, 39(2), 227-240.

Thakur, RP, Leonard, KJ and Leath, S (1989). "Effects of temperature and light on virulence of *Exserohilum turcicum* on corn." *Phytopathology* 1989, 79: 631–635.

Tzfira, T, Weinthal, D, Marton, I, Zeevi, V, Zuker, A, & Vainstein, A (2012). Genome modifications in plant cells by custom-made restriction enzymes. *Plant biotechnology journal*, 10(4), 373-389.

Ullstrup, AJ and Miles, SR (1957). "The effects of some leaf blights on corn grain yield." *Phytopathology* 47:331-336.

Walsh et al. (2008), Poster presentation P192, 50th Maize Genetics Conference in Washington D.C.

Welz, HG (1998). "Genetics and epidemiology of the pathosystem *Zea mays* / *Setosphaeria turcica*." *Habilitationsschrift Institut for Pflanzenzüchtung, Saatgutforschung and Populationsgenetik, Universität Hohenheim*.

Welz, HG and Geiger, HH (2000). "Genes for resistance to northern corn leaf blight in diverse maize populations." *Plant Breeding* 119: 1-14.

WO/2000/29592 (Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V.). Chimeric promoters capable of conferring gene expression in plants upon pathogen infection and uses thereof.

WO/2007/147395 (KWS SAAT AG). Pathogen induzierbarer synthetischer Promotor [Pathogen-inducible synthetic promoter].

WO/2010/079430 (Bonas et al.) Modular DNA-binding domains and methods of use

WO/2011/072246 (Regents of the University of Minnesota) TAL effector-conferred DNA modification.

WO/2011/163590 (Du Pont) Compositions and methods for enhancing resistance to Northern Leaf Blight in maize.

Yêu cầu bảo hộ

1. Phương pháp nhận biết cây ngô kháng *Helminthosporium turcicum*, hệ gen của cây ngô được tích hợp đoạn nhiễm sắc thể từ thể cho Pepitilla, phương pháp này bao gồm việc phát hiện ít nhất hai alen trong hệ gen của cây,
 - (i) trong đó ít nhất một alen nằm trong đoạn hệ gen được chặn bằng chỉ thị trong vùng chỉ thị thứ nhất, vùng chỉ thị thứ hai, vùng chỉ thị thứ ba hoặc vùng chỉ thị thứ tư và bằng polynucleotit tạo ra đặc tính kháng *Helminthosporium turcicum* cho cây ngô,
 - (ii) trong đó ít nhất một alen nằm trong đoạn hệ gen được chặn bằng polynucleotit mà tạo ra tính kháng với *Helminthosporium turcicum* và bằng chỉ thị trong vùng chỉ thị thứ sáu hoặc vùng chỉ thị thứ năm; và trong đó vùng chỉ thị thứ nhất được chặn bằng các chỉ thị SYN14136 và PZE-108076510, vùng chỉ thị thứ hai được chặn bằng các chỉ thị SYN24931 và PZE-108077560, vùng chỉ thị thứ ba được chặn bằng các chỉ thị PZE-108093423 và PZE-108093748, vùng chỉ thị thứ tư được chặn bằng các chỉ thị MA0004 và MA0005, vùng chỉ thị thứ năm được chặn bằng các chỉ thị MA0006 và PZE-108097482, và vùng chỉ thị thứ sáu được chặn bằng các chỉ thị PZE-108107671 và SYN4196.
2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó việc phát hiện cây ngô có đặc tính kháng *Helminthosporium turcicum* bao gồm việc sử dụng oligonucleotit chứa trình tự nucleotit được chọn từ nhóm gồm các SEQ ID NO: 17-52, 62-64, và 244-246.
3. Phương pháp theo điểm 1, trong đó việc phát hiện cây ngô có đặc tính kháng *Helminthosporium turcicum* bao gồm việc sử dụng oligonucleotit chứa trình tự nucleotit được chọn từ nhóm gồm các SEQ ID NO: 17-52,

trong đó oligonucleotit tương ứng với ít nhất một trong số vùng chỉ thị thứ nhất được chặn bằng các chỉ thị SYN14136 và PZE-108076510, vùng chỉ thị thứ hai được chặn bằng các chỉ thị SYN24931 và PZE-108077560, vùng chỉ thị thứ ba được chặn bằng các chỉ thị PZE-108093423 và PZE-108093748, vùng chỉ thị thứ tư được chặn bằng các chỉ thị MA0004 và MA0005, vùng chỉ thị thứ năm được chặn bằng các chỉ thị MA0006 và PZE-108097482, và vùng chỉ thị thứ sáu được chặn bằng các chỉ thị PZE-108107671 và SYN4196.

4. Phương pháp theo điểm 1, trong đó đoạn nhiễm sắc thể chứa khoảng cho còn chứa khoảng cho có ít nhất là alen cho của chỉ thị MA0008.
5. Phương pháp theo điểm 1, trong đó đoạn nhiễm sắc thể không chứa:
 - a) khoảng cho ở giữa chỉ thị trong vùng chỉ thị thứ nhất được chặn bằng các chỉ thị SYN14136 và PZE-108076510 và chỉ thị trong vùng chỉ thị thứ hai được chặn bằng các chỉ thị SYN24931 và PZE-108077560,
 - b) khoảng cho ở giữa chỉ thị trong vùng chỉ thị thứ ba được chặn bằng các chỉ thị PZE-108093423 và PZE-108093748 và chỉ thị trong vùng chỉ thị thứ tư được chặn bằng các chỉ thị MA0004 và MA0005, và
 - c) khoảng cho ở giữa chỉ thị trong vùng chỉ thị thứ năm được chặn bằng các chỉ thị MA0006 và PZE-108097482 và chỉ thị trong vùng chỉ thị thứ sáu được chặn bằng các chỉ thị PZE-108107671 và SYN4196.
6. Phương pháp theo điểm 1, trong đó đoạn nhiễm sắc thể không chứa:
 - a) khoảng cho được xác định bằng chỉ thị SYN14136 và chỉ thị SYN24931;
 - b) khoảng cho được xác định bằng chỉ thị PZE-108093748 và chỉ thị MA0005; và
 - c) khoảng cho được xác định bằng chỉ thị MA0006 và PZE-108107671.
7. Phương pháp theo điểm 1, trong đó đoạn nhiễm sắc thể không chứa khoảng cho được xác định bằng và bao gồm chỉ thị SYN14136 và chỉ thị SYN24931.
8. Phương pháp theo điểm 1, trong đó đoạn nhiễm sắc thể không chứa khoảng cho được xác định bằng và bao gồm chỉ thị PZE-108093748 và chỉ thị MA0005.
9. Phương pháp theo điểm 1, trong đó đoạn nhiễm sắc thể không chứa khoảng cho được xác định bằng và bao gồm chỉ thị MA0006 và chỉ thị PZE-108107671.

FIG. 1

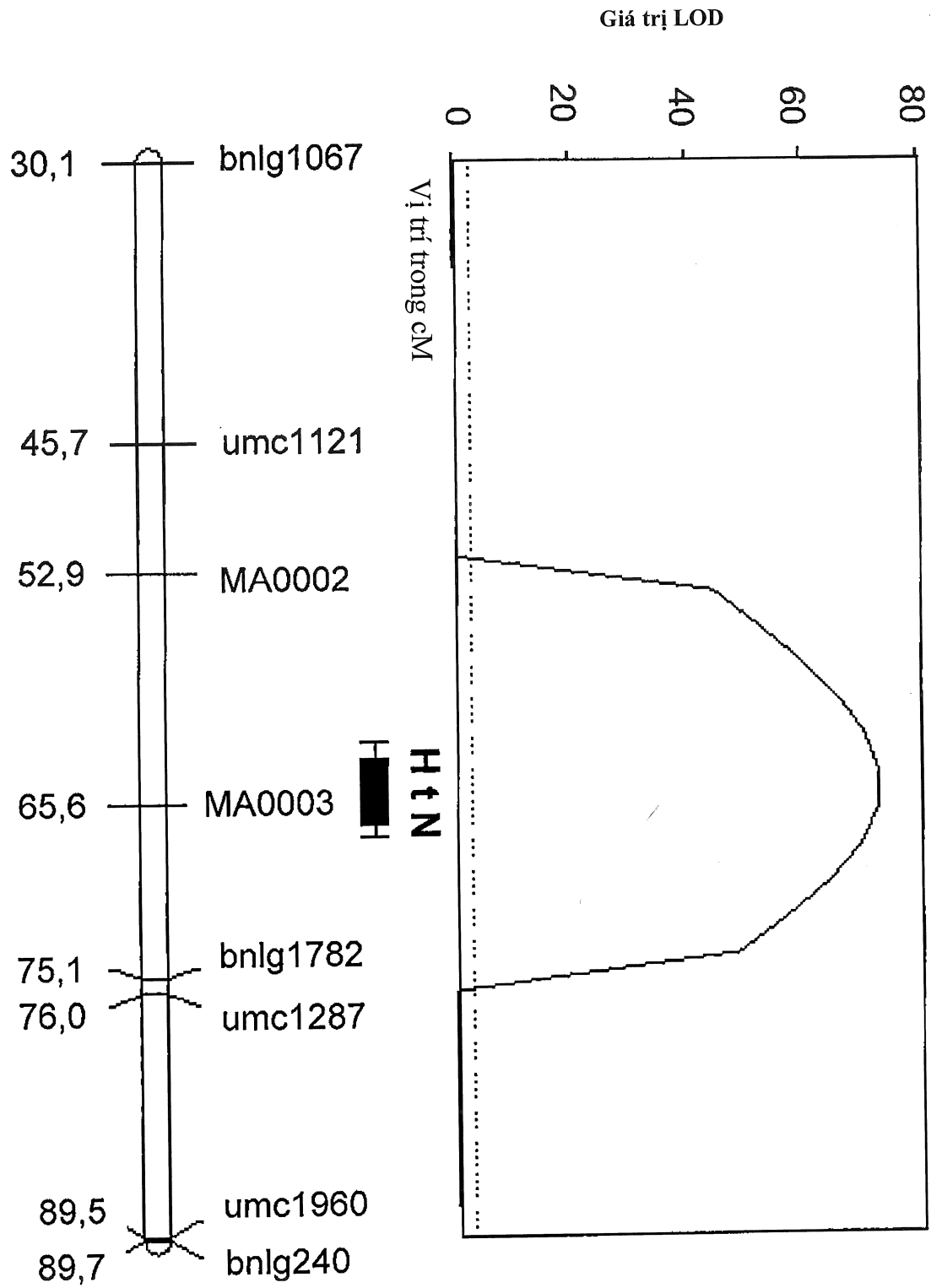


FIG. 2

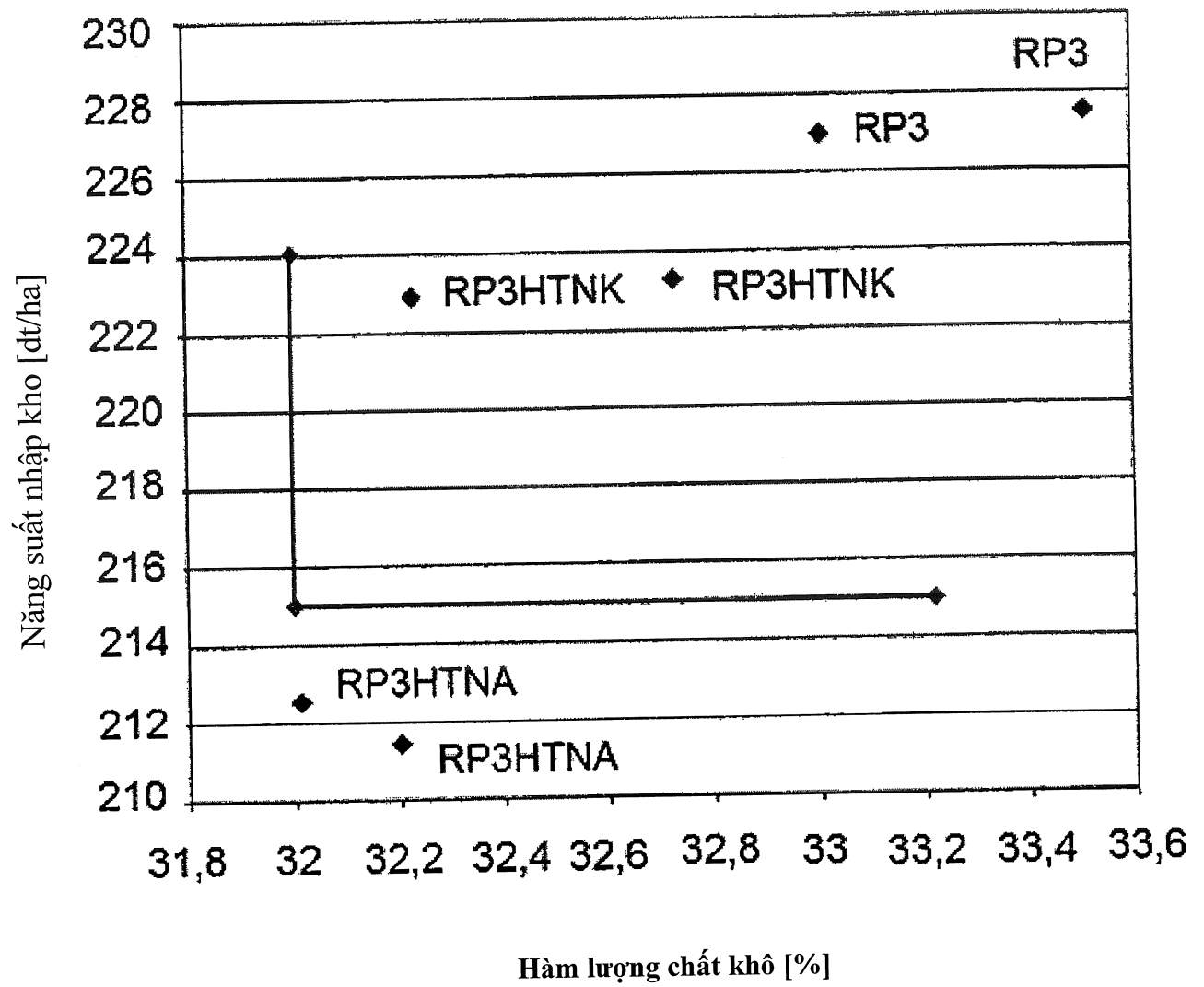


FIG. 3

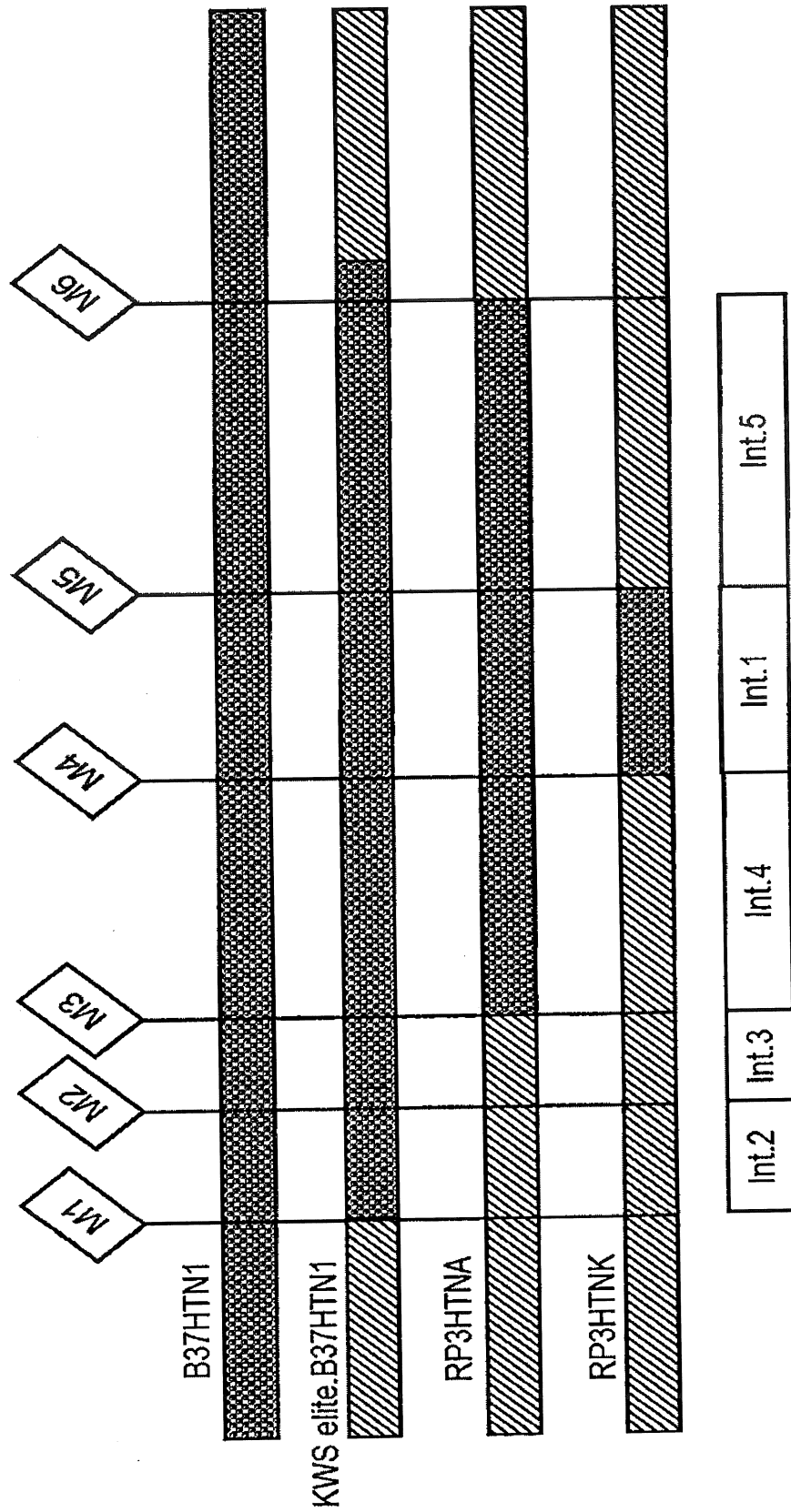
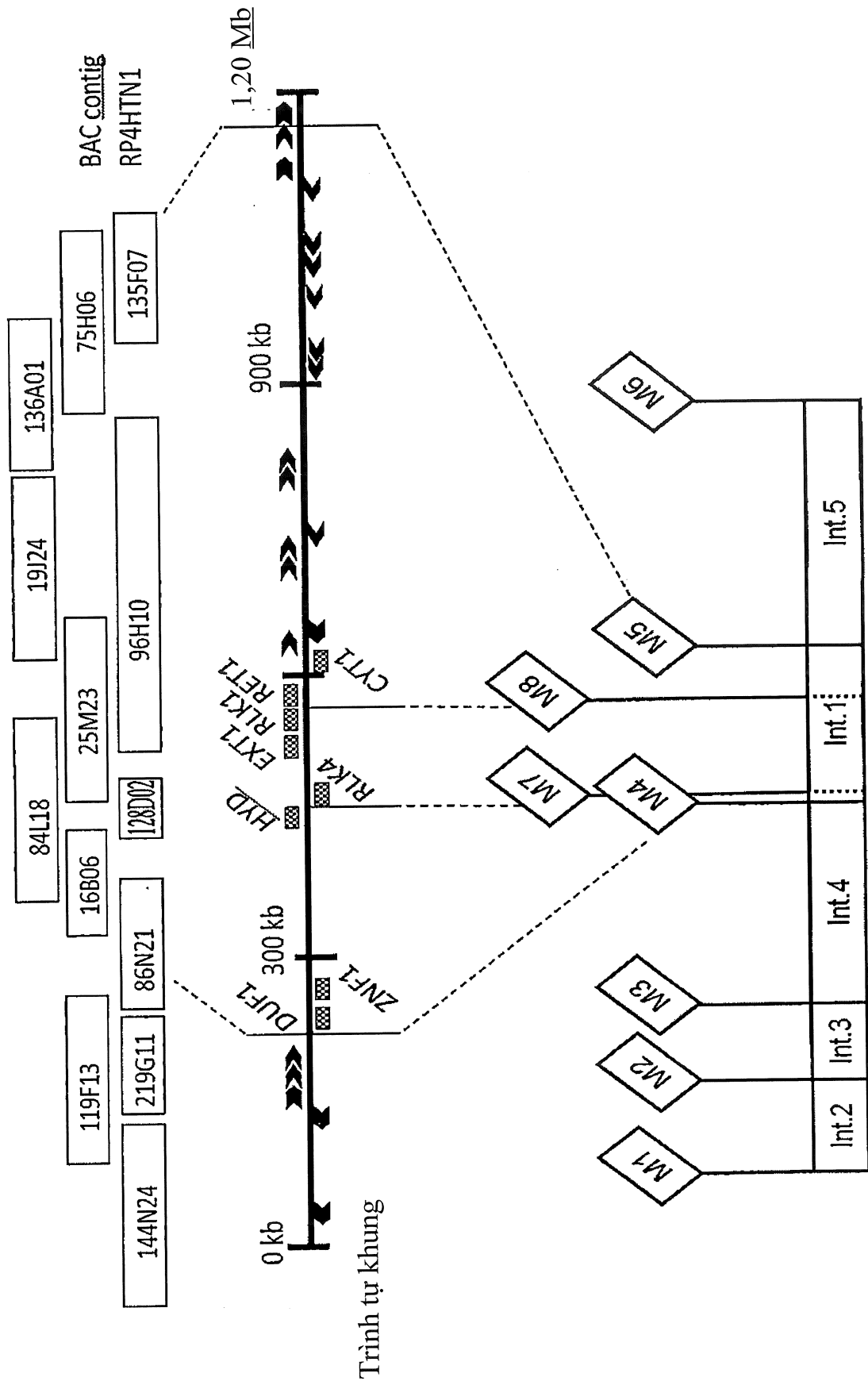


FIG. 4



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> KWS SAAT AG
Universität Zürich

<120> PHƯƠNG PHÁP NHẬN BIẾT CÂY NGÔ KHÁNG HELMINTHOSPORIUM TURCICUM

<130> KWS 0206 PCT

<150> DE 10 2013 014 637.2

<151> 2013-09-04

<150> DE 10 2014 005 823.9

<151> 2014-04-24

<160> 250

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 2004

<212> ADN

<213> Zea mays

<400> 1

atggctgctc accagcctca cctctccgtc ctctctctcg tctctctcgc tgcccatgtc	60
gtctccacct ccgcccatgg cgagcctcct cttccgagcc cttacaacac ctccgcccac	120
ggcgagcctc ctcttccgag cacttacaac gcctccatgt gtcgctcggt ctgggtgtggc	180
ggcgctcgaga tccgctaccc gttctatctt gccaacgcaa tcgccgacta cagcgggagc	240
tactactcct gcggctacac cgacttgagc gtttctctcg aactcgaggt cgaggggtcg	300
ccgacgacct ggacccttac catccgtctc ggcgggcgcg actacaccgt caagaacatc	360
tcctacctct acgaccagca gaccatctca ctggcgagca gagatgtgct cggaggcggc	420
ggctgccccg tcgtccgcca caacgtcagc ttcgacgaga cgtggctgca cctgcacaac	480
gccagcgcct tcgacaacct caccttcttc ttcggatgcc actggggggc acggaatata	540
ccgcctgaat ttgccgacta caacatcagc tgcgccgggt tcaatactcc aactatcagc	600
ggtggaaggt ccttcgtggt caagactgga gatcttgacg aacaagagga gcaggagtgtg	660
gctttacact gcgacgaggt tttctccgtg ccagtgagaa gagatgctct gcaggcgatc	720
gtcagcaact tcagcctcac acgggacggg tacggcgagg tgcttaggca ggggttcgag	780
ttggaatgga atcgacatc ggaggatcag tgtggccggg gcgagggatc gggctccggc	840

```

ggatggtgcg cctacagcca gaagagagaa ttcttgggct gcttgtgcag cggaggggaag      900
gtgggcagcc cgttctgcaa accatcgaga tcaaaaagga aagaaggacc tattgttggt      960
gctgttgccg ttgcattcct gtgtctagtc attctcacat gcttcttggc ttgtagacat     1020
ggttcgctgc ccttcaaadc ggagaacaaa ccagggacaa ggattgagtc cttcctacag     1080
aagaacgaga gtatacatcc gaaaagatac acctacgcgg acgtgaaaag aatgacaaaa     1140
tccttcgctg tgaagctagg ccaaggtggg ttgggtgctg tatacaaagg cagcctccac     1200
gatggccgac aggtagcagt caagatgctg aaggacaccc aaggtgacgg cgaggaattc     1260
atgaacgagg tggctagcat cagcaggact tctcatgtca acgtcgtgac acttctaggg     1320
ttttgcttgc aagggtcgaa aagagcactg atctacgagt acatgcccaa tggttcgctc     1380
gaaaggtatg ccttcaccgg tgacatgaac agtgagaatt tgctaacctg ggaaaggcta     1440
tttgacatag caattggcac ggccagaggg ctggaatacc tacaccgggg atgcaacact     1500
cggatcgtgc attttgacat caagccacac aacatcctgt tagaccagga tttctgtcct     1560
aagatctctg actttggact ggccaagcta tgtctgaaca aagagagcgc tatctccatt     1620
gctggcgcaa gagggacgat agggatatat gccccggagg tctactcaaa gcaatttgga     1680
ataataagca gcaagtctga tgtctatagc tatgggatga tggtccttga gatggttgga     1740
gcaagggaca ggaatacaag cgcagatagt gaccatagca gccaatatth ccctcagtgg     1800
ctttatgaac atttggacga ctattgtgtt ggtgcttccg agattaatgg tgagaccaca     1860
gagctcgtga ggaagatgat agttgtaggt ctgtggtgca tacaagtgat tccgactgat     1920
cgaccaacaa tgacgagagt cgtcgagatg ttggaaggga gcacaagtaa tctagagttg     1980
ccacccagag ttctcttgag ctga                                             2004

```

```

<210> 2
<211> 667
<212> PRT
<213> Zea mays

```

```

<400> 2

```

```

Met Ala Ala His Gln Pro His Leu Ser Val Leu Leu Leu Val Leu Leu
1           5           10          15

```

```

Ala Ala His Val Val Ser Thr Ser Ala His Gly Glu Pro Pro Leu Pro

```

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

Val Ser Asn Phe Ser Leu Thr Arg Asp Gly Tyr Gly Glu Val Leu Arg
 245 250 255

Gln Gly Phe Glu Leu Glu Trp Asn Arg Thr Ser Glu Asp Gln Cys Gly
 260 265 270

Arg Cys Glu Gly Ser Gly Ser Gly Gly Trp Cys Ala Tyr Ser Gln Lys
 275 280 285

Arg Glu Phe Leu Gly Cys Leu Cys Ser Gly Gly Lys Val Gly Ser Pro
 290 295 300

Phe Cys Lys Pro Ser Arg Ser Lys Arg Lys Glu Gly Pro Ile Val Gly
 305 310 315 320

Ala Val Ala Val Ala Phe Leu Cys Leu Val Ile Leu Thr Cys Phe Leu
 325 330 335

Ala Cys Arg His Gly Ser Leu Pro Phe Lys Ser Glu Asn Lys Pro Gly
 340 345 350

Thr Arg Ile Glu Ser Phe Leu Gln Lys Asn Glu Ser Ile His Pro Lys
 355 360 365

Arg Tyr Thr Tyr Ala Asp Val Lys Arg Met Thr Lys Ser Phe Ala Val
 370 375 380

Lys Leu Gly Gln Gly Gly Phe Gly Ala Val Tyr Lys Gly Ser Leu His
 385 390 395 400

Asp Gly Arg Gln Val Ala Val Lys Met Leu Lys Asp Thr Gln Gly Asp
 405 410 415

Gly Glu Glu Phe Met Asn Glu Val Ala Ser Ile Ser Arg Thr Ser His
 420 425 430

Val Asn Val Val Thr Leu Leu Gly Phe Cys Leu Gln Gly Ser Lys Arg
 435 440 445

Ala Leu Ile Tyr Glu Tyr Met Pro Asn Gly Ser Leu Glu Arg Tyr Ala
 450 455 460

Phe Thr Gly Asp Met Asn Ser Glu Asn Leu Leu Thr Trp Glu Arg Leu
 465 470 475 480

Phe Asp Ile Ala Ile Gly Thr Ala Arg Gly Leu Glu Tyr Leu His Arg
 485 490 495

Gly Cys Asn Thr Arg Ile Val His Phe Asp Ile Lys Pro His Asn Ile
 500 505 510

Leu Leu Asp Gln Asp Phe Cys Pro Lys Ile Ser Asp Phe Gly Leu Ala
 515 520 525

Lys Leu Cys Leu Asn Lys Glu Ser Ala Ile Ser Ile Ala Gly Ala Arg
 530 535 540

Gly Thr Ile Gly Tyr Ile Ala Pro Glu Val Tyr Ser Lys Gln Phe Gly
 545 550 555 560

Ile Ile Ser Ser Lys Ser Asp Val Tyr Ser Tyr Gly Met Met Val Leu
 565 570 575

Glu Met Val Gly Ala Arg Asp Arg Asn Thr Ser Ala Asp Ser Asp His
 580 585 590

Ser Ser Gln Tyr Phe Pro Gln Trp Leu Tyr Glu His Leu Asp Asp Tyr
 595 600 605

Cys Val Gly Ala Ser Glu Ile Asn Gly Glu Thr Thr Glu Leu Val Arg
 610 615 620

Lys Met Ile Val Val Gly Leu Trp Cys Ile Gln Val Ile Pro Thr Asp
 625 630 635 640

Arg Pro Thr Met Thr Arg Val Val Glu Met Leu Glu Gly Ser Thr Ser
 645 650 655

Asn Leu Glu Leu Pro Pro Arg Val Leu Leu Ser
 660 665

<210> 3
 <211> 2133
 <212> ADN
 <213> Zea mays

<400> 3
 atggctgctc acctaccacg cctccccgtc ctctcctcgc tcctcctcgc tgcccatgtc 60
 gtctccacct cgcgccatgg cgagcctcct cttccgagca cttacaacac ctccgccccat 120
 ggcgagcctc ttcttccgag cacttacaac gcctccatgt gctcggaatc gttctgggtgt 180
 ggcggcgctc agatccgcta cccgttcaat cttgccaacg caaccgccga ctacagcggg 240
 aactactact cctgcggcta caccgacttg agcgtttctt gcgaactcga ggtcgaaggg 300
 tcgccgacga cctggacccc taccatccgt ctcggcggcg acatctacac cgtcaagaac 360
 atctcctacg actatcatac catctcactg gcggacaacg atgtgctcgg aggcggcgag 420
 tgccccgtcg tccgccacaa cgtcagcttc aacgagacgt ggctgcacaa cgccagcgcc 480
 ttcgacaacc tcaccttctt cttcgatgc cactgggggc cacggaatac accgcctgaa 540
 tttgccgact acaacatcag ctgcgccggg ttcaatcctc caactatcag cgggtggagac 600
 tccttcgtgt tcaagcctga atatcttgac gaacaagagg agcaggagtt ggcttcacac 660
 tgcgacgagg ttttctccgt gccagtcaga agcgatgctc tgcgggcgac cttcagcctc 720
 acagggtagc ggtacggcga gctgcttagg caggggttcg ggttggaatg gaatcggaca 780
 tcggaggatc agtgtggcca gtgcgaggga tcgggctccg gcggatgggtg cgcctacagc 840
 cagaagagag aattcctggg ctgcttggtg agcggaggga aggtgggcaa cccgttctgc 900
 aaaccatcga agtcaacaag gaaaccaaga attcttgctg gtgccctggg tgggtggtgt 960
 gctgcgctgc ttgttggtgc tgccatattt ttgttcgtca tcatgcgcaa gaggaagcag 1020
 aagaagaaag tgaccaactc gtcttcgaag ctctcaagt acagcggctc tgggtgggacc 1080
 ccgcgttcgc gggttggtga catggagtcc ggcagcatcg aggacccgcc aacgcaccac 1140
 ttgcctacg aggagctcga ggaggcgacc aaccgcttcg acgaaagcag agaactcggc 1200
 gatggcggct tcggcaccgt ctacaaaggg tacctcaggg acgggcgcgt ggtggcggtg 1260
 aagcggctgt acaacaacgg gtaccggcgc gtggagcagt tccagaacga ggcggccatc 1320
 ctgtcggggc tgcgccaccc aaacctcgtc atgttctacg gctgcacgtc cagccacagc 1380

```

cgcgagctcc tgctggtgta cgagttcgtg gccaacggca cggtcgccga ccacctgcac      1440
gggcagcggg ccccccagcg cgccctctcg tggccgctcc gcctcagcgt cgccgtggag      1500
tccgccgagg cgctcaccta cctgcacgcc atcgagccgc ccgtcgtgca ccgcgacgtc      1560
aagaccacca acatcctcct ggacgccgac taccacgtca aggtcgccga cttcggcctc      1620
tcccgcctct tccccctcga cgtaacgcac gtctccaccg ctccgcaggg cagcccaggg      1680
tatgttgatc cagagtacca ccagtgtac cagctgacgg acaagagcga cgtgtacagc      1740
ttcgggggtg tcctggtgga gtcacatctc tccaagccgg ccgtcgacat cacccgccac      1800
cgcagcgaga tcaacctggc cagcatggcc atcagcaaga tccagaagtg ccagctggag      1860
gagctcgtcg acctcggcct gggctacgac accgacccgg ccaccaggaa gatgatgacg      1920
atggtcgcgg agctggcctt ccgctgcctg cagcagaacg gcgagatgcg cccgccgac      1980
aaggaggtgc tcgaggtgct caggaacatc cagggcgagt gtctgacgtc ggggaaggat      2040
ggggacaaga gcaaggacgg gcccttctct cccaccacgg ttcacgctcc gtgggacagc      2100
aggtccacga cgcccaacac cagcagggac tag                                  2133

```

```

<210> 4
<211> 710
<212> PRT
<213> Zea mays

```

```

<400> 4

```

```

Met Ala Ala His Leu Pro Arg Leu Pro Val Leu Leu Leu Val Leu Leu
1              5              10              15

```

```

Ala Ala His Val Val Ser Thr Ser Ala His Gly Glu Pro Pro Leu Pro
                20              25              30

```

```

Ser Thr Tyr Asn Thr Ser Ala His Gly Glu Pro Leu Leu Pro Ser Thr
          35              40              45

```

```

Tyr Asn Ala Ser Met Cys Ser Glu Ser Phe Trp Cys Gly Gly Val Glu
          50              55              60

```

```

Ile Arg Tyr Pro Phe Asn Leu Ala Asn Ala Thr Ala Asp Tyr Ser Gly
65              70              75              80

```

Asn Tyr Tyr Ser Cys Gly Tyr Thr Asp Leu Ser Val Ser Cys Glu Leu
 85 90 95

Glu Val Glu Gly Ser Pro Thr Thr Trp Thr Pro Thr Ile Arg Leu Gly
 100 105 110

Gly Asp Ile Tyr Thr Val Lys Asn Ile Ser Tyr Asp Tyr His Thr Ile
 115 120 125

Ser Leu Ala Asp Asn Asp Val Leu Gly Gly Gly Glu Cys Pro Val Val
 130 135 140

Arg His Asn Val Ser Phe Asn Glu Thr Trp Leu His Asn Ala Ser Ala
 145 150 155 160

Phe Asp Asn Leu Thr Phe Phe Phe Gly Cys His Trp Gly Pro Arg Asn
 165 170 175

Thr Pro Pro Glu Phe Ala Asp Tyr Asn Ile Ser Cys Ala Gly Phe Asn
 180 185 190

Pro Pro Thr Ile Ser Gly Gly Asp Ser Phe Val Phe Lys Pro Glu Tyr
 195 200 205

Leu Asp Glu Gln Glu Glu Gln Glu Leu Ala Ser His Cys Asp Glu Val
 210 215 220

Phe Ser Val Pro Val Arg Ser Asp Ala Leu Arg Ala Thr Phe Ser Leu
 225 230 235 240

Thr Gly Tyr Gly Tyr Gly Glu Leu Leu Arg Gln Gly Phe Gly Leu Glu
 245 250 255

Trp Asn Arg Thr Ser Glu Asp Gln Cys Gly Gln Cys Glu Gly Ser Gly
 260 265 270

Ser Gly Gly Trp Cys Ala Tyr Ser Gln Lys Arg Glu Phe Leu Gly Cys
 275 280 285

Leu Cys Ser Gly Gly Lys Val Gly Asn Pro Phe Cys Lys Pro Ser Lys
 290 295 300

Ser Thr Arg Lys Pro Arg Ile Leu Ala Gly Ala Leu Gly Gly Gly Ala
 305 310 315 320

Ala Ala Leu Leu Val Gly Ala Ala Ile Phe Leu Phe Val Ile Met Arg
 325 330 335

Lys Arg Lys Gln Lys Lys Lys Val Thr Asn Ser Ser Ser Lys Leu Leu
 340 345 350

Lys Tyr Ser Gly Ser Gly Gly Thr Pro Arg Ser Arg Val Gly Asp Met
 355 360 365

Glu Ser Gly Ser Ile Glu Asp Pro Pro Thr His His Phe Ala Tyr Glu
 370 375 380

Glu Leu Glu Glu Ala Thr Asn Arg Phe Asp Glu Ser Arg Glu Leu Gly
 385 390 395 400

Asp Gly Gly Phe Gly Thr Val Tyr Lys Gly Tyr Leu Arg Asp Gly Arg
 405 410 415

Val Val Ala Val Lys Arg Leu Tyr Asn Asn Gly Tyr Arg Arg Val Glu
 420 425 430

Gln Phe Gln Asn Glu Ala Ala Ile Leu Ser Gly Leu Arg His Pro Asn
 435 440 445

Leu Val Met Phe Tyr Gly Cys Thr Ser Ser His Ser Arg Glu Leu Leu
 450 455 460

Leu Val Tyr Glu Phe Val Ala Asn Gly Thr Val Ala Asp His Leu His
 465 470 475 480

Gly Gln Arg Ala Pro Glu Arg Ala Leu Ser Trp Pro Leu Arg Leu Ser
 485 490 495

Val Ala Val Glu Ser Ala Ala Ala Leu Thr Tyr Leu His Ala Ile Glu
 500 505 510

Pro Pro Val Val His Arg Asp Val Lys Thr Thr Asn Ile Leu Leu Asp
 515 520 525

Ala Asp Tyr His Val Lys Val Ala Asp Phe Gly Leu Ser Arg Leu Phe
 530 535 540

Pro Leu Asp Val Thr His Val Ser Thr Ala Pro Gln Gly Thr Pro Gly
 545 550 555 560

Tyr Val Asp Pro Glu Tyr His Gln Cys Tyr Gln Leu Thr Asp Lys Ser
 565 570 575

Asp Val Tyr Ser Phe Gly Val Val Leu Val Glu Leu Ile Ser Ser Lys
 580 585 590

Pro Ala Val Asp Ile Thr Arg His Arg Ser Glu Ile Asn Leu Ala Ser
 595 600 605

Met Ala Ile Ser Lys Ile Gln Lys Cys Gln Leu Glu Glu Leu Val Asp
 610 615 620

Leu Gly Leu Gly Tyr Asp Thr Asp Pro Ala Thr Arg Lys Met Met Thr
 625 630 635 640

Met Val Ala Glu Leu Ala Phe Arg Cys Leu Gln Gln Asn Gly Glu Met
 645 650 655

Arg Pro Pro Ile Lys Glu Val Leu Glu Val Leu Arg Asn Ile Gln Gly
 660 665 670

Glu Cys Leu Thr Ser Gly Lys Asp Gly Asp Lys Ser Lys Asp Gly Pro
 675 680 685

Phe Ser Pro Thr Thr Val His Ala Pro Trp Asp Ser Arg Ser Thr Thr
 690 695 700

Pro Asn Thr Ser Arg Asp
 705 710

<210> 5

<211> 879

<212> ADN

<213> Zea mays

<400> 5

```

atggctcctc tgctcctgct cctgctcctc ttccccgtcc agttccagct cctgctcctc      60
ctagccgtag ccgacgctgt ccccggtctc tgcgccagag ccacatgcgc cggccatgtc      120
atccagtacc cgttctggct caactcctcg gcgcccgaact gcggccgccg ccacgggatc      180
ggccttgtct gcgagggcaa ctcgacgctg accctcccct acatgtccca cagatacgta      240
gtgtccagca tcgactacaa gacgcgtacc gtgctggtct cggacgccga catcggcgac      300
gagtacgacg cggccggctg cccgcgcgtc cgcgtgaacc tcaccatcga caccgcctgg      360
ctgcggccccg cggcctccga cgccaacatc accttcctct acgactgcaa gaagagcatc      420
accctgccct ccgccgtgga actgagtggg tgccattgcc accagcagca gcagcagcag      480
caacaggatt attgccgtag gtcgtacgtg ctgccggacg gcgggatcac gggcgccgag      540
gcgccaccagt acgggtgcga ggacgtggtg gtggcgccgg tgctggacgc gcacaggagg      600
gagatcctgg gcgcgcctcc ggcgaacgga tccctccgcc gggtgctgca gggcggggtc      660
gagctgaact acgacacca ctctgagctg tgcgaccggt gcgaggcctc cggcggggtg      720
tgcggttacc ggcgcggcga ggcgcccgcc accggcgccg gcggcggggt gacgttcgcc      780
tgcttctgcg acggcgggcc gacgacgacg ggcctgtgcg gtgccggtac gtacctcctc      840
ttcattcccc cagcgttaca atttattata tgtttgtaa      879

```

<210> 6

<211> 292

<212> PRT

<213> Zea mays

<400> 6

```

Met Ala Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Phe Pro Val Gln Phe Gln
1           5           10           15

```

```

Leu Leu Leu Leu Leu Ala Val Ala Asp Ala Val Pro Gly Leu Cys Ala
20           25           30

```

```

Arg Ala Thr Cys Ala Gly His Val Ile Gln Tyr Pro Phe Trp Leu Asn
35           40           45

```

Ser Ser Ala Pro Asp Cys Gly Arg Arg His Gly Ile Gly Leu Val Cys
 50 55 60

Glu Gly Asn Ser Thr Leu Thr Leu Pro Tyr Met Ser His Arg Tyr Val
 65 70 75 80

Val Ser Ser Ile Asp Tyr Lys Thr Arg Thr Val Leu Val Ser Asp Ala
 85 90 95

Asp Ile Gly Asp Glu Tyr Asp Ala Ala Gly Cys Pro Arg Val Arg Val
 100 105 110

Asn Leu Thr Ile Asp Thr Ala Trp Leu Arg Pro Ala Ala Ser Asp Ala
 115 120 125

Asn Ile Thr Phe Leu Tyr Asp Cys Lys Lys Ser Ile Thr Leu Pro Ser
 130 135 140

Ala Val Glu Leu Ser Gly Cys His Cys His Gln Gln Gln Gln Gln Gln
 145 150 155 160

Gln Gln Asp Tyr Cys Arg Arg Ser Tyr Val Leu Pro Asp Gly Gly Ile
 165 170 175

Thr Gly Ala Glu Ala His Gln Tyr Gly Cys Glu Asp Val Val Val Ala
 180 185 190

Pro Val Leu Asp Ala His Arg Arg Glu Ile Leu Gly Ala Pro Pro Ala
 195 200 205

Asn Gly Ser Leu Arg Arg Val Leu Gln Gly Gly Phe Glu Leu Asn Tyr
 210 215 220

Asp Thr His Ser Glu Leu Cys Asp Arg Cys Glu Ala Ser Gly Gly Trp
 225 230 235 240

Cys Gly Tyr Arg Arg Gly Glu Ala Pro Ala Thr Gly Ala Gly Gly Gly
 245 250 255

Leu Thr Phe Ala Cys Phe Cys Asp Gly Gly Pro Thr Thr Thr Gly Leu
 260 265 270

Cys Gly Ala Gly Thr Tyr Leu Leu Phe Ile Pro Pro Ala Leu Gln Phe
 275 280 285

Ile Ile Cys Leu
 290

<210> 7
 <211> 588
 <212> ADN
 <213> Zea mays

<400> 7
 atggggtgca cgacctccca cgacgccgtc gccgctgctg tcacctctc cagttcccgg 60
 ccccgctgcgc gccgctcgtc cgcgtccgac ccctcaccac ggcgcgagaga ccccgccgcg 120
 ctgtgcccgcg agcgcggtggc gctcatccac gccgcgaccg accgcccggta cgcgctcgcc 180
 accgcgcacg ctgcctaactt ccgctcgtc gccgccgtcg gtgacgcgct gcggcgcttc 240
 gtggcgctccg cgctcgcgcc cgccacgcct gggtcctcgc tggtgctcac gctcccgcct 300
 tcccccgcca agctggtcgc tgccgcgtcc gccagcctcc cgacgtggcc gttgtccacc 360
 gtctcgtcgc tctcgcactc cctcgcagag aagcggcgga tctttagggga ggcggcgttg 420
 aaggggaagcg cgcgagagag gacacagtca cggactcagg ccaccgttgc tcacagctgc 480
 attagaatcc gatttcgggt ccacgctcac acgtgtcaac gccggatacg ggatgctaac 540
 gtgaagtgcg gacgaggctt caaaaggggt gaggttttaa taacttag 588

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

<400> 8

Met Gly Cys Thr Thr Ser His Asp Ala Val Ala Ala Ala Val Thr Ser
 1 5 10 15

Ser Ser Ser Arg Pro Arg Ala Arg Arg Ser Ser Ala Ser Asp Pro Ser
 20 25 30

Pro Arg Arg Gly Asp Pro Ala Ala Leu Cys Arg Glu Arg Val Ala Leu
 35 40 45

Ile His Ala Ala Thr Asp Arg Arg Tyr Ala Leu Ala Thr Ala His Ala
 50 55 60

Ala Tyr Phe Arg Ser Leu Ala Ala Val Gly Asp Ala Leu Arg Arg Phe
 65 70 75 80

Val Ala Ser Ala Leu Ala Pro Ala Thr Pro Gly Ser Ser Leu Val Leu
 85 90 95

Thr Leu Pro Pro Ser Pro Ala Lys Leu Val Ala Ala Ala Ser Ala Ser
 100 105 110

Leu Pro Thr Trp Pro Leu Ser Thr Val Ser Ser Leu Ser His Ser Leu
 115 120 125

Ala Glu Lys Arg Arg Ile Phe Arg Glu Ala Ala Leu Lys Gly Ser Ala
 130 135 140

Arg Glu Arg Thr Gln Ser Arg Thr Gln Ala Thr Val Ala His Ser Cys
 145 150 155 160

Ile Arg Ile Arg Phe Arg Val His Ala His Thr Cys Gln Arg Arg Ile
 165 170 175

Arg Asp Ala Asn Val Lys Cys Gly Arg Gly Phe Lys Arg Gly Glu Val
 180 185 190

Leu Ile Thr
 195

<210> 9
 <211> 3699
 <212> ADN
 <213> Zea mays

<400> 9
 atggcgacgc cgacgcccat gcctggaggc gaggggacgc tcgcagcggg gatgccgcgg 60
 tccccgtctc cgacgccggc ggaggcgggg acctcggcga ccgagacgcc cgtgctgata 120
 ttcctttact ttcacaaggc gatccgcgcg gagctcgagg cgctgcacgg cgccgccgtg 180

ctcctggcca ccgagcgcac cggcgatgta gagatgctcg ccaagcgctg ccgcttcttc	240
ttcaacattt acaaacacca ctgcgacgcc gaggatgcgg tcatttttcc agcactcgat	300
atccgagtaa agaattgtgc agggacctat tccttagagc ataaaggaga aagcgatctt	360
tttagccagt tatttgatct cctgcaattg gacatacata atgatgatgg tcttcgtagg	420
gagcttgctg catgcacagg cgcgatacag acatgtctca gccaacatat gtccaaggag	480
gaagaacagg tctttccatt gcttaciaaag aaattttcgt gtgaagaaca agctgattta	540
gtgtggcaat tcctatgcaa cattcctgtc aatatggtgg cagagttcct tccatggctt	600
tcaacttctg tcacatctga tgagcaccaa gatatccgta actgcttatg caaagtagtt	660
cctgatgaga aacttctcca acaggttgta ttcacatgga tggaaggga agcaacaaga	720
gaagtggcag agagcattgc tgctggtatt tcagcaagaa atcatagtgt tgaggatgtc	780
ccagaccaag ggaagattca tatttgttta catcacaatt ctaaacttgg gagtaaaaac	840
tgtggagaat ctaatggtcc tcaggctgac aagcatccta tagatgatat ttatactgg	900
cacaatgcta ttcgtatgga gttacgtgat ataaaagagg agacaagaag ggtgcagcaa	960
tctggggatt tttctgatat atcagccttc aatgagaggc ttcagttcat tgcagatgta	1020
tgcactacc acagtatcgc tgaggatcag gttgtttttc ctgcagtcga tagtgagctg	1080
tcctttgtgc aggagcatgc tgaagaagaa tgcaggttta acaatttttag gtgtttaatt	1140
cagcaaatcc aaatagcagg agccgaatca actgcattgg acttctactc aaaactgtgt	1200
tcacatgctg ataaaatatt ggaggcaatc gaaaaacact tctgcaatga agaaaccaag	1260
gtgcttctc aagctaggat gctcttctct cttgagaagc aaagggaact ttcatacaaa	1320
agtttgtgtg ttatgccatt gaaattattg gaacgtgttt tgccgtggtt ggtgtcgaag	1380
ctgagtgatg ttcaggcaac ttcatttctt cagaatatac gcttggcagc atcaccatct	1440
gaaactgcac tggtcactct tatctctggt tgggcatgca aaggccggga taaatccaaa	1500
gatggagaat atttatgctt aacatcaggt gcggcgagat gtctatcaga tgatgtagat	1560
gatctgggaa aatgccgatc attctgtcca tgtgcttcac ccaacagctc agatctttct	1620
ctgcagctac atactgagaa tgattctagg ccaggcaagc gaggaaaaga tgcagtatct	1680
ttttctcata ctaatggaat ctactgctct caaactgctg acattgaagc aattccatgt	1740
agcaaaaaac catgttgtat tcctgggttg agagtagaga gtagcaatct tggatttggt	1800

tccttggctt ctgcaaagtc ttttactct ttatcataca attcaactgc tccttacta	1860
tattcgagcc tcttttcatg ggagacagat acatcattgt cttgttcgga cagcatttca	1920
aggccaatcg atacaatatt caaatttcat aaggcaattc gcaaggattt agaatactta	1980
gatgttgaat ctggcaagct cattgatggc aacgagtcct gccttcgcca attcattgga	2040
aggttccgtt tgttatgggg tctttacagg gctcacagca atgctgagga tgaaattgtg	2100
tttccagcat tggaatccag agaaacatta cacaatgtga gccattcata tactcttgac	2160
cacaagcagg aagaacagtt gtttgaagat atctcaaagc ttctctttca actttcacia	2220
ctacatgata gccagggcca tgcccagact gaagttaatg aagtaaagaa aagctgtttc	2280
cattcatcta atgatgtcga ttttgctaga aagtataatg aacttgccac aaaacttcag	2340
ggcatgtgca agtctatccg ggtcgccttg actaatcatg tccatagaga agaacttgaa	2400
ttatggccgt tgtttgataa acatttttct gtggaggagc aagataaact tgtaggtcgt	2460
ataattggtt caacaggtgc tgaggttctc caatctatgt taccctgggt tacatcagtt	2520
ctcactcaag aggagcagaa caaaatgctt gatatgtgga agcaagctac aaaaaataca	2580
atgtttgggg aatggctaaa cgagtgggtg aaggagctg gaacagcatc tgattcttca	2640
gcagaggcgt cctctgctcc agaagatagt catttacaag ataagcttga acaaaatgac	2700
cagatgttca agcctggctg gaaggacata tttcgaatga atcagagtga acttgaggct	2760
gaggtgcaaa aggtttcacg agattctaca cttgaccaa ggcggaaggc gtatctaatt	2820
caaaatctca tgacaagccg ctggatagct gcacagcaga agttaccaga accaaattct	2880
gaagaatgta atcacgatgc cagtatacct ggatgtgcac cttcataccg agaccaggag	2940
aaacaaattt atggttgtga aactacaaa cggaactgca aacttggtgc tgcattgtgc	3000
aacaagctct tcacatgcag gttctgccat gataaagtta gtgaccatac gatggaaagg	3060
aaagcaacac aggagatgat gtgcatggta tgcctaaaga ttcaacctgt tggttcgttc	3120
tgccaaaccc catcttgcaa cagactatcg atggcaaagt actactgtaa catctgtaaa	3180
ttttttgatg atgaaaggac tgtgtaccac tgtccgtttt gtaatttgtg tcgtcttggg	3240
aaaggtcttg gtgttgattt cttccattgc atgaaatgca actgctgcct tggaatgaaa	3300
ttaactgagc acaaatgtcg ggaaaaaggg ctagagacaa attgtccaat atgctgtgac	3360
ttcctattta catcaagtgc cgcagtcaga gccctccctt gtggccactt catgcattca	3420

gcttgctttc aggcatacac ttgtagtcac tacacttgcc ctatctgctg caaatccttg 3480
 ggagatatgg cggtttatatt tggcatgctt gatgccttgt tggcggctga agagcttccg 3540
 gaggaatacc gtgatcgggtg tcaggatata ctttgcaatg actgtgagag gaaaggtaga 3600
 tgtcgatttc attgggtata ccacaaatgc ggctcctgtg ggctgtacaa cacccgagtt 3660
 atcaagactg ccacagcaga ttgctctaca ccaaactag 3699

<210> 10
 <211> 1232
 <212> PRT
 <213> Zea mays

<400> 10

Met Ala Thr Pro Thr Pro Met Pro Gly Gly Glu Gly Thr Leu Ala Ala
 1 5 10 15

Val Met Pro Arg Ser Pro Ser Pro Thr Pro Ala Glu Ala Gly Thr Ser
 20 25 30

Ala Thr Glu Thr Pro Val Leu Ile Phe Leu Tyr Phe His Lys Ala Ile
 35 40 45

Arg Ala Glu Leu Glu Ala Leu His Gly Ala Ala Val Leu Leu Ala Thr
 50 55 60

Glu Arg Thr Gly Asp Val Glu Met Leu Ala Lys Arg Cys Arg Phe Phe
 65 70 75 80

Phe Asn Ile Tyr Lys His His Cys Asp Ala Glu Asp Ala Val Ile Phe
 85 90 95

Pro Ala Leu Asp Ile Arg Val Lys Asn Val Ala Gly Thr Tyr Ser Leu
 100 105 110

Glu His Lys Gly Glu Ser Asp Leu Phe Ser Gln Leu Phe Asp Leu Leu
 115 120 125

Gln Leu Asp Ile His Asn Asp Asp Gly Leu Arg Arg Glu Leu Ala Ser
 130 135 140

Cys Thr Gly Ala Ile Gln Thr Cys Leu Ser Gln His Met Ser Lys Glu
145 150 155 160

Glu Glu Gln Val Phe Pro Leu Leu Thr Lys Lys Phe Ser Cys Glu Glu
165 170 175

Gln Ala Asp Leu Val Trp Gln Phe Leu Cys Asn Ile Pro Val Asn Met
180 185 190

Val Ala Glu Phe Leu Pro Trp Leu Ser Thr Ser Val Thr Ser Asp Glu
195 200 205

His Gln Asp Ile Arg Asn Cys Leu Cys Lys Val Val Pro Asp Glu Lys
210 215 220

Leu Leu Gln Gln Val Val Phe Thr Trp Met Glu Gly Lys Ala Thr Arg
225 230 235 240

Glu Val Ala Glu Ser Ile Ala Ala Gly Ile Ser Ala Arg Asn His Ser
245 250 255

Val Glu Asp Val Pro Asp Gln Gly Lys Ile His Ile Cys Leu His His
260 265 270

Asn Ser Lys Leu Gly Ser Lys Asn Cys Gly Glu Ser Asn Gly Pro Gln
275 280 285

Ala Asp Lys His Pro Ile Asp Asp Ile Leu Tyr Trp His Asn Ala Ile
290 295 300

Arg Met Glu Leu Arg Asp Ile Lys Glu Glu Thr Arg Arg Val Gln Gln
305 310 315 320

Ser Gly Asp Phe Ser Asp Ile Ser Ala Phe Asn Glu Arg Leu Gln Phe
325 330 335

Ile Ala Asp Val Cys Ile Tyr His Ser Ile Ala Glu Asp Gln Val Val
340 345 350

Phe Pro Ala Val Asp Ser Glu Leu Ser Phe Val Gln Glu His Ala Glu
355 360 365

Glu Glu Cys Arg Phe Asn Asn Phe Arg Cys Leu Ile Gln Gln Ile Gln
 370 375 380

Ile Ala Gly Ala Glu Ser Thr Ala Leu Asp Phe Tyr Ser Lys Leu Cys
 385 390 395 400

Ser His Ala Asp Lys Ile Leu Glu Ala Ile Glu Lys His Phe Cys Asn
 405 410 415

Glu Glu Thr Lys Val Leu Pro Gln Ala Arg Met Leu Phe Ser Leu Glu
 420 425 430

Lys Gln Arg Glu Leu Ser Tyr Lys Ser Leu Cys Val Met Pro Leu Lys
 435 440 445

Leu Leu Glu Arg Val Leu Pro Trp Leu Val Ser Lys Leu Ser Asp Val
 450 455 460

Gln Ala Thr Ser Phe Leu Gln Asn Ile Arg Leu Ala Ala Ser Pro Ser
 465 470 475 480

Glu Thr Ala Leu Val Thr Leu Ile Ser Gly Trp Ala Cys Lys Gly Arg
 485 490 495

Asp Lys Ser Lys Asp Gly Glu Tyr Leu Cys Leu Thr Ser Gly Ala Ala
 500 505 510

Arg Cys Leu Ser Asp Asp Val Asp Asp Leu Gly Lys Cys Arg Ser Phe
 515 520 525

Cys Pro Cys Ala Ser Pro Asn Ser Ser Asp Leu Ser Leu Gln Leu His
 530 535 540

Thr Glu Asn Asp Ser Arg Pro Gly Lys Arg Gly Lys Asp Ala Val Ser
 545 550 555 560

Phe Ser His Thr Asn Gly Ile Tyr Cys Ser Gln Thr Ala Asp Ile Glu
 565 570 575

Ala Ile Pro Cys Ser Lys Lys Pro Cys Cys Ile Pro Gly Leu Arg Val
 580 585 590

Glu Ser Ser Asn Leu Gly Ile Gly Ser Leu Ala Ser Ala Lys Ser Phe
 595 600 605

His Ser Leu Ser Tyr Asn Ser Thr Ala Pro Ser Leu Tyr Ser Ser Leu
 610 615 620

Phe Ser Trp Glu Thr Asp Thr Ser Leu Ser Cys Ser Asp Ser Ile Ser
 625 630 635 640

Arg Pro Ile Asp Thr Ile Phe Lys Phe His Lys Ala Ile Arg Lys Asp
 645 650 655

Leu Glu Tyr Leu Asp Val Glu Ser Gly Lys Leu Ile Asp Gly Asn Glu
 660 665 670

Ser Cys Leu Arg Gln Phe Ile Gly Arg Phe Arg Leu Leu Trp Gly Leu
 675 680 685

Tyr Arg Ala His Ser Asn Ala Glu Asp Glu Ile Val Phe Pro Ala Leu
 690 695 700

Glu Ser Arg Glu Thr Leu His Asn Val Ser His Ser Tyr Thr Leu Asp
 705 710 715 720

His Lys Gln Glu Glu Gln Leu Phe Glu Asp Ile Ser Asn Val Leu Phe
 725 730 735

Gln Leu Ser Gln Leu His Asp Ser Gln Gly His Ala Gln Thr Glu Val
 740 745 750

Asn Glu Val Lys Lys Ser Cys Phe His Ser Ser Asn Asp Val Asp Phe
 755 760 765

Ala Arg Lys Tyr Asn Glu Leu Ala Thr Lys Leu Gln Gly Met Cys Lys
 770 775 780

Ser Ile Arg Val Ala Leu Thr Asn His Val His Arg Glu Glu Leu Glu
 785 790 795 800

Leu Trp Pro Leu Phe Asp Lys His Phe Ser Val Glu Glu Gln Asp Lys
 805 810 815

Leu Val Gly Arg Ile Ile Gly Ser Thr Gly Ala Glu Val Leu Gln Ser
 820 825 830

Met Leu Pro Trp Val Thr Ser Val Leu Thr Gln Glu Glu Gln Asn Lys
 835 840 845

Met Leu Asp Met Trp Lys Gln Ala Thr Lys Asn Thr Met Phe Gly Glu
 850 855 860

Trp Leu Asn Glu Trp Trp Lys Gly Ala Gly Thr Ala Ser Asp Ser Ser
 865 870 875 880

Ala Glu Ala Ser Ser Ala Pro Glu Asp Ser His Leu Gln Asp Lys Leu
 885 890 895

Glu Gln Asn Asp Gln Met Phe Lys Pro Gly Trp Lys Asp Ile Phe Arg
 900 905 910

Met Asn Gln Ser Glu Leu Glu Ala Glu Val Arg Lys Val Ser Arg Asp
 915 920 925

Ser Thr Leu Asp Pro Arg Arg Lys Ala Tyr Leu Ile Gln Asn Leu Met
 930 935 940

Thr Ser Arg Trp Ile Ala Ala Gln Gln Lys Leu Pro Glu Pro Asn Ser
 945 950 955 960

Glu Glu Cys Asn His Asp Ala Ser Ile Pro Gly Cys Ala Pro Ser Tyr
 965 970 975

Arg Asp Gln Glu Lys Gln Ile Tyr Gly Cys Glu His Tyr Lys Arg Asn
 980 985 990

Cys Lys Leu Val Ala Ala Cys Cys Asn Lys Leu Phe Thr Cys Arg Phe
 995 1000 1005

Cys	His	Asp	Lys	Val	Ser	Asp	His	Thr	Met	Glu	Arg	Lys	Ala	Thr
1010						1015					1020			
Gln	Glu	Met	Met	Cys	Met	Val	Cys	Leu	Lys	Ile	Gln	Pro	Val	Gly
1025						1030					1035			
Ser	Phe	Cys	Gln	Thr	Pro	Ser	Cys	Asn	Arg	Leu	Ser	Met	Ala	Lys
1040						1045					1050			
Tyr	Tyr	Cys	Asn	Ile	Cys	Lys	Phe	Phe	Asp	Asp	Glu	Arg	Thr	Val
1055						1060					1065			
Tyr	His	Cys	Pro	Phe	Cys	Asn	Leu	Cys	Arg	Leu	Gly	Lys	Gly	Leu
1070						1075					1080			
Gly	Val	Asp	Phe	Phe	His	Cys	Met	Lys	Cys	Asn	Cys	Cys	Leu	Gly
1085						1090					1095			
Met	Lys	Leu	Thr	Glu	His	Lys	Cys	Arg	Glu	Lys	Gly	Leu	Glu	Thr
1100						1105					1110			
Asn	Cys	Pro	Ile	Cys	Cys	Asp	Phe	Leu	Phe	Thr	Ser	Ser	Ala	Ala
1115						1120					1125			
Val	Arg	Ala	Leu	Pro	Cys	Gly	His	Phe	Met	His	Ser	Ala	Cys	Phe
1130						1135					1140			
Gln	Ala	Tyr	Thr	Cys	Ser	His	Tyr	Thr	Cys	Pro	Ile	Cys	Cys	Lys
1145						1150					1155			
Ser	Leu	Gly	Asp	Met	Ala	Val	Tyr	Phe	Gly	Met	Leu	Asp	Ala	Leu
1160						1165					1170			
Leu	Ala	Ala	Glu	Glu	Leu	Pro	Glu	Glu	Tyr	Arg	Asp	Arg	Cys	Gln
1175						1180					1185			
Asp	Ile	Leu	Cys	Asn	Asp	Cys	Glu	Arg	Lys	Gly	Arg	Cys	Arg	Phe
1190						1195					1200			
His	Trp	Leu	Tyr	His	Lys	Cys	Gly	Ser	Cys	Gly	Ser	Tyr	Asn	Thr
1205						1210					1215			

Arg Val Ile Lys Thr Ala Thr Ala Asp Cys Ser Thr Pro Asn
 1220 1225 1230

<210> 11
 <211> 1152
 <212> ADN
 <213> Zea mays

<400> 11
 atggagagct ggtccgcgc ggtggtggag gccatccact cctctcgctc ccagacagtc 60
 atctacctcg ccggcggtgc atcccaggcg ctcggttggc tcctctccgt gcccggcgct 120
 tcgggcaccg tcctcgaggt cgtcgtgccc tactctaggg cctccatggc gcagctcctt 180
 ggcaagatgc cctgcaatt cactagcaag caggctgcag aggacatggc actggccgca 240
 tacaatcgag cactcaagct ttctggacca ggtctgcaag ttatgggtgt tggatttact 300
 gggtcactgg cgagctcacg tccaaaacat ggtgaccaca ggttttatgt gtcaacatgg 360
 acacataatt gtctcaggac atcacatgtt accttgtcga agggtttacg gagtagggag 420
 gaagaagaca aggtttcaag ctactttttg cttaaggcaa tagcagatac ctgcagagtt 480
 tctgcaacca ttcagccaga cattcacaaa tctgaaattc cagaagaaat catggaacaa 540
 tttgatgaag atcaagaact ccagcaagtt attaatgggc aagtttgcac gaaagtatat 600
 aattttgctg ctccggcgga aagtaacttg aacagaaaaa taattctgcc tggttcgttc 660
 aacccttgc acgatgggtca ccttagattg ctagaagctg cagtaagcat gtgtgatgat 720
 gggcttccat tctttgagat atcagcaatt aatgctgata aacctccact atctattgca 780
 gaaattaaga ggcgtgttga gcaatttaga aaagcaggga agaattgtgat tatatctaac 840
 cagccatact tctataagaa agcagaactt ttcccaggaa gcgcttttat aattggtgca 900
 gacactgcag caaggcttgt taaccctaag tactatggag gagattacaa cagaatgctg 960
 gagatacttc tcgaatgtaa gagcataggg actacttttc ttgttggtgg tcgaaagatt 1020
 gaaggagatt tcaaggtcct tgagaactta gacattccag aagagctgag agaaatgttc 1080
 atttctattc cggaggaaaa gtttcgcata gatatttcat ctactgaaat aagaaagagc 1140
 caagggtctt ga 1152

<210> 12

<211> 383
 <212> PRT
 <213> Zea mays

<400> 12

Met Glu Ser Trp Val Arg Ala Val Val Glu Ala Ile His Ser Ser Arg
 1 5 10 15

Ser Gln Thr Val Ile Tyr Leu Ala Gly Gly Ala Ser Gln Ala Leu Gly
 20 25 30

Trp Leu Leu Ser Val Pro Gly Ala Ser Gly Thr Val Leu Glu Val Val
 35 40 45

Val Pro Tyr Ser Arg Ala Ser Met Ala Gln Leu Leu Gly Lys Met Pro
 50 55 60

Leu Gln Phe Thr Ser Lys Gln Ala Ala Glu Asp Met Ala Leu Ala Ala
 65 70 75 80

Tyr Asn Arg Ala Leu Lys Leu Ser Gly Pro Gly Leu Gln Val Met Gly
 85 90 95

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

His Arg Phe Tyr Val Ser Thr Trp Thr His Asn Cys Leu Arg Thr Ser
 115 120 125

His Val Thr Leu Ser Lys Gly Leu Arg Ser Arg Glu Glu Glu Asp Lys
 130 135 140

Val Ser Ser Tyr Phe Leu Leu Lys Ala Ile Ala Asp Thr Cys Arg Val
 145 150 155 160

Ser Ala Thr Ile Gln Pro Asp Ile His Lys Ser Glu Ile Pro Glu Glu
 165 170 175

Ile Met Glu Gln Phe Asp Glu Asp Gln Glu Leu Gln Gln Val Ile Asn
 180 185 190

Gly Gln Val Cys Met Lys Val Tyr Asn Phe Ala Ala Pro Ala Glu Ser
 195 200 205

Asn Leu Asn Arg Lys Ile Ile Leu Pro Gly Ser Phe Asn Pro Leu His
 210 215 220

Asp Gly His Leu Arg Leu Leu Glu Ala Ala Val Ser Met Cys Asp Asp
 225 230 235 240

Gly Leu Pro Phe Phe Glu Ile Ser Ala Ile Asn Ala Asp Lys Pro Pro
 245 250 255

Leu Ser Ile Ala Glu Ile Lys Arg Arg Val Glu Gln Phe Arg Lys Ala
 260 265 270

Gly Lys Asn Val Ile Ile Ser Asn Gln Pro Tyr Phe Tyr Lys Lys Ala
 275 280 285

Glu Leu Phe Pro Gly Ser Ala Phe Ile Ile Gly Ala Asp Thr Ala Ala
 290 295 300

Arg Leu Val Asn Pro Lys Tyr Tyr Gly Gly Asp Tyr Asn Arg Met Leu
 305 310 315 320

Glu Ile Leu Leu Glu Cys Lys Ser Ile Gly Thr Thr Phe Leu Val Gly
 325 330 335

Gly Arg Lys Ile Glu Gly Asp Phe Lys Val Leu Glu Asn Leu Asp Ile
 340 345 350

Pro Glu Glu Leu Arg Glu Met Phe Ile Ser Ile Pro Glu Glu Lys Phe
 355 360 365

Arg Ile Asp Ile Ser Ser Thr Glu Ile Arg Lys Ser Gln Gly Leu
 370 375 380

<210> 13
 <211> 666
 <212> ADN
 <213> Zea mays

<400> 13

```

atgcacccta attttccaag cgatcatggc aacggacgag ggggtgggcgg cggcggcggc      60
catagcaggc gcaagccgat tcatcagctt ctcggtggag ggcgagccgc ggacatcttg      120
ctgtggaagg acaggaatth gtctgcaggc ctgctcgctg gggccacgct ggtatggtac      180
ctgttcgagg ttgttgagta cagcattgta ccgctcgtht gccagatagc catcctggcc      240
atgctcgctg tcttcatctg gtcgaatgct gcgcccctct tgaacatagc ccttccaagg      300
atcccagaag tgatcatctc tgagcatgcc ttccgacaaa tagcacagat cgtccattac      360
aaactggcac acaccgtgtc tgctctttat gacattgcat gcgggaagga tctgaagaaa      420
ttcctcctgg tggctcttct actgctaata gtgtcagagg ttggaagttc ttacagcttc      480
acaagtcttc tatactcttg atttctttgc gccacactt tgccagcgtt gtaccaaaga      540
tatgagacag aggttgacca ccttgccgca aggggtagtg aagacatcaa gaggttctac      600
aagaggattg attccaatth gctgaacaaa ataccaaggg gccagtcaa gacaaaagtt      660
aaataa                                         666

```

<210> 14
 <211> 221
 <212> PRT
 <213> Zea mays

<400> 14

```

Met His Pro Asn Phe Pro Ser Asp His Gly Asn Gly Arg Gly Val Gly
1           5           10           15

```

```

Gly Gly Gly Gly His Ser Arg Arg Lys Pro Ile His Gln Leu Leu Gly
          20           25           30

```

```

Gly Gly Arg Ala Ala Asp Ile Leu Leu Trp Lys Asp Arg Asn Leu Ser
          35           40           45

```

```

Ala Gly Leu Leu Ala Gly Ala Thr Leu Val Trp Tyr Leu Phe Glu Val
50           55           60

```

```

Val Glu Tyr Ser Ile Val Pro Leu Val Cys Gln Ile Ala Ile Leu Ala
65           70           75           80

```

```

Met Leu Val Val Phe Ile Trp Ser Asn Ala Ala Pro Leu Leu Asn Ile
          85           90           95

```

Ala Pro Pro Arg Ile Pro Glu Val Ile Ile Ser Glu His Ala Phe Arg
 100 105 110

Gln Ile Ala Gln Ile Val His Tyr Lys Leu Ala His Thr Val Ser Ala
 115 120 125

Leu Tyr Asp Ile Ala Cys Gly Lys Asp Leu Lys Lys Phe Leu Leu Val
 130 135 140

Val Leu Ser Leu Leu Ile Val Ser Glu Val Gly Ser Ser Tyr Ser Phe
 145 150 155 160

Thr Ser Leu Leu Tyr Leu Gly Phe Leu Cys Ala His Thr Leu Pro Ala
 165 170 175

Leu Tyr Gln Arg Tyr Glu Thr Glu Val Asp His Leu Ala Ala Arg Gly
 180 185 190

Ser Glu Asp Ile Lys Arg Phe Tyr Lys Arg Ile Asp Ser Asn Leu Leu
 195 200 205

Asn Lys Ile Pro Arg Gly Pro Val Lys Thr Lys Val Lys
 210 215 220

<210> 15
 <211> 1113
 <212> ADN
 <213> Zea mays

<400> 15
 atgggcgggcg tcacgtccac catcgccgcg cgcttcgcct tcttcccgcc gacgccgccg 60
 tcctacaccg tcgtcgtcgc cgacgccgcc accggtcgcc tcgccatccc ggagatctcc 120
 cgggcaccct cgcgccgtcg gaggcgggac ggcgccggcg ccgggggctc ctctcggcc 180
 tcctccgtcg tcgcggccgc cgaggaggag gacggcgcgg aggtggtgcg cctccggacc 240
 cgccgcggga acgagatcgt ggggggtctac gtgcgccacg cgcgggcctc cgccaccgtg 300
 ctctactccc acggcaacgc cgccgacctc ggccagatgt acgggctctt cgtcgagctc 360
 agccgccgcc tccgcgtcaa cctctttggg tatgattatt ctggttatgg gagatctaca 420

```

gggaagccca ctgagtgtaa tacatatgca gacattgaag cagcatataa ctgcctcaag      480
gaaaaatatg gtgtagcaga tgaggatata atcttatatg gtcagtctgt tggaagtgg      540
ccaaccattg atcttgcttc gcggttgcca gacttgcgag ctgtgggttt gcatagtcct      600
attttatctg gactaagagt aatatatcca gtcaagcgga cgttttgggt tgacatttac      660
aagaacatcg ataaaattgg cttggtaa at tgtccgggtgc ttgtcattca tggtagatca      720
gatgacgtgg ttgactgctc ccacggaaaa cagctatggg agcactgcaa agtaaaatat      780
tctccactgt ggttaagtgg tggtagccac tgcaatctcg agctatatcc agattacatt      840
aagcacttga aaaagtttgt gtcaagcggt agcaaaaaag catcatcgaa acctgaccca      900
aaagaaacaa cgacaaagga tgacactacc agtaaagaaa cagaggaagc gtacccggag      960
aaacctcaag aggccaagaa gtgcccgcag atctcgcgaa agagcctgga cagccgattc     1020
gggaaatcca aaacagtgga tgttcctgat aaaccacgga tgagctcgga cgacatcgac     1080
aagttccgga ggagcagatg cttggtctgg tga                                  1113

```

```

<210> 16
<211> 370
<212> PRT
<213> Zea mays

```

```

<400> 16

```

```

Met Gly Gly Val Thr Ser Thr Ile Ala Ala Arg Phe Ala Phe Phe Pro
1              5              10              15

```

```

Pro Thr Pro Pro Ser Tyr Thr Val Val Val Ala Asp Ala Ala Thr Gly
20              25              30

```

```

Arg Leu Ala Ile Pro Glu Ile Ser Arg Ala Pro Ser Arg Arg Arg Arg
35              40              45

```

```

Arg Asp Gly Ala Gly Ala Gly Gly Ser Ser Ser Ala Ser Ser Val Val
50              55              60

```

```

Ala Ala Ala Glu Glu Glu Asp Gly Ala Glu Val Val Arg Leu Arg Thr
65              70              75              80

```

```

Arg Arg Gly Asn Glu Ile Val Gly Val Tyr Val Arg His Ala Arg Ala
85              90              95

```

Ser Ala Thr Val Leu Tyr Ser His Gly Asn Ala Ala Asp Leu Gly Gln
 100 105 110

Met Tyr Gly Leu Phe Val Glu Leu Ser Arg Arg Leu Arg Val Asn Leu
 115 120 125

Phe Gly Tyr Asp Tyr Ser Gly Tyr Gly Arg Ser Thr Gly Lys Pro Thr
 130 135 140

Glu Cys Asn Thr Tyr Ala Asp Ile Glu Ala Ala Tyr Asn Cys Leu Lys
 145 150 155 160

Glu Lys Tyr Gly Val Ala Asp Glu Asp Ile Ile Leu Tyr Gly Gln Ser
 165 170 175

Val Gly Ser Gly Pro Thr Ile Asp Leu Ala Ser Arg Leu Pro Asp Leu
 180 185 190

Arg Ala Val Val Leu His Ser Pro Ile Leu Ser Gly Leu Arg Val Ile
 195 200 205

Tyr Pro Val Lys Arg Thr Phe Trp Phe Asp Ile Tyr Lys Asn Ile Asp
 210 215 220

Lys Ile Gly Leu Val Asn Cys Pro Val Leu Val Ile His Gly Thr Ser
 225 230 235 240

Asp Asp Val Val Asp Cys Ser His Gly Lys Gln Leu Trp Glu His Cys
 245 250 255

Lys Val Lys Tyr Ser Pro Leu Trp Leu Ser Gly Gly Gly His Cys Asn
 260 265 270

Leu Glu Leu Tyr Pro Asp Tyr Ile Lys His Leu Lys Lys Phe Val Ser
 275 280 285

Ser Val Ser Lys Lys Ala Ser Ser Lys Pro Asp Pro Lys Glu Thr Thr
 290 295 300

Thr Lys Asp Asp Thr Thr Ser Lys Glu Thr Glu Glu Ala Tyr Pro Glu
305 310 315 320

Lys Pro Gln Glu Ala Lys Lys Cys Pro Gln Ile Ser Arg Lys Ser Leu
325 330 335

Asp Ser Arg Phe Gly Lys Ser Lys Thr Val Asp Val Pro Asp Lys Pro
340 345 350

Arg Met Ser Ser Asp Asp Ile Asp Lys Phe Arg Arg Ser Arg Cys Leu
355 360 365

Val Trp
370

<210> 17
<211> 47
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> SYN14136 Alen của đoạn mỗi X

<400> 17
gaaggtgacc aagttcatgc tcattctgtt cggccttttc tacacta

47

<210> 18
<211> 46
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> SYN14136 Alen của đoạn mỗi Y

<400> 18
gaaggtcgga gtcaacggat tatcttggtc ggccttttct acactc

46

<210> 19
<211> 28
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> SYN14136 đoạn mỗi gemeinsamer

<400> 19
agaaccaaaa attcaccagc tgtgagaa

28

<210> 20
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> PZE-108076510 Alen của đoạn mỗi X

<400> 20
 gaaggtgacc aagttcatgc tagcggcgagg ctttcataca attt

44

<210> 21
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> PZE-108076510 Alen của đoạn mỗi Y

<400> 21
 gaaggtcgga gtcaacggat tgcggcgagg tttcatacaa ttc

43

<210> 22
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> PZE-108076510 đoạn mỗi gemeinsamer

<400> 22
 cttgtgatca cgtgaggggc tcaa

24

<210> 23
 <211> 49
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> SYN24931 Alen của đoạn mỗi X

<400> 23
 gaaggtgacc aagttcatgc tccattagat gagaaagcaa agagaacta

49

<210> 24
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> SYN24931 Alen của đoạn mỗi Y

 <400> 24
 gaaggtcgga gtcaacggat tcattagatg agaaagcaaa gagaactg 48

 <210> 25
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> SYN24931 đoạn mỗi gemeinsamer

 <400> 25
 attggtcgac atctcatgga ggctt 25

 <210> 26
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> PZE-108077560 Alen của đoạn mỗi X

 <400> 26
 gaaggtgacc aagttcatgc tgcagtggcc tgcgca 36

 <210> 27
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> PZE-108077560 Alen của đoạn mỗi Y

 <400> 27
 gaaggtcgga gtcaacggat tgctgcagtg gcctgcgcg 39

 <210> 28
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> PZE-108077560 đoạn mỗi gemeinsamer

 <400> 28
 agataatgag tcatcaggct atcagcaa 28

<210> 29
 <211> 49
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> PZE-108093423 Alen của đoạn mỗi X

<400> 29
 gaaggtgacc aagttcatgc tgtaatccat tgtgaacata tcgctatca

49

<210> 30
 <211> 47
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> PZE-108093423 Alen của đoạn mỗi Y

<400> 30
 gaaggtcgga gtcaacggat taatccattg tgaacatatc gctatcg

47

<210> 31
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> PZE-108093423 đoạn mỗi gemeinsamer

<400> 31
 gaaacggttc tgctgcagtt tggta

25

<210> 32
 <211> 47
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> PZE-108093748 Alen của đoạn mỗi X

<400> 32
 gaaggtgacc aagttcatgc tggatagagt tgcagctaata gcttcaa

47

<210> 33
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> PZE-108093748 Alen của đoạn mỗi Y

 <400> 33
 gaaggtcgga gtcaacggat tgatagagtt gcagctaattg cttcag 46

 <210> 34
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> PZE-108093748 đoạn mỗi gemeinsamer

 <400> 34
 cctgcgcgttt gtaaataagt taggcaaa 28

 <210> 35
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> PZE-108107671 Alen của đoạn mỗi X

 <400> 35
 gaaggtgacc aagttcatgc ttgcacctgc acacgccg 38

 <210> 36
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> PZE-108107671 Alen của đoạn mỗi Y

 <400> 36
 gaaggtcgga gtcaacggat tcttgacact gcacacgccc 40

 <210> 37
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> PZE-108107671 đoạn mỗi gemeinsamer

 <400> 37
 gatgccaaagg atcgggcgct t 21

<210> 38
 <211> 47
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> SYN4196 Alen của đoạn mỗi X

 <400> 38
 gaaggtgacc aagttcatgc tctgcactct ggaatatcta taacaga 47

 <210> 39
 <211> 47
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> SYN4196 Alen của đoạn mỗi Y

 <400> 39
 gaaggtcgga gtcaacggat tctgcactct ggaatatcta taacagc 47

 <210> 40
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> SYN4196 đoạn mỗi gemeinsamer

 <400> 40
 tggtttatac caggaaggga cgcac 25

 <210> 41
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> MA0004 Alen của đoạn mỗi X

 <400> 41
 gaaggtgacc aagttcatgc tgcctcgccc gcacttcacg t 41

 <210> 42
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> MA0004 Alen của đoạn mỗi Y

<400> 42

gaaggtcgga gtcaacggat tcctcgccg cacttcacgg

40

<210> 43

<211> 22

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> MA0004 đoạn mỗi gemeinsamer

<400> 43

gtgtcaacgc cggatacggg at

22

<210> 44

<211> 52

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> MA0005 Alen của đoạn mỗi X

<400> 44

gaaggtgacc aagttcatgc tccaaaattt tagaatcaca aacagattta cg

52

<210> 45

<211> 52

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> MA0005 Alen của đoạn mỗi Y

<400> 45

gaaggtcgga gtcaacggat tccaaaattt tagaatcaca aacagattta ct

52

<210> 46

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> MA0005 đoạn mỗi gemeinsamer

<400> 46

aaacgccagt atcaaggagt tattagatt

30

<210> 47
 <211> 49
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> MA0006 Alen của đoạn mỗi X

<400> 47
 gaaggtgacc aagttcatgc tgcacacaaa cacaaattat gtcaaactg

49

<210> 48
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> MA0006 Alen của đoạn mỗi Y

<400> 48
 gaaggtcgga gtcaacggat tagcacacaa acacaaatta tgtcaaacta

50

<210> 49
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> MA0006 đoạn mỗi gemeinsamer

<400> 49
 ggctgtctta cgatatacca gttttctta

29

<210> 50
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> PZE-108097482 Alen của đoạn mỗi X

<400> 50
 gaaggtgacc aagttcatgc tagtcgggga tgcatgccat tga

43

<210> 51
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> PZE-108097482 Alen của đoạn mỗi Y

<400> 51

gaaggtcgga gtcaacggat tgtcggggat gcatgccatt gc

42

<210> 52

<211> 25

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> PZE-108097482 đoạn mỗi gemeinsamer

<400> 52

gactccagag agagacagaa aggaa

25

<210> 53

<211> 41

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> MA0002 Alen của đoạn mỗi X

<400> 53

gaaggtgacc aagttcatgc tgctcgtcc gcacttcacg t

41

<210> 54

<211> 40

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> MA0002 Alen của đoạn mỗi Y

<400> 54

gaaggtcgga gtcaacggat tcctcgtccg cacttcacgg

40

<210> 55

<211> 22

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> MA0002 đoạn mỗi gemeinsamer

<400> 55

gtgtcaacgc cggatacggg at

22

<210> 56
<211> 41
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> MA0003 Alen của đoạn mỗi X

<400> 56
gaaggtgacc aagttcatgc tccgtgatgc gccttgccgt a 41

<210> 57
<211> 40
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> MA0003 Alen của đoạn mỗi Y

<400> 57
gaaggtcgga gtcaacggat tcgtgatgcg ccttgccgtc 40

<210> 58
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> MA0003 đoạn mỗi gemeinsamer

<400> 58
gcacatcaat cgactcagcc ctat 24

<210> 59
<211> 48
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> MA0007 Alen của đoạn mỗi X

<400> 59
gaaggtgacc aagttcatgc tgaaattatt ctcagcgagc atataacc 48

<210> 60
<211> 49
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> MA0007 Alen của đoạn mỗi Y

<400> 60

gaaggtcgga gtcaacggat tggaaattat tctcagcgag catataact

49

<210> 61

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> MA0007 đoạn mỗi gemeinsamer

<400> 61

cgaacaggca grcccatatg cttt

24

<210> 62

<211> 48

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> MA0008 Alen của đoạn mỗi X

<400> 62

gaaggtgacc aagttcatgc tggtaaaatg aagtaaaagc atatgggc

48

<210> 63

<211> 50

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> MA0008 Alen của đoạn mỗi Y

<400> 63

gaaggtcgga gtcaacggat tgaggtaaaa tgaagtaaaa gcatatgggt

50

<210> 64

<211> 25

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> MA0008 đoạn mỗi gemeinsamer

<400> 64

tagacggagg gtgtacttat gcgaa

25

<210> 65
<211> 51
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> MA0009 Alen của đoạn mỗi X

<400> 65
gaaggtgacc aagttcatgc tgtaacaaat ttgtgcttta tgtttctggt t

51

<210> 66
<211> 49
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> MA0009 Alen của đoạn mỗi Y

<400> 66
gaaggtcgga gtcaacggat taacaaattt gtgctttatg tttctggtg

49

<210> 67
<211> 29
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> MA0009 đoạn mỗi gemeinsamer

<400> 67
gatttsagca agattaagct gattcacgt

29

<210> 68
<211> 47
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> MA0010 Alen của đoạn mỗi X

<400> 68
gaaggtgacc aagttcatgc tgttggtgtaag agcctatagt caataca

47

<210> 69
<211> 47
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> MA0010 Alen của đoạn mỗi Y

<400> 69

gaaggtcgga gtcaacggat tggtggtaag agcctatagt caatacc

47

<210> 70

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> MA0010 đoạn mỗi gemeinsamer

<400> 70

aattcatcay atgcttttct tctgctcttt

30

<210> 71

<211> 44

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> MA0011 Alen của đoạn mỗi X

<400> 71

gaaggtgacc aagttcatgc tccttcctac agaagaacga gagc

44

<210> 72

<211> 44

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> MA0011 Alen của đoạn mỗi Y

<400> 72

gaaggtcgga gtcaacggat tccttcctac agaagaacga gagt

44

<210> 73

<211> 25

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> MA0011 đoạn mỗi gemeinsamer

<400> 73

ttcacgtccg cgtaggtgta tctttt

25

<210> 74
 <211> 47
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> MA0012 Alen của đoạn mỗi X

<400> 74
 gaaggtgacc aagttcatgc tatagacatc agacttgctg cttattg

47

<210> 75
 <211> 49
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> MA0012 Alen của đoạn mỗi Y

<400> 75
 gaaggtcgga gtcaacggat tctatagaca tcagacttgc tgcttatta

49

<210> 76
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> MA0012 đoạn mỗi gemeinsamer

<400> 76
 cccggaggtc tactcaaagc aattt

25

<210> 77
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> MA0013 Alen của đoạn mỗi X

<400> 77
 gaaggtgacc aagttcatgc tccttccgac aaatagcaca gatca

45

<210> 78
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> MA0013 Alen của đoạn mỗi Y

<400> 78
gaaggtcggga gtcaacggat tcttccgaca aatagcacag atcg 44

<210> 79
<211> 25
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> MA0013 đoạn mỗi gemeinsamer

<400> 79
gacacggtgt gtgccagttt gtaat 25

<210> 80
<211> 47
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> MA0014 Alen của đoạn mỗi X

<400> 80
gaaggtgacc aagttcatgc tcaacctctg acactattag cagtgat 47

<210> 81
<211> 46
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> MA0014 Alen của đoạn mỗi Y

<400> 81
gaaggtcggga gtcaacggat taacctctga cactattagc agtgac 46

<210> 82
<211> 29
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> MA0014 đoạn mỗi gemeinsamer

<400> 82
tgttctgttt ctgattctaa ggtggtctt 29

<210> 83
<211> 44
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> MA0015 Alen của đoạn mỗi X

<400> 83
gaaggtgacc aagttcatgc tacaggtatg ccttgctcat aagc

44

<210> 84
<211> 45
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> MA0015 Alen của đoạn mỗi Y

<400> 84
gaaggtcgga gtcaacggat tcacaggtat gccttgctca taaga

45

<210> 85
<211> 26
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> MA0015 đoạn mỗi gemeinsamer

<400> 85
catarccact gttctaggct ggtgaa

26

<210> 86
<211> 43
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> MA0016 Alen của đoạn mỗi X

<400> 86
gaaggtgacc aagttcatgc tcgagcaacc ggagataacc aca

43

<210> 87
<211> 42
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> MA0016 Alen của đoạn mỗi Y

<400> 87
gaaggtcgga gtcaacggat tgagcaaccg gagataacca cg 42

<210> 88
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> MA0016 đoạn mỗi gemeinsamer

<400> 88
tttcggtaac ttgagacctc taattctttt 30

<210> 89
<211> 38
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> MA0017 Alen của đoạn mỗi X

<400> 89
gaaggtgacc aagttcatgc tcccaaacac gtcgcacg 38

<210> 90
<211> 43
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> MA0017 Alen của đoạn mỗi Y

<400> 90
gaaggtcgga gtcaacggat tatgctccca aacacgtcgc aca 43

<210> 91
<211> 23
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> MA0017 đoạn mỗi gemeinsamer

<400> 91
cgcccgtcac ctaacaacag caa 23

<210> 92
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> MA0018 Alen của đoạn mỗi X

<400> 92
 gaaggtgacc aagttcatgc tattctagag tatagatgtc taaacaaacc

50

<210> 93
 <211> 47
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> MA0018 Alen của đoạn mỗi Y

<400> 93
 gaaggtcgga gtcaacggat tctagagtat agatgtctaa acaaact

47

<210> 94
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> MA0018 đoạn mỗi gemeinsamer

<400> 94
 cgacgggtga cgagtgcga tt

22

<210> 95
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> MA0019 Alen của đoạn mỗi X

<400> 95
 gaaggtgacc aagttcatgc tataaatatc tactcggcgc caatac

46

<210> 96
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> MA0019 Alen của đoạn mỗi Y

<400> 96

gaaggtcgga gtcaacggat tataaatatc tactcggcgc caatag

46

<210> 97

<211> 27

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> MA0019 đoạn mỗi gemeinsamer

<400> 97

ygagatctag gtgtcatctt ctagtca

27

<210> 98

<211> 42

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> MA0020 Alen của đoạn mỗi X

<400> 98

gaaggtgacc aagttcatgc ttgcccagca tctctctgct cc

42

<210> 99

<211> 46

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> MA0020 Alen của đoạn mỗi Y

<400> 99

gaaggtcgga gtcaacggat taattttgcc agcatctctc tgctca

46

<210> 100

<211> 25

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> MA0020 đoạn mỗi gemeinsamer

<400> 100

gtgaatcgga gaccaaggat tgctt

25

<210> 101
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> PZE-108095998 Alen của đoạn mỗi X

<400> 101
 gaaggtgacc aagttcatgc ttcaaacaag caagaggagc agcat

45

<210> 102
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> PZE-108095998 Alen của đoạn mỗi Y

<400> 102
 gaaggtcgga gtcaacggat tcaaacaagc aagaggagca gcag

44

<210> 103
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> PZE-108095998 đoạn mỗi gemeinsamer

<400> 103
 ttgtctcggg tgtaggtcg ccaat

25

<210> 104
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> PZE-108096011 Alen của đoạn mỗi X

<400> 104
 gaaggtgacc aagttcatgc tccactaatg cagagatgga gacta

45

<210> 105
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> PZE-108096011 Alen của đoạn mỗi Y

<400> 105

gaaggtcgga gtcaacggat tcactaatgc agagatggag actg

44

<210> 106

<211> 26

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> PZE-108096011 đoạn mỗi gemeinsamer

<400> 106

catttacaca ctttgcaagg gcccta

26

<210> 107

<211> 44

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> PZE-108096791 Alen của đoạn mỗi X

<400> 107

gaaggtgacc aagttcatgc tagcacgaat cagcttccaa gagt

44

<210> 108

<211> 43

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> PZE-108096791 Alen của đoạn mỗi Y

<400> 108

gaaggtcgga gtcaacggat tgcacgaatc agcttccaag agc

43

<210> 109

<211> 29

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> PZE-108096791 đoạn mỗi gemeinsamer

<400> 109

attcgaagtg cactgcattc tttgtcaaa

29

<210> 110
 <211> 47
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> PZE-108096791 Alen của đoạn mỗi X

<400> 110
 gaaggtgacc aagttcatgc tgtcaaacat ataagagggc aaagtca

47

<210> 111
 <211> 47
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> PZE-108096791 Alen của đoạn mỗi Y

<400> 111
 gaaggtcgga gtcaacggat tgtcaaacat ataagagggc aaagtcg

47

<210> 112
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> PZE-108096791 đoạn mỗi gemeinsamer

<400> 112
 gtgtccgttc tacattttga tgtacctct

29

<210> 113
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi thuận bnlgl782

<400> 113
 cgatgctccg ctaggaatag

20

<210> 114
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi nghịch bnlg1782

<400> 114
tgtgttgga attgaccaa 20

<210> 115
<211> 23
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi thuận umc1960

<400> 115
ctgctggact acatggtgga ctt 23

<210> 116
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi nghịch umc1960

<400> 116
gagctgtagc acccccacaaa c 21

<210> 117
<211> 25
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi thuận bnlg240

<400> 117
aagaacagaa ggcattgata cataa 25

<210> 118
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi nghịch bnlg240

<400> 118
tgcaggtgta tgggcagcta 20

<210> 119
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi thuận umc1121

<400> 119
aaaacgacat gtcacgtct tcaa

24

<210> 120
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi thuận umc1121

<400> 120
gggggtcaggt acagggctag tagt

24

<210> 121
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi thuận bnlg1067

<400> 121
ggcttgcttt tgcttcactt

20

<210> 122
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi nghịch bnlg1067

<400> 122
ctcatcccat tcgttcact

20

<210> 123
<211> 42
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi thuận umc1287

<400> 123

tgtaaaacga cggccagtat gggatgatca gtcgttttcag tc

42

<210> 124

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi nghịch umc1287

<400> 124

aacgcacttc ttgtagctgt aggg

24

<210> 125

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi 579ZMPM0_2F

<400> 125

actcgtttgt ctgtgtcacg

20

<210> 126

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi 579ZMPM0_2R

<400> 126

cttgtcgatt ctccgatctc a

21

<210> 127

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi 579ZMPM0_4F

<400> 127

cttccagacc gacgtgagat

20

<210> 128
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi 579ZMPM0_4R

<400> 128
aatactatgc aaggtcggcg

20

<210> 129
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi 579ZMPM0_5F

<400> 129
ggcattatta gctagggcgca

20

<210> 130
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi 579ZMPM0_5R

<400> 130
ttgggaaact caggttctgc

20

<210> 131
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi 579ZMPM0_17F

<400> 131
tgtaccccag ctacgacgtt

20

<210> 132
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi 579ZMPM0_17R

<400> 132
aaccttcacg caaagaatcg

20

<210> 133
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi 579ZMPM0_16F

<400> 133
aaacatatgc gtgatcggt

20

<210> 134
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi 579ZMPM0_16R

<400> 134
atggctcggt tcttcaggtg

20

<210> 135
<211> 22
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi 579ZMPM0_25F

<400> 135
ttggaccaa cactatcgat cc

22

<210> 136
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi 579ZMPM0_25R

<400> 136
cgttggcaaa acctaggaat c

21

<210> 137
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi 579ZMPM0_22F

<400> 137
actggaactg caggaaggtg

20

<210> 138
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi 579ZMPM0_22R

<400> 138
gacgtttaac cggcagtcag

20

<210> 139
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi 579ZMPM0_34F

<400> 139
tgaattgcaa gcccacacta

20

<210> 140
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi 579ZMPM0_34R

<400> 140
cctggtttgc tgctcttcat

20

<210> 141
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi 579ZMPM0_35F

<400> 141
ccaaatgaac acgaacacca 20

<210> 142
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi 579ZMPM0_35R

<400> 142
ggcgtggtga ctttttgtct 20

<210> 143
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi 579ZMPM0_38F

<400> 143
cccaagatga agatccgatg 20

<210> 144
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi 579ZMPM0_38R

<400> 144
caaaccaaag aactcgagcg 20

<210> 145
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi 579ZMPM0_37F

<400> 145
gtaatggggc agatgtttgg 20

<210> 146
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi 579ZMPM0_37R

<400> 146
gcgactcttc gctacacacc

20

<210> 147
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi 5579ZMPM0_41F

<220>
<221> đặc tính hỗn hợp
<222> (1)..(3)
<223> n là a, c, g, hoặc t

<400> 147
nnnccctggt catgtaactt caat

24

<210> 148
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi 579ZMPM0_41R

<400> 148
tgcacacgat aaggacatgc

20

<210> 149
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi 5579ZMPM0_41F

<220>

<221> đặc tính hỗn hợp
 <222> (1)..(3)
 <223> n là a, c, g, hoặc t

<400> 149
 nnnccctggtt catgtaactt caat 24

<210> 150
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi 579ZMPM0_41R

<400> 150
 tgcacacgat aaggacatgc 20

<210> 151
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi 579ZMPM0_46F

<400> 151
 tcaagagaac tctgggtggc 20

<210> 152
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi 579ZMPM0_46r

<400> 152
 ggccaacaat gacgagagtc 20

<210> 153
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi 579ZMPM0_180F

<400> 153
 gggaggggttg ttctgggtttt 20

<210> 154
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi 579ZMPM0_180R2

<400> 154
ggtccttgtc aatgtcaccc

20

<210> 155
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi 579ZMPM0_48F

<400> 155
atggaccccc gttgttatct

20

<210> 156
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi 579ZMPM0_48R

<400> 156
gcctgcagac aaattcctgt

20

<210> 157
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi 579ZMPM0_48F

<400> 157
atggaccccc gttgttatct

20

<210> 158
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi 579ZMPM0_48R

<400> 158
gcctgcagac aaattcctgt

20

<210> 159
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi 579ZMPM0_56F

<400> 159
cctgtcatgg tgggaacaat

20

<210> 160
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi 579ZMPM0_56R

<400> 160
ctcatcagcg aagcgaaaaa

20

<210> 161
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi 579ZMPM0_51F

<400> 161
accctctcct tgctattggc

20

<210> 162
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi 579ZMPM0_51R

<400> 162
ctccagctct tcgttcgttc

20

<210> 163
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi 579ZMPM0_199F

<400> 163
gcaggctgga caaaagtgtt

20

<210> 164
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi 579ZMPM0_199R

<400> 164
ttcttttttgc ggcctatctg

20

<210> 165
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi 579ZMPM0_63F

<400> 165
atttgcttgg cgtaatcctg

20

<210> 166
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi 579ZMPM0_63R

<400> 166
cagccgtgtt tttcttttgct

20

<210> 167
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi 579ZMPM0_208F

<400> 167
cgcacggatc aagaagagtt

20

<210> 168
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi 579ZMPM0_208R

<400> 168
caatcgccat gcatactttg

20

<210> 169
<211> 22
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi 579ZMPM0_206F

<400> 169
atggtacaag tgtcgatccc tc

22

<210> 170
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi 579ZMPM0_206R

<400> 170
aatgaatcga tgtcgctggt

20

<210> 171
<211> 22
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi 579ZMPM0_86F

<400> 171
cacaactaaa gaggaaccg ga

22

<210> 172
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi 579ZMPM0_86R

<400> 172
ggctgacggg ctagtcttcg 20

<210> 173
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi 579ZMPM0_79F

<400> 173
aaccaaatgg ggtcttagcc 20

<210> 174
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi 579ZMPM0_79R

<400> 174
atccgccact ggtcaaaata 20

<210> 175
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi 579ZMPM0_278F

<400> 175
catcgcaaca tcagcaacat 20

<210> 176
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi 579ZMPM0_278R

<400> 176
 acgtttgttc ccttcatcca

20

<210> 177
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi 579zmpm0_209F

<400> 177
 ctgtgcttct ggtgctgaaa

20

<210> 178
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi 579zmpm0_209R

<400> 178
 ctttcccgcc tgtaaataa

20

<210> 179
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi 579ZMPM0_86F

<400> 179
 cacaactaaa gaggaaaccg ga

22

<210> 180
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 579zmpm0_86F

<400> 180
 cacaactaaa gaggaaaccg ga

22

<210> 181
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi 579zmpm0_87F

<400> 181
ctcacccac cctaccctat

20

<210> 182
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi 579zmpm0_87R

<400> 182
ggggagctgt tgaaggaaat

20

<210> 183
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi 579zmpm0_91F

<400> 183
acgtcgatct gcttgctacc

20

<210> 184
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi 579zmpm0_91R

<400> 184
gagacctagc gatccaacga

20

<210> 185
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi 579zmpm0_216F

<400> 185
ctccatagtg tttcggcctt t

21

<210> 186
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi 579zmpm0_216R

<400> 186
gccctcagga cttaccgact

20

<210> 187
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi 579ZMPM0_95F

<400> 187
gtcactatac ggagacggcg

20

<210> 188
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi 579ZMPM0_95R

<400> 188
ctcggccttc aatttgtgat

20

<210> 189
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi 579ZMPM0_99F

<400> 189
agagcaacat gccttgaacc

20

<210> 190
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi 579ZMPM0_99R

<400> 190
gttttgatcc cgaagccttt

20

<210> 191
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi 579ZMPM0_244F

<400> 191
attcaatgga cacgcaacaa t

21

<210> 192
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi 579ZMPM0_244R

<400> 192
tgtggtgggg attttagtgg

20

<210> 193
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi 579ZMPM0_241F

<400> 193
cattcgaaaa tctggccact

20

<210> 194
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi 579ZMPM0_241R

<400> 194
gccaatggaa tggagaacag 20

<210> 195
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi 579ZMPM0_109F

<400> 195
gagcaaatca gatgcagcaa 20

<210> 196
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi 579ZMPM0_109R

<400> 196
tgatgatggt ctgttgccag 20

<210> 197
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi 579ZMPM0_109F

<400> 197
gagcaaatca gatgcagcaa 20

<210> 198
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi 579ZMPM0_109R

<400> 198
tgatgatggt ctgttgccag 20

<210> 199
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi 579ZMPM0_247F

<400> 199
tgcaaccata tgttgatggg

20

<210> 200
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi 579ZMPM0_247R

<400> 200
cagcttgaga caaacgctga

20

<210> 201
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi 579ZMPM0_112F

<400> 201
tgaaaaccct acctgaagcg

20

<210> 202
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi 579ZMPM0_112R

<400> 202
actgcactga tccggacttc

20

<210> 203
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi 579ZMPM0_125F

 <400> 203
 tcgaggctaa catggtctct g 21

 <210> 204
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> 579ZMPM0_125R

 <400> 204
 catacacttc atgtcgtccc g 21

 <210> 205
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> đoạn mỗi 579ZMPM0_253F

 <400> 205
 ggccgggacg tactagtgtgta 20

 <210> 206
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> đoạn mỗi 579ZMPM0_253R

 <400> 206
 tggttgtcat catttggcac 20

 <210> 207
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> đoạn mỗi 579ZMPM0_125F

 <400> 207
 tcgaggctaa catggtctct g 21

<210> 208
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi 579ZMPM0_125R

<400> 208
catacacttc atgtcgtccc g

21

<210> 209
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi 579ZMPM0_128F

<400> 209
gctcaaggcg atacatgctt

20

<210> 210
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 579ZMPM0_128F

<400> 210
gctcaaggcg atacatgctt

20

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

<220>
<223> đoạn mỗi 579ZMPM0_136F

<400> 211
ggcttgactg taatgg

16

<210> 212
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi 579ZMPM0_136R

<400> 212
tttctgctca cacttcggtg

20

<210> 213
<211> 25
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi 579ZMPM0_131F

<400> 213
tcaagcaaac gagactcttc ttgta

25

<210> 214
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi 579ZMPM0_131R

<400> 214
tagccatgga cagatcgaca

20

<210> 215
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi 579ZMPM0_137F

<400> 215
cggaccttgt actccgtcac

20

<210> 216
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi 579ZMPM0_137R

<400> 216
agaatgtgga ggctacggtg

20

<210> 217
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi 579ZMPM0_138F

<400> 217
tgaaatttag gacttgcccg

20

<210> 218
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi 579ZMPM0_138R

<400> 218
acatctgaac accgcattga

20

<210> 219
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi 579ZMPM0_147F

<400> 219
cttgtggtcc cactccactt

20

<210> 220
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi 579ZMPM0_147R

<400> 220
ttactttcca tggcctccaa

20

<210> 221
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi 579ZMPM0_145F

<400> 221
tgtgctcggg tattgacgta 20

<210> 222
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi 579ZMPM0_145R

<400> 222
ccgtcaactt cctcccctat 20

<210> 223
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi 579ZMPM0_262F

<400> 223
ttgctggctt gttatcctcc 20

<210> 224
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi 579ZMPM0_262R

<400> 224
ccctgtcgtt caaggaaaaa 20

<210> 225
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi 579ZMPM0_161F

<400> 225
taggtaacag aattgcgggc 20

<210> 226
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi 579ZMPM0_161R

<400> 226
tttctaaggc atgggagtgc

20

<210> 227
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi 579ZMPM0_265F

<400> 227
catttcatgg catatgagcg

20

<210> 228
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi 579ZMPM0_265R

<400> 228
ctaaaggccc tgttcccagt

20

<210> 229
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ZNF1_GH034_F_Đoạn mỗi

<400> 229
tggttggtgt cgaagctgag

20

<210> 230
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ZNF1_GH033_R_Đoạn mỗi

<400> 230
atztatcccg gcctttgcat 20

<210> 231
<211> 22
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HYD_GH039_F_Đoạn mỗi

<400> 231
gatctacagg gaagcccact ga 22

<210> 232
<211> 25
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HYD_GH040_R_Đoạn mỗi

<400> 232
tttttccttg aggagttat atgct 25

<210> 233
<211> 17
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> RLK4_GH220_F_Đoạn mỗi

<400> 233
ttgtgcagcg gagggaa 17

<210> 234
<211> 19
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> RLK4_GH221_R_Đoạn mỗi

<400> 234
ccagggcacc agcaagaat 19

<210> 235
<211> 19
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> EXT1_GH168_F_Đoạn mỗi

<400> 235
cgactacaag acgcgtacc

19

<210> 236
<211> 19
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> EXT1_GH170_R_Đoạn mỗi

<400> 236
ggtgtc gatg gtgaggttc

19

<210> 237
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> RLK1_GH138_F_Đoạn mỗi

<400> 237
tattgttggt gctgttgccg

20

<210> 238
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> RLK1_GH139_R_Đoạn mỗi

<400> 238
ggactcaatc cttgtccctg

20

<210> 239
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> RET1_GH055_F_Đoạn mỗi

 <400> 239
 cgctcgtttg ccagatagcc 20

<210> 240
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> RET1_GH056_R_Đoạn mỗi

 <400> 240
 cacggtgtgt gccagtttgt 20

<210> 241
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> MA0021 Alen của đoạn mỗi X

 <400> 241
 gaaggtgacc aagttcatgc tgagctcatc tcgtccaagc cc 42

<210> 242
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> MA0021 Alen của đoạn mỗi Y

 <400> 242
 gaaggtcgga gtcaacggat tgagctcatc tcgtccaagc cg 42

<210> 243
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> MA0021 đoạn mỗi gemeinsamer

 <400> 243
 cgctgcggtg ccgggtgat 19

<210> 244
<211> 47
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> MA0022 Alen của đoạn mỗi X

<400> 244
gaaggtgacc aagttcatgc tcaccaacac aatagtcgtc caaatgt

47

<210> 245
<211> 46
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> MA0022 Alen của đoạn mỗi Y

<400> 245
gaaggtcgga gtcaacggat taccaacaca atagtcgtcc aaatgc

46

<210> 246
<211> 25
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> MA0022 đoạn mỗi gemeinsamer

<400> 246
cagccaatat ttccctcagt ggctt

25

<210> 247
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mỗi MA04916-6f

<400> 247
tgtttcagga atcacgcaac tgga

24

<210> 248
<211> 22
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mồi MA04916-6r

<400> 248
gcaccacgcc atgaccaaca tc

22

<210> 249
<211> 22
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mồi TG10013-10.f

<400> 249
cttcctacag aagaacgaga gt

22

<210> 250
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mồi TG10013-11.r

<400> 250
ttcctcacga gctctgtggt c

21