



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

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

(11)



1-0048269

(51)^{2020.01} C12N 15/82; C12N 15/63

(13) B

(21) 1-2020-04066

(22) 28/01/2019

(86) PCT/US2019/015429 28/01/2019

(87) WO2019/152316 08/08/2019

(30) 62/625,537 02/02/2018 US

(45) 25/07/2025 448

(43) 25/11/2020 392A

(73) MONSANTO TECHNOLOGY LLC (US)

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

(72) ELLIS, Christine, M. (CA); GOLEY, Michael, E. (US); HUANG, Jintai (US);

KLINGAMAN, Tracy, E. (US); LARUE, Clayton, T. (US); QI, Youlin (US);

SPARKS, Oscar, C. (US); VAN SCOYOC, Brook, M. (US); YANG, Heping (US).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) PHÂN TỬ ADN TÁI TỔ HỢP, CÂY, HẠT GIỐNG, TẾ BÀO NGÔ HOẶC BỘ PHẬN CỦA CÂY NGÔ CHỨA PHÂN TỬ NÀY, PHƯƠNG PHÁP KIỂM SOÁT CỎ DẠI, PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT CÂY NGÔ VÀ HẠT GIỐNG NGÔ LAI VÀ PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH TÍNH HỢP TỬ CỦA CÂY NGÔ ĐỐI VỚI SỰ KIỆN NGÔ MON87429

(21) 1-2020-04066

(57) Sáng chế đề xuất phân tử ADN tái tổ hợp mà đặc trưng với sự kiện ngô MON87429 và cây ngô, bộ phận của cây ngô, hạt giống ngô, tế bào ngô chuyển gen và sản phẩm nông nghiệp bao gồm sự kiện ngô MON87429 cũng như phương pháp dùng và phát hiện sự kiện ngô MON87429. Cây ngô chuyển gen bao gồm sự kiện ngô MON87429 thể hiện khả năng chống chịu với chất ức chế axetyl CoA carboxylaza (ACCaza) trong nhóm aryloxyphenoxy propionat (FOP), auxin tổng hợp, chất ức chế glutamin syntetaza, và chất ức chế 5- enolpyruvylshikimat-3-phosphat syntaza (EPSPS).

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các phân tử ADN tái tổ hợp của sự kiện ngô MON87429. Sáng chế còn đề cập đến cây, bộ phận, hạt giống, tế bào ngô chuyển gen và các sản phẩm nông nghiệp bao gồm sự kiện ngô MON87429 cũng như các phương pháp sử dụng cây, bộ phận, hạt giống, tế bào ngô chuyển gen và các sản phẩm nông nghiệp bao gồm sự kiện ngô MON87429 và việc phát hiện sự kiện ngô MON87429. Cây, bộ phận, hạt giống và tế bào ngô chuyển gen bao gồm sự kiện ngô MON87429 thể hiện khả năng chống chịu các chất ức chế axetyl CoA carboxylaza (ACCazaACCaza) trong nhóm aryloxyphenoxy propionat (FOP) như quizalofop và haloxyfop; các auxin tổng hợp như dicamba và 2,4-D; các chất ức chế glutamin syntetaza như glufosinat; và các chất ức chế 5-enolpyruvylshikimat-3-phosphat syntaza (EPSPS) như glyphosat.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Ngô (*Zea mays*) là một loại cây trồng quan trọng ở nhiều khu vực trên thế giới và việc sử dụng thuốc diệt cỏ để kiểm soát cỏ dại trong sản xuất cây trồng là một công cụ được thiết lập ổn định. Các phương pháp công nghệ sinh học đã được sử dụng để sản xuất ngô chuyển gen có khả năng chống chịu với loại thuốc diệt cỏ cụ thể do quá trình biểu hiện của gen khác nguồn gốc, còn được gọi là gen chuyển. Tính trạng chống chịu thuốc diệt cỏ có thể được sử dụng một mình hoặc kết hợp với các tính trạng khác, như khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ khác hoặc kháng sâu bệnh hoặc mầm bệnh. Các dạng kết hợp của các tính trạng chống chịu thuốc diệt cỏ là dạng được mong muốn để đem lại các tùy chọn kiểm soát cỏ dại làm tăng tính linh hoạt của cây trồng và cho phép sử dụng nhiều phương thức tác động diệt cỏ để kiểm soát cỏ dại đầy thách thức. Dạng kết hợp các tính trạng có thể đạt được bằng cách nhân giống từng tính trạng riêng biệt. Việc nhân giống các tính trạng riêng biệt ở ngô và duy trì dạng kết hợp này trong quá trình nhân giống với tập hợp chất mầm nguyên sinh tinh túy đa dạng là một quá trình tiêu tốn thời gian và tốn kém. Cũng có thể

đạt được dạng kết hợp của các tính trạng bằng cách kết hợp nhiều tính trạng tại một vị trí hoặc ổ gen trong hệ gen, nhờ đó đơn giản hóa quá trình nhân giống. Một cách để đạt được điều này thông qua một đoạn chèn chuyển gen đơn lẻ chứa nhiều gen chuyển. Dạng kết hợp của nhiều tính trạng chống chịu thuốc diệt cỏ tại một ổ gen đơn lẻ ở ngô sẽ đem lại công cụ hữu ích trong việc kiểm soát cỏ dại mà đơn giản hơn nhiều và duy trì đỡ tốn kém hơn trong quá trình nhân giống với tập hợp chất mầm nguyên sinh tinh túy đa dạng.

Quá trình biểu hiện của gen chuyển ở cây, bộ phận, hạt giống hoặc tế bào chuyển gen, và do đó hiệu quả của nó, có thể bị ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố khác nhau, như các yếu tố được sử dụng trong băng biểu hiện của gen chuyển và sự tương tác của các yếu tố đó. Điều này còn phức tạp hơn nữa đối với đoạn chèn gen chuyển chứa hai hoặc nhiều băng biểu hiện mà mỗi băng biểu hiện có một gen chuyển đem lại một tính trạng tách biệt, còn được gọi là sự kiện chuyển gen đa gen. Sự kiện chuyển gen đa gen có ích về mặt thương mại đòi hỏi mỗi gen chuyển trong đoạn chèn chuyển gen biểu hiện theo phương thức cần thiết cho mỗi tính trạng. Để đạt được điều này, các băng biểu hiện riêng biệt trước tiên được thiết kế và kiểm tra ở cây và các băng biểu hiện tốt nhất được chọn cho mỗi tính trạng. Tiếp theo, các băng biểu hiện được chọn cho một tính trạng được kết hợp với các băng biểu hiện được chọn cho (các) tính trạng khác thành một cấu trúc và cấu trúc này được kiểm tra để đảm bảo rằng tất cả các băng biểu hiện hoạt động tốt cùng nhau và mỗi gen chuyển được biểu hiện một cách đúng đắn. Sau đó, dạng kết hợp của các băng biểu hiện được chọn được sử dụng làm một dạng chèn chuyển gen đơn lẻ để tạo ra hàng trăm sự kiện chuyển gen đa gen, mỗi sự kiện là kết quả của việc chèn ngẫu nhiên ADN ngoại lai vào một vị trí hệ gen khác. Mỗi sự kiện chuyển gen là đơn nhất. Sau đó, các sự kiện đơn nhất được phân tích qua nhiều thế hệ cây trồng để chọn ra sự kiện ưu việt cho mục đích thương mại. Hiệu suất của sự kiện ở cây, bộ phận, hạt giống hoặc tế bào chuyển gen, và do đó, hiệu quả của nó, có thể bị ảnh hưởng bởi vị trí hệ gen của đoạn chèn chuyển gen. Các sự kiện có thể có cùng một đoạn chèn chuyển gen và dù sao cũng có các mức biểu hiện gen chuyển khác nhau và hiệu suất giữa các mô và giai đoạn phát triển, trong chất mầm nguyên sinh khác nhau hoặc trong các điều kiện tăng trưởng cụ thể. Việc tạo ra sự kiện đa gen để sử dụng trong thương mại đòi hỏi phải mô tả đặc tính phân tử nghiêm ngặt, thử nghiệm nhà kính và thử nghiệm trên ruộng đồng trong nhiều năm, ở nhiều địa điểm và trong nhiều điều kiện khác nhau để có thể thu thập dữ liệu nông học, kiểu hình và phân tử. Sau đó, dữ liệu thu được phải được các nhà khoa học và nhà nông học phân tích để chọn ra sự kiện hữu ích cho mục đích thương mại.

Sau đó, sự kiện đa gen thương mại có thể được nhập gen ở dạng ổ gen đơn lẻ có nhiều tính trạng chống chịu thuốc diệt cỏ vào chất mầm nguyên sinh mới bằng phương pháp nhân giống cây.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất các phân tử ADN tái tổ hợp bao gồm trình tự được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 2 và SEQ ID NO: 1. Theo một phương án, phân tử ADN tái tổ hợp được tạo ra từ cây, hạt giống hoặc tế bào bao gồm sự kiện ngô MON87429, một mẫu hạt giống tiêu biểu chứa sự kiện này đã được nộp lưu ở dạng số truy cập ATCC là: PTA-124635. Theo một phương án khác, phân tử ADN tái tổ hợp nằm trong cây, tế bào, hạt giống hoặc bộ phận của cây bao gồm sự kiện ngô MON87429, một mẫu hạt giống tiêu biểu chứa sự kiện này đã được nộp lưu ở dạng ATCC PTA-124635. Theo một phương án khác, phân tử ADN tái tổ hợp là sản phẩm khuếch đại có tính chẩn đoán về sự có mặt của sự kiện ngô MON87429.

Sáng chế đề xuất cấu trúc ADN bao gồm bốn băng biểu hiện, trong đó băng biểu hiện thứ nhất bao gồm trong liên kết có thể hoạt động (I) đoạn khởi đầu ubiquitin, đoạn dẫn đầu và intron từ *Erianthus ravennae*, (II) trình tự mã hóa phosphinothricin N-axetyltransferaza, (III) 3' UTR fructoza-bisphosphat aldolaza từ *Setaria italica*; băng biểu hiện thứ hai bao gồm trong liên kết có thể hoạt động (I) đoạn khởi đầu ubiquitin, đoạn dẫn đầu và intron từ *Coix lacryma-jobi*, (II) trình tự mã hóa peptit chuyển tiếp lục lạp 6 bạch tạng và xanh lục nhạt từ *Arabidopsis thaliana*, (III) trình tự mã hóa dicamba monooxygenaza, và (IV) 3' UTR protein giống metallothionein từ *Oryza sativa*; băng biểu hiện thứ ba bao gồm trong liên kết có thể hoạt động (I) đoạn khởi đầu ubiquitin, đoạn dẫn đầu và intron từ *Arundo donax*, (II) trình tự mã hóa peptit chuyển tiếp lục lạp malat dehydrogenaza từ *Arabidopsis thaliana*, (III) trình tự mã hóa protein FT_T, và (IV) 3' UTR protein mô phân sinh không đỉnh từ *Oryza sativa*; và băng biểu hiện thứ tư bao gồm trong liên kết có thể hoạt động (I) đoạn khởi đầu CaMV 35S và đoạn dẫn đầu, (II) đoạn dẫn đầu protein liên kết chất diệt lục a/b từ *Triticum aestivum*, (III) intron actin 1 từ *Oryza sativa*, (IV) trình tự mã hóa peptit chuyển tiếp lục lạp ShkG từ *Arabidopsis thaliana*, (V) trình tự mã hóa 5-enolpyruvylshikimat-3-phosphat syntaza chống chịu glyphosat từ *Agrobacterium sp* chủng

CP4, (VI) đích ARN cản trở nhỏ đặc hiệu với mô đực từ *Zea mays*, và (VII) 3' UTR protein liên kết ARN giàu glyxin từ *Oryza sativa*.

Sáng chế đề xuất phân tử ADN có đủ độ dài của các nucleotit liên tiếp có SEQ ID NO: 10 để hoạt động trong vai trò là đoạn dò ADN đặc hiệu với SEQ ID NO: 10 trong mẫu ADN được tạo ra từ cây ngô, hạt ngô hoặc tế bào ngô. Theo một phương án, đoạn dò ADN bao gồm SEQ ID NO: 13.

Sáng chế đề xuất cặp gồm các phân tử ADN bao gồm phân tử ADN thứ nhất và phân tử ADN thứ hai, trong đó mỗi phân tử ADN thứ nhất và thứ hai bao gồm mảnh SEQ ID NO: 10 và hoạt động trong vai trò là đoạn dò ADN khi được sử dụng cùng nhau trong phản ứng khuếch đại với ADN bao gồm sự kiện ngô MON87429 để tạo ra sản phẩm khuếch đại có tính chẩn đoán về sự kiện ngô MON87429 trong mẫu. Theo một phương án, ít nhất một đoạn dò ADN bao gồm mảnh của trình tự được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 7 và SEQ ID NO: 8. Theo một phương án khác, phân tử ADN thứ nhất bao gồm SEQ ID NO: 11 và phân tử ADN thứ hai bao gồm SEQ ID NO: 12.

Sáng chế đề xuất phương pháp phát hiện sự có mặt của sự kiện ngô MON87429 trong mẫu ADN được tạo ra từ cây ngô, hạt ngô hoặc tế bào ngô, phương pháp này bao gồm: cho mẫu tiếp xúc với đoạn dò ADN; đưa mẫu và đoạn dò ADN vào các điều kiện lai tạo nghiêm ngặt; và phát hiện hiện tượng lai của đoạn dò ADN với phân tử ADN trong mẫu, trong đó hiện tượng lai của đoạn dò ADN với phân tử ADN thể hiện sự có mặt của sự kiện ngô MON87429 trong mẫu ADN.

Sáng chế đề xuất phương pháp phát hiện sự có mặt của sự kiện ngô MON87429 trong mẫu ADN được tạo ra từ cây ngô, hạt ngô hoặc tế bào ngô, phương pháp này bao gồm: cho mẫu tiếp xúc với cặp gồm các phân tử ADN mà hoạt động trong vai trò là đoạn dò ADN; thực hiện phản ứng khuếch đại đủ để tạo ra sản phẩm khuếch đại ADN bao gồm trình tự được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 2 và SEQ ID NO: 1; và phát hiện sự có mặt của sản phẩm khuếch đại ADN, trong đó sự có mặt của sản phẩm khuếch đại ADN thể hiện sự có mặt của sự kiện ngô MON87429 trong mẫu.

Sáng chế đề xuất phương pháp phát hiện sự có mặt của sự kiện ngô MON87429 trong mẫu được tạo ra từ cây ngô, hạt ngô hoặc tế bào ngô, phương pháp này bao gồm: cho mẫu tiếp xúc với ít nhất một kháng thể đặc hiệu với ít nhất một hoặc nhiều protein được mã hóa bởi sự kiện ngô MON87429; và phát hiện hiện tượng liên kết của kháng thể với protein trong

mẫu, trong đó hiện tượng liên kết của kháng thể với protein thể hiện sự có mặt của sự kiện ngô MON87429 trong mẫu. Theo một phương án khác, phương pháp này bao gồm việc cho mẫu tiếp xúc thêm với ít nhất một kháng thể thứ hai đặc hiệu với protein thứ hai được mã hóa bởi sự kiện ngô MON87429. Theo một phương án khác, phương pháp này bao gồm việc cho mẫu tiếp xúc thêm với ít nhất một kháng thể thứ hai và kháng thể thứ ba lần lượt đặc hiệu với protein thứ hai và protein thứ ba được mã hóa bởi sự kiện ngô MON87429. Theo một phương án khác, phương pháp này bao gồm việc cho mẫu tiếp xúc thêm với ít nhất một kháng thể thứ hai, kháng thể thứ ba và kháng thể thứ tư lần lượt đặc hiệu với protein thứ hai, protein thứ ba và protein thứ tư được mã hóa bởi sự kiện ngô MON87429. Sáng chế đề xuất kit dùng để phát hiện sự có mặt của sự kiện ngô MON87429 bao gồm đoạn dò ADN đặc hiệu với SEQ ID NO: 10, cặp gồm các đoạn mồi ADN mà tạo ra sản phẩm khuếch đại có tính chẩn đoán về sự kiện ngô MON87429 hoặc ít nhất một kháng thể đặc hiệu với ít nhất một protein được mã hóa bởi sự kiện ngô MON87429.

Sáng chế đề xuất cây, hạt giống, tế bào, bộ phận của cây hoặc sản phẩm hàng hóa chứa phân tử ADN bao gồm trình tự được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 và SEQ ID NO: 10. Theo một phương án, cây, hạt giống, tế bào hoặc bộ phận của cây chống chịu ít nhất một loại thuốc diệt cỏ được chọn từ nhóm gồm các chất ức chế axetyl CoA carboxylaza (ACCaza) trong nhóm aryloxyphenoxy propionat (FOP), auxin tổng hợp, chất ức chế glutamin syntetaza và chất ức chế 5-enolpyruvylshikimat-3-phosphat syntaza (EPSPS) hoặc dạng kết hợp bất kỳ của chúng. Theo một phương án khác, cây, hạt giống, tế bào hoặc bộ phận của cây chống chịu với quizalofop, haloxyfop, dicamba, 2,4-D và glufosinat.

Sáng chế đề xuất phương pháp kiểm soát cỏ dại trong khu vực trồng trọt bao gồm trồng ngô bao gồm sự kiện ngô MON87429 trong khu vực trồng trọt và áp dụng cho khu vực trồng trọt, hoặc bất kỳ phần nào trong số đó, một lượng hữu hiệu của ít nhất một loại thuốc diệt cỏ được chọn từ nhóm gồm các chất ức chế axetyl CoA carboxylaza (ACCaza) trong nhóm aryloxyphenoxy propionat (FOP), auxin tổng hợp, chất ức chế glutamin syntetaza và chất ức chế 5-enolpyruvylshikimat-3-phosphat syntaza (EPSPS) hoặc dạng kết hợp bất kỳ của chúng, để kiểm soát cỏ dại trong khu vực mà không làm tổn thương ngô. Theo một phương án, phương pháp này bao gồm việc áp dụng ít nhất hai loại thuốc diệt cỏ trở lên được chọn từ nhóm gồm chất ức chế axetyl CoA carboxylaza (ACCaza) trong nhóm

aryloxyphenoxy propionat (FOP), auxin tổng hợp, chất ức chế glutamin syntetaza, và chất ức chế 5-enolpyruvylshikimat-3-phosphat syntaza (EPSPS) trong mùa trồng trọt. Theo một phương án khác, phương pháp này bao gồm việc áp dụng một loại thuốc diệt cỏ được chọn từ nhóm gồm quizalofop, haloxyfop, dicamba, 2,4-D, glufosinat và glyphosat hoặc dạng kết hợp bất kỳ của chúng. Theo một phương án, lượng hữu hiệu của dicamba là khoảng 0,1 pao (0,05kg) đương lượng axit/mẫu Anh đến khoảng 16 pao (8kg) đương lượng axit/mẫu Anh trong một mùa trồng trọt. Theo một phương án, lượng hữu hiệu của dicamba là khoảng 0,5 pao (0,25kg) đương lượng axit/mẫu Anh đến khoảng 2 pao (1kg) đương lượng axit/mẫu Anh trong mùa trồng trọt. Theo một phương án, lượng hữu hiệu của glufosinat là khoảng 0,1 pao (0,05kg) đương lượng axit/mẫu Anh đến khoảng 16 pao (8kg) đương lượng axit/mẫu Anh trong mùa trồng trọt. Theo một phương án, lượng hữu hiệu của glufosinat là khoảng 0,4 pao (0,2kg) đương lượng axit/mẫu Anh đến khoảng 1,59 pao (0,795kg) đương lượng axit/mẫu Anh trong mùa trồng trọt. Theo một phương án, lượng hữu hiệu của 2,4-D là khoảng 0,1 pao (0,05kg) đương lượng axit/mẫu Anh đến khoảng 10 pao (5kg) đương lượng axit/mẫu Anh trong mùa trồng trọt. Theo một phương án, lượng hữu hiệu của 2,4-D là khoảng 0,75 pao (0,375kg) đương lượng axit/mẫu Anh đến khoảng 1,0 pao (0,5kg) đương lượng axit/mẫu Anh trong mùa trồng trọt. Theo một phương án, lượng hữu hiệu của FOP là khoảng 0,01 pao (0,005kg) thành phần có hoạt tính/mẫu Anh đến khoảng 1,0 pao (0,5kg) thành phần có hoạt tính/mẫu Anh trong mùa trồng trọt. Theo một phương án, lượng hữu hiệu của thuốc diệt cỏ FOP là khoảng 0,034 pao (0,017kg) thành phần có hoạt tính/mẫu Anh đến khoảng 0,083 pao (0,0415kg) thành phần có hoạt tính/mẫu Anh của quizalofop trong mùa trồng trọt. Theo một phương án, lượng hữu hiệu của thuốc diệt cỏ FOP là khoảng 0,018 pao (0,009kg) thành phần có hoạt tính/mẫu Anh đến khoảng 0,07 pao (0,035kg) thành phần có hoạt tính/mẫu Anh của haloxyfop trong mùa trồng trọt.

Sáng chế đề xuất phương pháp kiểm soát ngô mọc dại bao gồm sự kiện ngô MON87429 trong một khu vực bao gồm việc áp dụng một lượng hữu hiệu diệt cỏ của ít nhất một loại thuốc diệt cỏ xyclohexandion (DIM), trong đó việc áp dụng thuốc diệt cỏ ngăn chặn sự tăng trưởng của ngô bao gồm sự kiện ngô MON87429. Theo một phương án, thuốc diệt cỏ xyclohexandion (DIM) được chọn từ nhóm gồm clethodim, sethoxydim và tralkoxydim.

Sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất cây mà chống chịu với ít nhất một thuốc diệt cỏ được chọn từ nhóm gồm chất ức chế axetyl CoA carboxylaza (ACCaza) trong nhóm aryloxyphenoxy propionat (FOP), auxin tổng hợp, chất ức chế glutamin syntetaza, và chất

ức chế 5-enolpyruvylshikimat-3-phosphat syntaza (EPSPS), hoặc dạng kết hợp bất kỳ của chúng, phương pháp này bao gồm: nhân giống cây bao gồm sự kiện ngô MON87429 với chính nó hoặc cây thứ hai để tạo ra hạt giống; và nhận diện hạt giống thế hệ con mà bao gồm sự kiện ngô MON87429. Theo một phương án, việc nhận diện hạt giống thế hệ con mà bao gồm sự kiện ngô MON87429 là bằng cách trồng hạt giống thế hệ con để tạo ra cây thế hệ con; xử lý cây thế hệ con bằng một lượng hữu hiệu của ít nhất một thuốc diệt cỏ được chọn từ nhóm gồm quizalofop, haloxyfop, dicamba, 2,4-D, glufosinat, glyphosat, hoặc dạng kết hợp bất kỳ của chúng; và chọn cây thế hệ con mà chống chịu với ít nhất một thuốc diệt cỏ được chọn từ nhóm gồm chất ức chế axetyl CoA carboxylaza (ACCaza) trong nhóm aryloxyphenoxy propionat (FOP), auxin tổng hợp, chất ức chế glutamin syntetaza, và chất ức chế 5-enolpyruvylshikimat-3-phosphat syntaza (EPSPS). Theo một phương án, việc nhận diện hạt giống thế hệ con bao gồm sự kiện ngô MON87429 là bằng cách phát hiện sự có mặt của sự kiện ngô MON87429 trong mẫu được tạo ra từ hạt giống thế hệ con. Theo một phương án, việc nhận diện hạt giống thế hệ con mà bao gồm sự kiện ngô MON87429 là bằng cách phát hiện sự có mặt của ít nhất một protein được mã hóa bởi sự kiện ngô MON87429 trong mẫu được tạo ra từ hạt giống thế hệ con.

Sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất hạt giống lai bao gồm: trồng cây chứa SEQ ID NO: 10; áp dụng một lượng hữu hiệu của glyphosat trước hoặc trong quá trình phát triển mô sinh sản đực của cây, nhờ đó kích thích tình trạng bất dục đực ở cây; thụ phấn cho cây này bằng phấn hoa từ cây thứ hai; và thu hoạch hạt giống lai từ cây này. Theo một phương án, glyphosat được áp dụng trước hoặc trong quá trình phát triển với lượng hữu hiệu khoảng 0,25 pao (0,125kg) đương lượng axit/mẫu Anh đến khoảng 11 pao (5,5kg) đương lượng axit/mẫu Anh. Theo một phương án, glyphosat được áp dụng trước hoặc trong quá trình phát triển với một lượng hữu hiệu tổng cộng là khoảng 0,5 pao (0,25kg) đương lượng axit/mẫu Anh đến khoảng 2,5 pao (1,25kg) đương lượng axit/mẫu Anh trong một hoặc nhiều lần áp dụng. Theo một phương án, lượng hữu hiệu của glyphosat được áp dụng ở giai đoạn phát triển được chọn từ nhóm gồm giai đoạn V4, V5, V6, V7, V8, V9, V10, V11, V12, V13 và V14 của quá trình phát triển của cây ngô. Sáng chế đề xuất hạt giống lai chứa SEQ ID NO:10 và được tạo ra bằng cách sử dụng phương pháp sản xuất hạt giống lai bao gồm: trồng cây chứa SEQ ID NO:10; áp dụng một lượng hữu hiệu của glyphosat trước hoặc trong quá trình phát triển của mô sinh sản đực của cây nhờ đó kích thích tình trạng

bất dục đực ở cây; thụ phấn cho cây này bằng phấn hoa từ cây thứ hai; và thu hoạch hạt giống lai từ cây này.

Sáng chế đề xuất phương pháp xác định tính hợp tử của cây đối với sự kiện ngô MON87429 bao gồm: cho mẫu chứa ADN được tạo ra từ cây tiếp xúc với tập hợp đoạn môi có khả năng tạo ra sản phẩm khuếch đại thứ nhất có tính chẩn đoán về sự có mặt của sự kiện ngô MON87429 và sản phẩm khuếch đại thứ hai có tính chẩn đoán về ADN hệ gen ngô loại hoang dại không bao gồm sự kiện ngô MON87429; thực hiện phản ứng khuếch đại axit nucleic; phát hiện sản phẩm khuếch đại thứ nhất và sản phẩm khuếch đại thứ hai, trong đó sự có mặt của cả hai sản phẩm khuếch đại biểu lộ mẫu có tính dị hợp tử đối với sự kiện ngô MON87429 và sự có mặt của chỉ sản phẩm khuếch đại thứ nhất biểu lộ mẫu có tính đồng hợp tử đối với sự kiện ngô MON87429. Theo một phương án, tập hợp đoạn môi bao gồm SEQ ID NO: 11 và SEQ ID NO: 12.

Sáng chế đề xuất phương pháp cải thiện độ chống chịu với ít nhất một thuốc diệt cỏ được chọn từ nhóm gồm chất ức chế axetyl CoA carboxylaza (ACCaza) trong nhóm aryloxyphenoxy propionat (FOP), auxin tổng hợp, chất ức chế glutamin syntetaza, và chất ức chế 5-enolpyruvylshikimat-3-phosphat syntaza (EPSPS), hoặc dạng kết hợp bất kỳ của chúng, ở cây ngô bao gồm: (a) thu được cấu trúc ADN chứa bốn băng biểu hiện, trong đó băng biểu hiện thứ nhất bao gồm trong liên kết có thể hoạt động (I) đoạn khởi đầu ubiquitin, đoạn dẫn đầu, và intron từ *Erianthus ravennae*, (II) trình tự mã hóa phosphinothricin N-axetyltransferaza, và (III) 3' UTR fructoza-bisphosphat aldolaza từ *Setaria italica*; băng biểu hiện thứ hai bao gồm trong liên kết có thể hoạt động (I) đoạn khởi đầu ubiquitin, đoạn dẫn đầu, và intron từ *Coix lacryma-jobi*, (II) trình tự mã hóa peptit chuyển tiếp lục lạp 6 bạch tạng và xanh lục nhạt từ *Arabidopsis thaliana*, (III) trình tự mã hóa dicamba monooxygenaza, và (IV) 3' UTR protein giống metallothionein từ *Oryza sativa*; băng biểu hiện thứ ba bao gồm trong liên kết có thể hoạt động (I) đoạn khởi đầu ubiquitin, đoạn dẫn đầu, và intron từ *Arundo donax*, (II) trình tự mã hóa peptit chuyển tiếp lục lạp malat dehydrogenaza từ *Arabidopsis thaliana*, (III) trình tự mã hóa protein FT_T, và (IV) 3' UTR protein mô phân sinh không đỉnh từ *Oryza sativa*; và băng biểu hiện thứ tư bao gồm trong liên kết có thể hoạt động (I) đoạn khởi đầu CaMV 35S và đoạn dẫn đầu, (II) đoạn dẫn đầu protein liên kết chất diệt lục a/b từ *Triticum aestivum*, (III) intron actin 1 từ *Oryza sativa*, (IV) trình tự mã hóa peptit chuyển tiếp lục lạp ShkG từ *Arabidopsis thaliana*, (V) trình tự mã hóa 5-enolpyruvylshikimat-3-phosphat syntaza chống chịu glyphosat từ *Agrobacterium*

sp chủng CP4, (VI) đích ARN cản trở nhỏ đặc hiệu với mô được từ *Zea mays*, và (VII) 3'UTR protein liên kết ARN giàu glyxin từ *Oryza sativa*; (b) chèn cấu trúc ADN vào hệ gen của tế bào ngô; (c) tái tạo tế bào ngô thành cây ngô; và (d) chọn cây ngô chứa cấu trúc ADN. Theo một phương án, việc chọn là bằng cách xử lý cây ngô bằng lượng hữu hiệu của ít nhất một loại thuốc diệt cỏ được chọn từ nhóm gồm quizalofop, haloxyfop, dicamba, 2,4-D, glufosinat hoặc glyphosat. Theo một phương án, sáng chế đề xuất cây ngô, hạt giống ngô, hoặc tế bào ngô chống chịu với ít nhất một thuốc diệt cỏ được chọn từ nhóm gồm chất ức chế axetyl CoA carboxylaza (ACCase) trong nhóm aryloxyphenoxy propionat (FOP), auxin tổng hợp, chất ức chế glutamin syntetaza, và chất ức chế 5-enolpyruvylshikimat-3-phosphat syntaza (EPSPS), hoặc dạng kết hợp bất kỳ của chúng, và có thể thu được bằng phương pháp, trong đó cây ngô, hạt giống ngô, hoặc tế bào ngô chứa cấu trúc ADN. Theo một phương án khác, cây ngô, hạt ngô hoặc tế bào ngô được sản xuất theo phương pháp này chứa SEQ ID NO: 10.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 thể hiện trình tự của sự kiện ngô MON87429. Các đường ngang tương ứng với các vị trí của SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 và SEQ ID NO: 9 so với SEQ ID NO: 10; các mũi tên ngang có nhãn SQ51062 (SEQ ID NO: 11) và SQ51053 (SEQ ID NO: 12) thể hiện vị trí gần đúng của cặp gồm các đoạn môi có thể được sử dụng để phát hiện sự kiện ngô MON87429; và đường ngang có nhãn PB50370 (SEQ ID NO: 13) thể hiện vị trí gần đúng của đoạn dò ADN có thể được sử dụng để phát hiện sự kiện ngô MON87429. Hình 2 thể hiện bốn bảng biểu hiện của sự kiện ngô MON87429 liên quan đến SEQ ID NO: 9 với các yếu tố di truyền tương ứng được dán nhãn như mô tả trong Bảng 1. Hình 3 thể hiện việc tạo, thử nghiệm, mô tả đặc tính và chọn sự kiện MON87429 như được mô tả trong bản mô tả này. Tất cả các khoảng thời gian là gần đúng.

Mô tả vắn tắt các trình tự

SEQ ID NO: 1 là trình tự ADN gồm ba mươi nucleotit tiêu biểu cho điểm nối 5' của ADN hệ gen ngô và đoạn chèn gen chuyển. SEQ ID NO: 1 tương ứng với các vị trí nucleotit 1015 đến 1044 của SEQ ID NO: 10.

SEQ ID NO:2 là trình tự ADN gồm ba mươi nucleotit tiêu biểu cho điểm nối 3' của ADN hệ gen ngô và đoạn chèn gen chuyển. SEQ ID NO:2 tương ứng với các vị trí nucleotit 15023 đến 15052 của SEQ ID NO:10.

SEQ ID NO:3 là trình tự ADN gồm sáu mươi nucleotit tiêu biểu cho điểm nối 5' của ADN hệ gen ngô và đoạn chèn gen chuyển. SEQ ID NO:3 tương ứng với các vị trí nucleotit 1000 đến 1059 của SEQ ID NO:10.

SEQ ID NO:4 là trình tự ADN gồm sáu mươi nucleotit tiêu biểu cho điểm nối 3' của ADN hệ gen ngô và đoạn chèn gen chuyển. SEQ ID NO:4 tương ứng với các vị trí nucleotit 15008 đến 15067 của SEQ ID NO:10.

SEQ ID NO:5 là trình tự ADN gồm một trăm nucleotit tiêu biểu cho điểm nối 5' của ADN hệ gen ngô và đoạn chèn gen chuyển. SEQ ID NO:5 tương ứng với các vị trí nucleotit 980 đến 1079 của SEQ ID NO:10.

SEQ ID NO:6 là trình tự ADN gồm một trăm nucleotit tiêu biểu cho điểm nối 3' của ADN hệ gen ngô và đoạn chèn gen chuyển. SEQ ID NO:6 tương ứng với các vị trí nucleotit 14988 đến 15087 của SEQ ID NO:10.

SEQ ID NO: 7 là trình tự ADN gồm 1350 nucleotit tiêu biểu cho 1029 nucleotit của ADN hệ gen ngô kẹp 5' và 321 nucleotit ở đầu mút 5' của đoạn chèn gen chuyển.

SEQ ID NO:8 là trình tự ADN gồm 1069 nucleotit tiêu biểu cho 38 nucleotit của đầu mút 3' của đoạn chèn gen chuyển và 1031 nucleotit của ADN hệ gen ngô kẹp 3'.

SEQ ID NO: 9 là trình tự ADN gồm 14008 nucleotit tương ứng với đoạn chèn gen chuyển của sự kiện ngô MON87429.

SEQ ID NO: 10 là trình tự ADN gồm 16068 nucleotit tương ứng với sự kiện ngô MON87429; trình tự chứa trình tự ADN hệ gen kẹp 5' từ vị trí 1 đến 1029, đoạn chèn ADN chuyển gen từ vị trí 1030 đến 15037 và trình tự ADN hệ gen kẹp 3' từ vị trí 15038 đến 16068.

SEQ ID NO: 11 là trình tự ADN gồm 29 nucleotit tương ứng với đoạn môi được gọi là SQ51062 và được sử dụng để nhận diện ADN sự kiện ngô MON87429 trong mẫu; phần này tương ứng với các vị trí 15038 đến 15066 của SEQ ID NO: 10.

SEQ ID NO:12 là trình tự ADN gồm 17 nucleotit tương ứng với đoạn môi được gọi là SQ51053 và được sử dụng để nhận diện ADN sự kiện ngô MON87429 trong mẫu; phần này tương ứng với các vị trí 14987 đến 15003 của SEQ ID NO:10.

SEQ ID NO:13 là trình tự ADN gồm 16 nucleotit tương ứng với đoạn dò được gọi là PB50370 và được sử dụng để nhận diện ADN sự kiện ngô MON87429 trong mẫu; phần này tương ứng với các vị trí 15009 đến 15024 của SEQ ID NO:10.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các định nghĩa và phương pháp sau đây được đưa ra để xác định rõ hơn sáng chế và hướng dẫn chuyên gia có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này trong việc thực hành sáng chế. Trừ khi có ghi chú khác, các thuật ngữ sẽ được hiểu theo cách sử dụng thông thường bởi chuyên gia có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật liên quan.

Các kỹ thuật biến nạp thực vật được sử dụng để chèn ADN ngoại lai (còn được gọi là ADN chuyển gen) một cách ngẫu nhiên vào nhiễm sắc thể của hệ gen của tế bào để tạo ra tế bào được xử lý công nghệ gen, còn được gọi là tế bào “chuyển gen” hoặc tế bào “tái tổ hợp”. Bằng cách sử dụng kỹ thuật này, nhiều tế bào riêng biệt được biến nạp, mỗi tế bào đem lại sự kiện chuyển gen đơn nhất do sự chèn ngẫu nhiên ADN ngoại lai vào hệ gen. Sau đó, cây chuyển gen được tái tạo từ mỗi tế bào chuyển gen riêng biệt. Điều này dẫn đến mọi tế bào của cây chuyển gen chứa sự kiện chuyển gen được chèn vào một cách đơn nhất như là một phần ổn định trong hệ gen của nó. Sau đó, cây chuyển gen này có thể được sử dụng để sản xuất cây thế hệ con, mỗi cây chứa sự kiện chuyển gen đơn nhất. Sự kiện ngô MON87429 được tạo ra bằng cách: (i) biến nạp hàng ngàn tế bào ngô bằng cấu trúc ADN mà bao gồm bốn băng biểu hiện (mỗi băng biểu hiện đã được chọn sau khi thử nghiệm riêng biệt, sau đó thử nghiệm kết hợp với ba băng biểu hiện khác), (ii) tái tạo quần thể cây chuyển gen, mỗi loài có sự kiện chuyển gen đơn nhất và (iii) việc chọn sự kiện nhiều năm nghiêm ngặt liên quan đến việc kiểm tra và phân tích các đặc tính phân tử, hiệu quả chống chịu thuốc diệt cỏ và các đặc tính nông học trong nhiều nền tảng di truyền đối với hàng ngàn sự kiện thông qua hàng chục ngàn cây. Vì vậy, sự kiện ngô MON87429 được tạo ra và chọn trong vai trò là sự kiện ưu việt đơn nhất hữu ích cho các mục đích thương mại nông học quy mô rộng.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, “sự kiện chuyển gen” hoặc “sự kiện” là phân tử ADN được tạo ra bằng hành động chèn phân tử ADN chuyển gen vào ADN hệ gen của tế bào cây bằng cách sử dụng phương pháp biến nạp thực vật đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Việc chèn này tạo ra trình tự ADN hệ gen chuyển gen mới mà gồm ADN ngoại lai được chèn vào (được gọi là “đoạn chèn chuyển gen”) và ADN hệ gen liền kề, hoặc “kẹp”,

đoạn chèn chuyển gen ở hai bên của vị trí chèn (được gọi là “ADN kẹp”). trình tự ADN của sự kiện là đơn nhất và đặc hiệu với sự kiện và có thể dễ dàng nhận diện khi so sánh với các trình tự ADN khác, như trình tự của các sự kiện khác hoặc ADN hệ gen ngô chưa được biến nạp. Sự kiện ngô MON87429 có trình tự ADN mới và đơn nhất được đề xuất ở dạng SEQ ID NO: 10, trình tự này chứa trình tự đoạn chèn chuyển gen được đề xuất ở dạng SEQ ID NO: 9 và trình tự ADN kẹp 5' và 3' lần lượt được đề xuất ở SEQ ID NO: 7 và SEQ ID NO: 8. Do đó, sự kiện ngô MON87429 là phân tử ADN là một phần không thể thiếu trong nhiễm sắc thể của các tế bào và cây ngô chuyển gen chứa sự kiện này và như vậy là tính và có thể được truyền cho các tế bào và cây thế hệ con.

Sáng chế còn đề xuất thế hệ con của tế bào và cây được biến nạp ban đầu bao gồm sự kiện ngô MON87429. Các thế hệ con như vậy có thể được tạo ra bằng cách nuôi cấy mô tế bào, bằng cách tự thụ phấn cây ngô bao gồm sự kiện ngô MON87429 hoặc bằng cách lai giữa một cây ngô bao gồm sự kiện ngô MON87429 và một cây khác có hoặc không có sự kiện này. Cây khác như vậy có thể là cây chuyển gen chứa cùng một sự kiện hoặc (các) sự kiện khác nhau hoặc một cây không chuyển gen, như một cây từ một giống khác. Sự kiện ngô MON87429 được truyền từ cha mẹ ban đầu qua từng thế hệ cho thế hệ con.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “ngô” có nghĩa là *Zea mays* (còn được gọi là bắp) và bao gồm tất cả các giống cây trồng có thể được nhân giống với *Zea mays*.

Sáng chế đề xuất sự kiện ngô MON87429, mà đem lại cho tế bào, cây và hạt giống ngô mà bao gồm sự kiện này chống chịu với chất ức chế acetyl CoA carboxylaza (ACCaza) trong nhóm aryloxyphenoxy propionat (FOP) như quizalofop và haloxyfop; auxin tổng hợp như dicamba và 2,4-D; chất ức chế glutamin syntetaza như glufosinat; và chất ức chế 5-enolpyruvylshikimat-3-phosphat syntaza (EPSPS) glyphosat. Sự kiện ngô MON87429 chứa bốn băng biểu hiện. Như được sử dụng trong bản mô tả này, “băng biểu hiện” hoặc “băng” là phân tử ADN tái tổ hợp bao gồm dạng kết hợp của các yếu tố phân biệt mà sẽ được biểu hiện bởi tế bào được biến nạp. Bảng 1 đưa ra danh sách các phân tử có trong SEQ ID NO: 10 và như được minh họa trên Hình 2.

Bảng 1: Mô tả về sự kiện ngô MON87429

Yếu tố	Vị trí trong SEQ ID NO: 10	Mô tả
ADN kẹp 5'	1-1029	Trình tự ADN kẹp ở đầu mút 5' của đoạn chèn chuyển gen
Vùng biên trái	1030-1288	Vùng ADN từ <i>Agrobacterium tumefaciens</i> chứa trình tự biên trái
Trình tự xen giữa	1289-1359	Trình tự được sử dụng trong việc tạo dòng vô tính ADN
P- <i>Ea.ubq</i>	1360-3541	Đoạn khởi đầu, 5' UTR và các trình tự intron của gen ubiquitin từ <i>Erianthus ravennae</i>
Trình tự xen giữa	3542-3546	Trình tự được sử dụng trong việc tạo dòng vô tính ADN
CS- <i>Sv.pat</i>	3547-4098	Trình tự mã hóa cho protein phosphinothricin N-acetyltransferaza (PAT)
T- <i>Si.fba</i>	4099-4475	Trình tự 3' UTR của gen <i>fructoza-bisphosphat aldolaza</i> từ <i>Setaria italica</i>
Trình tự xen giữa	4476-4537	Trình tự được sử dụng trong việc tạo dòng vô tính ADN
P- <i>Clj.ubq</i>	4538-6463	Đoạn khởi đầu, 5' UTR, và các trình tự intron của gen ubiquitin từ <i>Coix lacryma-jobi</i>
Trình tự xen giữa	6464-6473	Trình tự được sử dụng trong việc tạo dòng vô tính ADN
TS- <i>At.apg6</i>	6474-6677	Trình tự hướng đích codon được tối ưu hóa của gen <i>bạch tạng</i> và <i>xanh lục nhạt 6</i> từ <i>Arabidopsis thaliana</i>
CS- <i>Sm.dmo</i>	6678-7700	Trình tự mã hóa cho protein dicamba monooxygenaza (DMO)
Trình tự xen giữa	7701-7708	Trình tự được sử dụng trong việc tạo dòng vô tính ADN

T- <i>Os.mt</i>	7709-8008	Trình tự 3' UTR của protein giống metallothionein từ <i>Oryza sativa</i>
Trình tự xen giữa	8009-8016	Trình tự được sử dụng trong việc tạo dòng vô tính ADN
P- <i>Ad.ubq</i>	8017-9973	Đoạn khởi đầu, 5' UTR, và các trình tự intron của gen <i>ubiquitin</i> từ <i>Arundo donax</i>
Trình tự xen giữa	9974-9986	Trình tự được sử dụng trong việc tạo dòng vô tính ADN
TS- <i>At.mdh</i>	9987-10229	Trình tự của peptit chuyển tiếp của gen <i>malat dehydrogenaza</i> từ <i>Arabidopsis thaliana</i>
CS- <i>Sh.ft_t</i>	10230-11117	Trình tự mã hóa cho protein FT_T
Trình tự xen giữa	11118-11132	Trình tự được sử dụng trong việc tạo dòng vô tính ADN
T- <i>Os.nam</i>	11133-11649	Trình tự 3' UTR của protein mô phân sinh không đỉnh từ <i>Oryza sativa</i>
Trình tự xen giữa	11650-11655	Trình tự được sử dụng trong việc tạo dòng vô tính ADN
P- <i>CaMV.35S</i>	11656-11979	Đoạn khởi đầu và đoạn dẫn đầu từ ARN 35S của virus khảm súp lơ
Trình tự xen giữa	11980-12001	Trình tự được sử dụng trong việc tạo dòng vô tính ADN
L- <i>Ta.cab</i>	12002-12062	Trình tự đoạn dẫn đầu UTR 5' từ protein liên kết chất diệt lục a/b của <i>Triticum aestivum</i>
Trình tự xen giữa	12063-12078	Trình tự được sử dụng trong việc tạo dòng vô tính ADN
I- <i>Os.ract1</i>	12079-12558	Trình tự intron và UTR của protein Actin 1 từ <i>Oryza sativa</i>
Trình tự xen giữa	12559-12567	Trình tự được sử dụng trong việc tạo dòng vô tính ADN
TS- <i>At.CTP2</i>	12568-12795	Trình tự peptit chuyển tiếp của gen <i>ShkG</i> từ <i>Arabidopsis thaliana</i>

CS- <i>cp4epsps</i>	12796-14163	Trình tự mã hóa cho protein 5-enolpyruvylshikimat-3-phosphat syntaza (CP4-EPSPS)
Trình tự xen giữa	14164-14169	Trình tự được sử dụng trong việc tạo dòng vô tính ADN
mts-ARN cản trở nhỏ	14170-14370	Trình tự của đích ARN cản trở nhỏ đặc hiệu với mô đực
Trình tự xen giữa	14371-14378	Trình tự được sử dụng trong việc tạo dòng vô tính ADN
T- <i>Os.grp3</i>	14379-14989	Trình tự 3' UTR của gen protein liên kết với ARN giàu glyxin (<i>Grp3</i>) từ <i>Oryza sativa</i>
Trình tự xen giữa	14990-15030	Trình tự được sử dụng trong việc tạo dòng vô tính ADN
Vùng biên phải	15031-15037	Vùng ADN từ <i>Agrobacterium tumefaciens</i> chứa trình tự biên phải
ADN kẹp 3'	15038-16068	ADN kẹp

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “tái tổ hợp”, được dùng để chỉ ADN, protein hoặc sinh vật phi tự nhiên thường không được tìm thấy trong tự nhiên và được tạo ra bởi sự can thiệp của con người. Như được sử dụng trong bản mô tả này, “phân tử ADN tái tổ hợp” là phân tử ADN bao gồm dạng kết hợp của các phân tử ADN mà không có trong tự nhiên cùng nhau và là kết quả của sự can thiệp của con người, ví dụ, phân tử ADN bao gồm ít nhất hai phân tử ADN khác nguồn gốc với nhau, như phân tử ADN bao gồm gen chuyển và ADN hệ gen thực vật liền kề với gen chuyển. Một ví dụ về phân tử ADN tái tổ hợp là phân tử ADN bao gồm ít nhất một trình tự được chọn từ SEQ ID NO: 1-10. Như được sử dụng trong bản mô tả này, “cây tái tổ hợp” là cây thường không tồn tại trong tự nhiên, là kết quả của sự can thiệp của con người và chứa phân tử ADN chuyển gen. Do sự thay đổi hệ gen như vậy, cây tái tổ hợp là một cái gì đó mới và khác biệt rõ rệt với loại cây hoang dại liên quan. Một ví dụ về cây tái tổ hợp là cây ngô bao gồm sự kiện ngô MON87429.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “chuyển gen” được dùng để chỉ phân tử ADN được kết hợp một cách nhân tạo vào hệ gen của sinh vật do sự can thiệp của con

người, như bằng phương pháp biến nạp thực vật. Gen chuyển có thể là khác nguồn gốc với sinh vật. Thuật ngữ “đoạn chèn gen chuyển” như được sử dụng trong bản mô tả này được dùng để chỉ ADN ngoại lai được chèn bằng các kỹ thuật biến nạp thực vật vào hệ gen của ngô để tạo ra sự kiện ngô MON87429. Trình tự của đoạn chèn chuyển gen của sự kiện ngô MON87429 được đề xuất ở dạng SEQ ID NO: 9. Thuật ngữ “chuyển gen” được dùng để chỉ việc bao gồm gen chuyển, ví dụ, “cây chuyển gen” được dùng để chỉ cây chứa gen chuyển.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “khác nguồn gốc” được dùng để chỉ phân tử thứ nhất thường không gắn liền với phân tử thứ hai hoặc một sinh vật trong tự nhiên. Ví dụ, một phân tử ADN có thể là từ một loài thứ nhất và được đưa vào hệ gen của loài thứ hai. Do đó, phân tử ADN thường khác nguồn gốc với hệ gen và sinh vật này.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “thể khảm” được dùng để chỉ phân tử ADN được tạo ra bằng cách dung hợp phân tử ADN thứ nhất với phân tử ADN thứ hai, trong đó cấu trúc ADN thứ nhất và thứ hai thường không được tìm thấy trong cấu hình đó dung hợp với cấu hình kia. Do đó, phân tử ADN thể khảm là phân tử ADN mới thường không được tìm thấy trong tự nhiên. Một ví dụ về phân tử ADN thể khảm là phân tử ADN bao gồm ít nhất một trình tự được chọn từ SEQ ID NO:1-10.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “được phân lập” được dùng để chỉ quá trình tách một phân tử khỏi các phân tử khác mà thường gắn liền với nó ở trạng thái tự nhiên hoặc nguyên thể. Do đó, thuật ngữ “được phân lập” có thể được dùng để chỉ phân tử ADN mà đã được tách khỏi (các) phân tử ADN khác mà nó gắn liền với ở trạng thái tự nhiên hoặc nguyên thể. Một phân tử ADN như vậy có thể có mặt ở trạng thái được tái tổ hợp, như phân tử ADN tái tổ hợp. Do đó, một phân tử ADN được loại bỏ khỏi trạng thái tự nhiên của nó và được dung hợp với một phân tử ADN khác mà nó thường không gắn liền với sẽ là phân tử ADN được phân lập. Một phân tử ADN được phân lập như vậy có thể là kết quả của việc sử dụng các kỹ thuật công nghệ sinh học, như tạo ADN tái tổ hợp hoặc tích hợp phân tử ADN ngoại lai vào nhiễm sắc thể của tế bào, thực vật hoặc hạt giống. Sáng chế đề xuất các phân tử ADN và trình tự ADN tương ứng của chúng. Như được sử dụng trong bản mô tả này, các thuật ngữ “ADN” và “phân tử ADN” được dùng để chỉ phân tử axit deoxyribonucleic (ADN). Phân tử ADN có thể có nguồn gốc hệ gen hoặc tổng hợp và theo quy ước từ đầu mút 5' (phía đầu nguồn) đến đầu mút 3' (phía cuối nguồn). Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “trình tự ADN” được dùng để chỉ trình tự

nucleotit của phân tử ADN. Danh pháp được sử dụng là danh pháp theo yêu cầu của Chuẩn luật 37 của Bộ Quy định Liên bang Hoa Kỳ tại mục 1.822 và được nêu trong các bảng trong Tiêu chuẩn WIPO ST.25 (1998), Phụ lục 2, Bảng 1 và 3. Theo quy ước, các trình tự ADN theo sáng chế và các mảnh của chúng được bộc lộ liên quan đến chỉ một dải của hai dải trình tự ADN bổ trợ. Theo ngụ ý và chủ định, các trình tự bổ trợ của các trình tự được đề xuất ở đây (các trình tự của dải bổ trợ), còn được gọi trong lĩnh vực kỹ thuật này là các trình tự bổ trợ ngược, là nằm trong phạm vi của sáng chế và được dự định rõ ràng trong phạm vi của đối tượng được yêu cầu bảo hộ. Do đó, như được sử dụng trong bản mô tả này, các phần đề cập đến SEQ ID NO: 1-10 và các mảnh của chúng bao gồm và được dùng để chỉ trình tự của dải bổ trợ và các mảnh của chúng.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “mảnh” được dùng để chỉ một miếng nhỏ hơn trong số toàn bộ. Ví dụ, các mảnh SEQ ID NO: 10 sẽ bao gồm các trình tự là ít nhất khoảng 10 nucleotit liên tiếp, ít nhất khoảng 11 nucleotit liên tiếp, ít nhất khoảng 12 nucleotit liên tiếp, ít nhất khoảng 13 nucleotit liên tiếp, ít nhất khoảng 14 nucleotit liên tiếp, ít nhất khoảng 15 nucleotit liên tiếp, ít nhất khoảng 16 nucleotit liên tiếp, ít nhất khoảng 17 nucleotit liên tiếp, ít nhất khoảng 18 nucleotit liên tiếp, ít nhất khoảng 19 nucleotit liên tiếp, ít nhất khoảng 20 nucleotit liên tiếp, ít nhất khoảng 25 nucleotit liên tiếp, tại ít nhất khoảng 30 nucleotit liên tiếp, ít nhất khoảng 35 nucleotit liên tiếp, ít nhất khoảng 40 nucleotit liên tiếp, ít nhất khoảng 45 nucleotit liên tiếp, ít nhất khoảng 50 nucleotit liên tiếp, ít nhất khoảng 60 nucleotit liên tiếp, ít nhất khoảng 70 nucleotit liên tiếp, ít nhất khoảng 80 nucleotit liên tiếp, ít nhất khoảng 90 nucleotit liên tiếp, hoặc ít nhất khoảng 100 nucleotit liên tiếp của trình tự SEQ ID NO: 10 hoàn chỉnh.

Trình tự ADN của đoạn chèn chuyển gen của sự kiện ngô MON87429 được đề xuất ở dạng SEQ ID NO: 9. Trình tự ADN của đoạn chèn chuyển gen và ADN hệ gen của ngô kẹp mỗi bên của đoạn chèn chuyển gen được đề xuất ở dạng SEQ ID NO: 10. Các trình tự ADN của một phần của ADN kẹp và đầu mút 5' của đoạn chèn chuyển gen được đề xuất ở dạng SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 và SEQ ID NO: 7. Trình tự ADN của một phần của ADN kẹp và đầu mút 3' của đoạn chèn chuyển gen được đề xuất ở dạng SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 và SEQ ID NO: 8.

Trình tự ADN của vùng trải dài qua phần kết nối bằng liên kết phosphodiester của một đầu mút của đoạn chèn chuyển gen với ADN hệ gen ngô kẹp được gọi trong bản mô tả này là “điểm nối”. Điểm nối là điểm kết nối của ADN chuyển gen và ADN kẹp ở dạng một phân

từ liên tiếp. Một điểm nối được tìm thấy ở đầu mút 5' của đoạn chèn chuyển gen và điểm nối kia được tìm thấy ở đầu mút 3' của đoạn chèn chuyển gen, lần lượt được gọi trong bản mô tả này là điểm nối 5' và 3'. “Trình tự nối” được dùng để chỉ trình tự ADN có độ dài bất kỳ trải dài qua điểm nối 5' hoặc 3' của sự kiện. Trình tự nối của sự kiện ngô MON87429 thì sáng tỏ đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật có sử dụng SEQ ID NO: 10. Các ví dụ về trình tự nối của sự kiện ngô MON87429 được đề xuất ở dạng SEQ ID NO: 1-8. Hình 1 minh họa dạng sắp xếp vật lý của SEQ ID NO: 1-10 được sắp xếp từ 5' đến 3'. Các trình tự nối của sự kiện ngô MON87429 có thể có mặt ở dạng một phần của hệ gen của cây, hạt hoặc tế bào bao gồm sự kiện ngô MON87429. Việc nhận diện một hoặc nhiều SEQ ID NO bất kỳ trong số SEQ ID NO: 1-8 hoặc 10 trong mẫu từ cây, bộ phận của cây, hạt giống hoặc tế bào biểu lộ rằng ADN là thu được từ ngô bao gồm sự kiện ngô MON87429 và có tính chẩn đoán về sự có mặt của sự kiện ngô MON87429.

Cây, hạt giống, tế bào, bộ phận của cây và các sản phẩm hàng hóa theo sáng chế có thể được sử dụng để phát hiện ADN hoặc các phân tử protein có tính chỉ báo về sự có mặt của sự kiện ngô MON87429. Sáng chế đề xuất các phân tử ADN làm ví dụ mà có thể được sử dụng làm đoạn mồi hoặc đoạn dò để phát hiện sự có mặt của sự kiện ngô MON87429 trong mẫu. Các đoạn mồi hoặc đoạn dò như vậy là đặc hiệu với trình tự axit nucleic đích và như vậy rất hữu ích cho việc nhận diện sự kiện ngô MON87429 bằng các phương pháp được mô tả ở đây. Việc phát hiện sự có mặt của sự kiện ngô MON87429 có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, như khuếch đại nhiệt axit nucleic hoặc kỹ thuật lai tạo axit nucleic (như phương pháp thẩm tách phương bắc và phân tích phương nam).

“Đoạn mồi” là phân tử ADN được thiết kế để sử dụng trong phương pháp bắt cặp mồi hoặc lai tạo có liên quan đến phản ứng khuếch đại. Phản ứng khuếch đại là phản ứng *in vitro* khuếch đại ADN khuôn mẫu để tạo ra sản phẩm khuếch đại. Như được sử dụng trong bản mô tả này, “sản phẩm khuếch đại” là phân tử ADN đã được tổng hợp bằng cách sử dụng các kỹ thuật khuếch đại. Sản phẩm khuếch đại theo sáng chế có trình tự ADN bao gồm một hoặc nhiều SEQ ID NO trong số SEQ ID NO: 1-10 hoặc các mảnh của chúng. Cặp gồm các đoạn mồi có thể được sử dụng với ADN khuôn mẫu, như mẫu của ADN hệ gen ngô, trong phản ứng khuếch đại, như phản ứng chuỗi polymeraza (PCR), để tạo ra sản phẩm khuếch đại, trong đó sản phẩm khuếch đại này được tạo ra sẽ có trình tự ADN tương ứng với trình tự của ADN khuôn mẫu nằm giữa hai vị trí nơi mà các đoạn mồi được lai tạo với

khuôn mẫu. Đoạn mồi thường được thiết kế để lai tạo với dải ADN đích hỗ trợ để tạo thành sản phẩm lai giữa đoạn mồi và dải ADN đích. Sự có mặt của đoạn mồi là điểm nhận biết bởi polymeraza để bắt đầu mở rộng đoạn mồi bằng cách sử dụng làm khuôn mẫu dải ADN đích. Các cặp đoạn mồi được dùng để chỉ việc sử dụng hai đoạn mồi liên kết các dải đối bên của đoạn nucleotit có dải kép với mục đích khuếch đại đoạn nucleotit giữa chúng. Các ví dụ về trình tự đoạn mồi được đề xuất ở dạng SEQ ID NO: 11 (SQ51062) và SEQ ID NO: 12 (SQ51053). Cặp đoạn mồi được đề xuất ở dạng SEQ ID NO:11 và SEQ ID NO:12 là hữu ích trong vai trò là phân tử ADN thứ nhất và phân tử ADN thứ hai, trong đó phân tử ADN thứ nhất là mảnh của trình tự ADN đoạn chèn chuyển gen của SEQ ID NO:10 và phân tử ADN thứ hai là mảnh của trình tự ADN kẹp của SEQ ID NO:10, và mỗi trình tự có chiều dài đủ để hoạt động trong vai trò là đoạn mồi ADN khi được sử dụng cùng nhau trong phản ứng khuếch đại với ADN bao gồm sự kiện ngô MON87429 để tạo ra sản phẩm khuếch đại có tính chẩn đoán về sự kiện ngô MON87429 trong mẫu. Các cặp đoạn mồi theo sáng chế này theo các phương án nhất định cũng có thể được xác định là bao gồm phân tử ADN thứ nhất và thứ hai, trong đó phân tử ADN thứ nhất là mảnh của phân hệ gen ngô của SEQ ID NO:10 và phân tử ADN thứ hai là mảnh của phần gen chuyển của SEQ ID NO:10, và mỗi trình tự có chiều dài đủ để hoạt động trong vai trò là đoạn mồi ADN khi được sử dụng cùng nhau trong phản ứng khuếch đại với ADN bao gồm sự kiện ngô MON87429 để tạo ra sản phẩm khuếch đại có tính chẩn đoán về sự kiện ngô MON87429 trong mẫu.

“Đoạn dò” là phân tử axit nucleic mà hỗ trợ cho một dải của axit nucleic đích và hữu ích trong các phương pháp phát hiện lai tạo. Các đoạn dò theo sáng chế không chỉ bao gồm axit deoxyribonucleic hoặc ribonucleic mà còn cả polyamit và các vật liệu đoạn dò khác mà liên kết đặc hiệu với trình tự ADN đích và việc phát hiện liên kết như vậy có thể hữu ích trong việc phát hiện sự có mặt hoặc vắng mặt của trình tự ADN đích. Đoạn dò có thể được gắn kết vào chất đánh dấu hoặc phân tử chỉ thị có thể phát hiện được thông thường, như đồng vị phóng xạ, phốt pho, chất phát quang hóa học hoặc enzym. Một trình tự ADN làm ví dụ hữu ích trong vai trò là đoạn dò để phát hiện sự kiện ngô MON87429 được đề xuất ở dạng SEQ ID NO:13 (PB50370).

Các phương pháp để thiết kế và sử dụng đoạn mồi và đoạn dò thì đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các phân tử ADN bao gồm toàn bộ chiều dài hoặc các mảnh của SEQ ID NO:1-10 là hữu ích trong vai trò là đoạn mồi và đoạn dò để phát hiện sự kiện ngô MON87429 và

có thể được thiết kế dễ dàng bởi chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật có sử dụng trình tự được đề xuất trong bản mô tả này.

Đoạn dò và đoạn mồi theo sáng chế có thể có độ đồng nhất trình tự hoàn toàn với trình tự đích, mặc dù các đoạn mồi và đoạn dò khác biệt với trình tự đích mà giữ lại khả năng lai tạo một cách ưu tiên với trình tự đích có thể được thiết kế bằng các phương pháp thông thường. Để một phân tử axit nucleic đóng vai trò là đoạn mồi hoặc đoạn dò, phân tử này chỉ cần có tính bổ trợ đủ về trình tự để có thể tạo thành cấu trúc dải kép ổn định dưới nồng độ dung môi và muối cụ thể được sử dụng. Phương pháp lai tạo hoặc khuếch đại axit nucleic thông thường bất kỳ đều có thể được sử dụng để nhận diện sự có mặt của ADN chuyển gen từ sự kiện ngô MON87429 trong mẫu. Đoạn dò và đoạn mồi thường có chiều dài ít nhất khoảng 11 nucleotit, ít nhất khoảng 18 nucleotit, ít nhất khoảng 24 nucleotit, hoặc ít nhất khoảng 30 nucleotit hoặc dài hơn. Các đoạn dò và mồi như vậy lai tạo đặc hiệu với trình tự ADN đích trong các điều kiện lai tạo nghiêm ngặt. Các điều kiện nghiêm ngặt thông thường được mô tả bởi tài liệu: MR Green và J Sambrook, *Molecular cloning: a laboratory manual*, 4th Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2012). Như được sử dụng trong bản mô tả này, hai phân tử axit nucleic có khả năng lai tạo đặc hiệu với nhau nếu hai phân tử này có khả năng tạo thành cấu trúc axit nucleic dải kép đối song song. Một phân tử axit nucleic là “phần bổ trợ” của một phân tử axit nucleic khác nếu chúng thể hiện sự bổ trợ hoàn toàn. Như được sử dụng trong bản mô tả này, hai phân tử thể hiện “sự bổ trợ hoàn toàn”, nếu khi được xếp thẳng hàng, mọi nucleotit của phân tử thứ nhất sẽ bổ trợ cho mọi nucleotit của phân tử thứ hai. Hai phân tử là “bổ trợ tối thiểu” nếu chúng có thể lai tạo với nhau với độ ổn định đủ để cho phép chúng vẫn còn được bắt cặp mồi với nhau trong các điều kiện “nghiêm ngặt thấp” ít nhất là thông thường. Tương tự là, các phân tử là “bổ trợ” nếu chúng có thể lai tạo với nhau với độ ổn định đủ để cho phép chúng vẫn còn được bắt cặp mồi với nhau trong các điều kiện “nghiêm ngặt cao” thông thường. Do đó, các phân trệch khỏi sự bổ trợ hoàn toàn là được cho phép, miễn là các phân trệch như vậy không hoàn toàn loại trừ khả năng của các phân tử trong việc tạo thành cấu trúc dải kép.

Các điều kiện nghiêm ngặt thích hợp mà thúc đẩy quá trình lai tạo ADN, ví dụ, 6,0 x natri clorua/natri xitrat (SSC) ở khoảng 45°C, sau đó là rửa 2,0 x SSC ở 50°C, là đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này hoặc có thể được tìm thấy trong tài liệu: *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. Ví dụ, nồng

độ muối trong bước rửa có thể được chọn từ mức nghiêm ngặt thấp khoảng $2,0 \times \text{SSC}$ ở 50°C đến mức nghiêm ngặt cao khoảng $0,2 \times \text{SSC}$ ở 50°C . Ngoài ra, nhiệt độ trong bước rửa có thể tăng từ điều kiện nghiêm ngặt thấp ở nhiệt độ trong phòng, khoảng 22°C , đến điều kiện nghiêm ngặt cao ở khoảng 65°C . Cả nhiệt độ và muối có thể thay đổi, hoặc nhiệt độ hoặc nồng độ muối có thể được giữ không đổi trong khi biến khác được thay đổi.

Sáng chế đề xuất protein mà có thể được sử dụng để tạo ra các kháng thể dùng để phát hiện sự có mặt của sự kiện ngô MON87429 trong mẫu. Các kháng thể như vậy là đặc hiệu với một hoặc nhiều protein trong số các protein mà được mã hóa bởi sự kiện ngô MON87429. Trình tự ADN mã hóa các protein như vậy được đề xuất ở SEQ ID NO: 10 và các vị trí bắt đầu và vị trí kết thúc của trình tự mã hóa được biểu lộ trong Bảng 1. Trình tự ADN mã hóa mỗi protein và protein được mã hóa bởi trình tự này là hữu ích để tạo ra các kháng thể dùng để phát hiện sự có mặt của sự kiện ngô MON87429 bằng các phương pháp được mô tả ở đây. Việc phát hiện sự có mặt của sự kiện ngô MON87429 có thể được thực hiện bằng cách sử dụng kỹ thuật phát hiện protein bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, như thấm tách phương Tây, kết tủa miễn dịch, thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym (ELISA), gắn kết kháng thể vào chất đánh dấu hoặc phân tử chỉ thị có thể phát hiện được (như đồng vị phóng xạ, phốt pho, chất phát quang hóa học hoặc enzym) hoặc tác động enzym đối với phân tử chỉ thị. Một phương pháp cung cấp cho việc cho mẫu tiếp xúc với kháng thể mà liên kết với protein DMO, PAT, FT_T hoặc CP4-EPSPS được mã hóa bởi sự kiện ngô MON87429 và sau đó phát hiện sự có mặt hoặc vắng mặt của hiện tượng liên kết kháng thể. Hiện tượng liên kết kháng thể như vậy là có tính chẩn đoán về sự có mặt của một hoặc nhiều protein được mã hóa bởi sự kiện ngô MON87429.

Kit phát hiện protein và axit nucleic dùng để phát hiện sự có mặt của sự kiện ngô MON87429 được đề xuất. Các thay đổi trên các kit như vậy cũng có thể được phát triển bằng cách sử dụng các chế phẩm và phương pháp được bộc lộ trong bản mô tả này và các phương pháp đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật phát hiện protein và axit nucleic. Kit phát hiện protein và axit nucleic có thể được áp dụng cho các phương pháp nhân giống với cây bao gồm sự kiện ngô MON87429. Những kit như vậy chứa đoạn mồi hoặc đoạn dò bao gồm các mảnh của SEQ ID NO: 1-10 hoặc kháng thể đặc hiệu với protein được mã hóa bởi sự kiện ngô MON87429.

Một ví dụ về kit phát hiện bao gồm ít nhất một phân tử ADN có đủ độ dài các nucleotit liên tiếp của SEQ ID NO: 10 để hoạt động trong vai trò là đoạn dò ADN hữu ích để phát

hiện sự có mặt hoặc vắng mặt của sự kiện ngô MON87429 trong mẫu. Một phân tử ADN làm ví dụ đủ để sử dụng làm đoạn dò là một phân tử bao gồm trình tự được đề xuất ở dạng SEQ ID NO: 13. Các đoạn dò khác có thể được thiết kế dễ dàng bởi chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này. Một ví dụ khác về kit phát hiện bao gồm ít nhất một cặp đoạn mồi hữu ích để tạo ra sản phẩm khuếch đại hữu ích để phát hiện sự có mặt hoặc vắng mặt của sự kiện ngô MON87429 trong mẫu. Phương pháp như vậy cũng có thể bao gồm việc giải trình tự sản phẩm khuếch đại hoặc một mảnh của nó. Các phân tử ADN làm ví dụ đủ để sử dụng làm cặp đoạn mồi là các phân tử bao gồm các trình tự lần lượt được đề xuất ở dạng SEQ ID NO: 11 và SEQ ID NO: 12. Các cặp đoạn mồi khác có thể được thiết kế dễ dàng bởi chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này. Tùy ý, kit theo sáng chế cũng có thể bao gồm các chất phản ứng dùng để thực hiện các phản ứng phát hiện hoặc chẩn đoán được mô tả trong bản mô tả này. Một ví dụ khác về kit phát hiện bao gồm ít nhất một kháng thể đặc hiệu với ít nhất một protein được mã hóa bởi sự kiện ngô MON87429. Ví dụ, kit như vậy có thể sử dụng một dải dòng chảy bên bao gồm các chất phản ứng được hoạt hóa khi đầu của dải được tiếp xúc với dung dịch nước. Các protein làm ví dụ đủ để sử dụng trong sản xuất kháng thể là những protein được mã hóa bởi trình tự được đề xuất ở dạng SEQ ID NO: 10 hoặc mảnh bất kỳ của nó.

Sáng chế đề xuất cây, thể hệ con, hạt giống, tế bào và các bộ phận của cây ngô bao gồm sự kiện ngô MON87429 và các sản phẩm hàng hóa được sản xuất bằng cách sử dụng chúng. Cây, thể hệ con, hạt giống, tế bào, bộ phận của cây và các sản phẩm hàng hóa theo sáng chế chứa một lượng ADN có thể phát hiện được có ít nhất một trong các trình tự được đề xuất ở dạng SEQ ID NO: 1-8 và SEQ ID NO: 10.

Cây, thể hệ con, hạt giống, tế bào và các bộ phận của cây theo sáng chế cũng có thể chứa một hoặc nhiều tính trạng chuyển gen bổ sung, đặc biệt là các tính trạng được đưa vào bằng cách lai cây ngô bao gồm sự kiện ngô MON87429 với một cây khác chứa (các) tính trạng chuyển gen bổ sung. Những tính trạng như vậy bao gồm, nhưng không giới hạn ở khả năng chống côn trùng tăng, hiệu quả sử dụng nước tăng, năng suất tăng, khả năng chịu hạn tăng, chất lượng hạt giống tăng, chất lượng dinh dưỡng được cải thiện, sản xuất hạt lai và/hoặc khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ tăng, trong đó tính trạng được đo so với cây ngô thiếu tính trạng chuyển gen như vậy.

Cây theo sáng chế có thể được sử dụng để tạo ra thể hệ con bao gồm sự kiện ngô MON87429. Như được sử dụng trong bản mô tả này, “thể hệ con” bao gồm loại cây, hạt

giống và tế bào bất kỳ bao gồm sự kiện ngô MON87429 được thừa hưởng từ một cây tổ tiên, được biểu lộ bởi cây chứa phân tử ADN có ít nhất một trình tự được chọn từ SEQ ID NO: 1-8 và SEQ ID NO: 10. Cây, hạt giống và tế bào có thể là đồng hợp tử hoặc dị hợp tử đối với sự kiện ngô MON87429. Cây thế hệ con có thể được trồng từ hạt được tạo ra bằng cây ngô bao gồm sự kiện ngô MON87429 hoặc từ hạt được tạo ra bằng cây ngô được thụ phấn bằng phấn hoa bao gồm sự kiện ngô MON87429.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, “bộ phận của cây” theo sáng chế là bộ phận bất kỳ từ cây bao gồm sự kiện ngô MON87429. Các bộ phận của cây bao gồm, nhưng không giới hạn ở các mẫu mô, phấn hoa, noãn, vỏ, hoa, rễ, thân, sợi và lá còn nguyên hoặc một phần. Các bộ phận của cây có thể là sống được hoặc không thể sống được.

Sáng chế đề xuất sản phẩm hàng hóa mà được sản xuất từ cây bao gồm sự kiện ngô MON87429. Các sản phẩm hàng hóa theo sáng chế chứa một lượng ADN có thể phát hiện được bao gồm trình tự ADN được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 1-10. Như được sử dụng trong bản mô tả này, “sản phẩm hàng hóa” được dùng để chỉ chế phẩm hoặc sản phẩm bất kỳ bao gồm nguyên liệu từ cây, hạt giống, tế bào hoặc bộ phận của cây bao gồm sự kiện ngô MON87429. Các sản phẩm hàng hóa bao gồm, nhưng không giới hạn ở hạt giống, hạt, bộ phận của cây và bột xay thô. Một sản phẩm hàng hóa theo sáng chế sẽ chứa một lượng ADN có thể phát hiện được tương ứng với sự kiện ngô MON87429. Việc phát hiện một hoặc nhiều ADN trong số ADN này trong mẫu có thể được sử dụng để xác định hàm lượng hoặc nguồn gốc của sản phẩm hàng hóa. Có thể sử dụng phương pháp phát hiện tiêu chuẩn bất kỳ dùng cho các phân tử ADN, bao gồm các phương pháp phát hiện được bộc lộ trong bản mô tả này.

Sự kiện ngô MON87429 chứa bốn băng biểu hiện mà cùng nhau đem lại khả năng chống chịu các chất ức chế axetyl CoA carboxylaza (ACCaza) trong nhóm aryloxyphenoxy propionat (FOP); auxin tổng hợp; các chất ức chế glutamin syntetaza; và các chất ức chế 5-enolpyruvylshikimat-3-phosphat syntaza (EPSPS).

Như được sử dụng trong bản mô tả này, các chất ức chế axetyl CoA carboxylaza (ACCaza) trong nhóm aryloxyphenoxy propionat (FOP) (được gọi là (các) thuốc diệt cỏ FOP), bao gồm, nhưng không giới hạn ở, clodinafop, clodinafop-etyl, clodinafop-propargyl, cyhalofop, cyhalofop-butyl, diclofop, diclofop-metyl, diclofop-P, diclofop-P-metyl, fenoxaprop, fenoxaprop-P, fenoxaprop-P-etyl, fenthiaprop, fluazifop, fluazifop-butyl, fluazifop-P, fluazifop-P-butyl, fluroxypyr, haloxyfop, haloxyfop.etyl, haloxyfop-metyl,

haloxyfop-P, haloxyfop-P-metyl, isoxapyrifop, metamifop, propaquizafop, quizalofop, quizalafop-etyl, quizalofop-P, quizalafop-P-etyl, quizalafop-P-tefuryl và trifop.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, các auxin tổng hợp bao gồm, nhưng không giới hạn ở thuốc diệt cỏ axit benzoic, thuốc diệt cỏ axit phenoxy, thuốc diệt cỏ arylpicolinat và thuốc diệt cỏ axit pyridinyloxy. Các ví dụ về thuốc diệt cỏ axit benzoic bao gồm, nhưng không giới hạn ở dicamba (axit 3,6-diclo-2-metoxibenzoic), muối dicamba, dicamba-butotyl, muối dicamba-diglycolamin, dicamba-dimethylamoni, dicamba-dietanolamoni, dicamba-isopropylamoni, dicamba-kali, dicamba-natri và dicamba-trolamin. Các ví dụ về thuốc diệt cỏ axit phenoxy là 2,4-D (axit 2,4-diclophenoxyaxetic), 2,4-D-butotyl, 2,4-D-butyl, 2,4-D-cholin, 2,4-D- dimethylamoni, 2,4-D-diolamin, 2,4-D-etyl, 2,4-D-2-etylhexyl, 2,4-D-isobutyl, 2,4-D-isotyl, 2,4-D-isopropyl, 2,4-D-isopropylamoni, 2,4-D-kali, 2,4-D-natri, 2,4-D-triisopropanolamoni, 2,4-D-trolamin, clomeprop, dichlorprop, fenoprop, MCPA, MCPA-butotyl, MCPA-dimethylamoni, MCPA-2-etylhexyl. MCPA-isopropylamoni, MCPA-kali, MCPA-natri, MCPA-thioetyl, 2,4-DB, MCPB, MCPB-metyl, MCPB-etyl-natri và mecoprop. Các ví dụ về thuốc diệt cỏ arylpicolinat là halauxifen, halauxifen-metyl và florypyrauxifen-benzyl. Các ví dụ về thuốc diệt cỏ axit pyridinyloxy là triclopyr, fluroxypyr, aminopyralid, clopyralid và picloram.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, các chất ức chế glutamin syntetaza bao gồm, nhưng không giới hạn ở, phosphinothricin, glufosinat, muối glufosinat, glufosinat-amoni, glufosinat-natri, glufosinat-P, L-glufosinat-amoni và L-glufosinat-natri.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, các chất ức chế 5-enolpyruvylshikimat-3-phosphat syntaza (EPSPS) bao gồm, nhưng không giới hạn ở, glyphosat, muối glyphosat, glyphosat-isopropylamoni, glyphosat-amoni, glyphosat-dimethylamoni, glyphosat-trimesi (=sulfosat), glyphosat-diamoni, glyphosate-kali và glyphosat-natri.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, “chống chịu thuốc diệt cỏ” hoặc “khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ” hoặc “khả năng chống chịu” có nghĩa là khả năng không bị ảnh hưởng hoàn toàn hoặc một phần bởi sự có mặt hoặc áp dụng một hoặc nhiều (các) thuốc diệt cỏ, ví dụ, để chống lại tác dụng độc hại của thuốc diệt cỏ khi được áp dụng. Tế bào, hạt giống, hoặc cây là “chống chịu thuốc diệt cỏ” hoặc có “khả năng chống chịu được cải thiện” nếu nó có thể duy trì ít nhất một số sự tăng trưởng hoặc kiểu hình bình thường khi có mặt một hoặc nhiều (các) thuốc diệt cỏ. Một tính trạng là tính trạng chống chịu thuốc diệt cỏ nếu sự có mặt của nó có thể đem lại khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ cải thiện đối với tế bào,

cây hoặc hạt giống so với tế bào, cây hoặc hạt giống loại hoang dại hoặc đối chứng. Cây trồng chứa tính trạng chống chịu thuốc diệt cỏ có thể tiếp tục tăng trưởng với sự có mặt của thuốc diệt cỏ và có thể bị ảnh hưởng tối thiểu bởi sự có mặt của thuốc diệt cỏ. Một protein đem lại “khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ” nếu quá trình biểu hiện của protein này có thể đem lại khả năng chống chịu với thuốc diệt cỏ được cải thiện đối với tế bào, cây hoặc hạt giống so với tế bào, cây hoặc hạt giống loại hoang dại hoặc đối chứng. Các ví dụ về protein chống chịu thuốc diệt cỏ là trình tự mã hóa phosphinothricin N-acetyltransferaza, trình tự mã hóa dicamba monooxygenaza, protein FT_T và trình tự mã hóa 5-enolpyruvylshikimat-3-phosphat syntaza chống chịu glyphosat từ *Agrobacterium sp* chủng CP4. Khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ có thể là tính không nhạy cảm hoàn toàn hoặc một phần với một loại thuốc diệt cỏ cụ thể và có thể được thể hiện ở dạng độ chống chịu hoặc không nhạy cảm tính theo phần trăm (%) với một loại thuốc diệt cỏ cụ thể.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, “cỏ dại” là loại cây không mong muốn bất kỳ. Một loại cây có thể được coi là không mong muốn vì mục đích nông nghiệp hoặc làm vườn (ví dụ, loài *Amaranthus*) hoặc có thể được coi là không mong muốn trong một tình huống cụ thể (ví dụ, cây trồng thuộc một loài trên cánh đồng của một loài khác, còn được gọi là cây mọc dại). Cỏ dại thường đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và thay đổi theo địa lý, mùa, môi trường tăng trưởng và thời gian. Danh sách các loài cỏ dại thì có sẵn từ các hiệp hội và nỗ lực khoa học và nông nghiệp (như Hiệp hội Khoa học về Cỏ dại Hoa Kỳ, Hiệp hội Khoa học về Cỏ dại Canada, Hiệp hội Khoa học về Cỏ dại Brazil, Hiệp hội Khoa học về Cỏ dại Quốc tế và Khảo sát Quốc tế về Cỏ dại Kháng Thuốc Diệt cỏ), các cơ quan chính phủ (như Bộ Nông nghiệp Hoa Kỳ và Bộ Môi trường và Năng lượng Úc), và các hiệp hội công nghiệp và nông dân (như Hiệp hội Người Trồng Ngô Quốc gia).

Sáng chế đề xuất các phương pháp kiểm soát cỏ dại trong một khu vực trồng ngô bằng cách áp dụng ít nhất một loại thuốc diệt cỏ được chọn từ nhóm gồm (i) chất ức chế axetyl CoA carboxylaza (ACCase) trong nhóm aryloxyphenoxy propionat (FOP) như quizalofop và haloxyfop; (ii) các auxin tổng hợp như dicamba và 2,4-D; (iii) các chất ức chế glutamin syntetaza như glufosinat; và (iv) chất ức chế 5-enolpyruvylshikimat-3-phosphat syntaza (EPSPS) glyphosat, trong đó hạt giống hoặc cây bao gồm sự kiện ngô MON87429 được trồng trong khu vực này trước, tại thời điểm hoặc sau khi áp dụng thuốc diệt cỏ và việc áp dụng thuốc diệt cỏ ức chế hoặc ngăn ngừa sự tăng trưởng của cỏ dại và không làm tổn thương cây ngô. Khu vực tăng trưởng của cây có thể có hoặc có thể không có cây cỏ dại

tại thời điểm áp dụng thuốc diệt cỏ. (Các) thuốc diệt cỏ được sử dụng trong các phương pháp theo sáng chế có thể được áp dụng một mình hoặc kết hợp với một hoặc nhiều (các) thuốc diệt cỏ trong mùa trồng trọt. (Các) thuốc diệt cỏ được sử dụng trong các phương pháp theo sáng chế có thể được áp dụng kết hợp với một hoặc nhiều (các) thuốc diệt cỏ theo thời gian (ví dụ, như hỗn hợp bể chứa hoặc trong các lần áp dụng tuần tự), theo không gian (ví dụ, tại các thời điểm khác nhau trong suốt mùa trồng trọt bao gồm cả trước và sau khi gieo hạt ngô), hoặc cả hai. Ví dụ, sáng chế đề xuất phương pháp kiểm soát cỏ dại bao gồm gieo hạt bao gồm sự kiện ngô MON87429 trong một khu vực và áp dụng một lượng hữu hiệu diệt cỏ trong mùa trồng trọt của một hoặc nhiều thuốc diệt cỏ trong số thuốc diệt cỏ dicamba, glufosinat, glyphosat, 2,4-D, hoặc FOP, một mình hoặc ở dạng kết hợp bất kỳ với một loại thuốc diệt cỏ khác, với mục đích kiểm soát cỏ dại trong khu vực mà không làm tổn thương các cây bao gồm sự kiện ngô MON87429. Việc sử dụng (các) thuốc diệt cỏ như vậy có thể là trước khi trồng (thời điểm bất kỳ trước khi gieo hạt bao gồm sự kiện ngô MON87429, bao gồm cả vì mục đích đốt trụi, đó là áp dụng cho cỏ dại mới mọc hoặc hiện có trước khi trồng hạt giống), trước khi mọc (thời điểm bất kỳ sau khi hạt giống bao gồm sự kiện ngô MON87429 được gieo và trước khi cây bao gồm sự kiện ngô MON87429 mọc), hoặc sau khi mọc (thời điểm bất kỳ sau khi cây bao gồm sự kiện ngô MON87429 mọc). Nhiều lần áp dụng một hoặc nhiều loại thuốc diệt cỏ, hoặc dạng kết hợp của thuốc diệt cỏ cùng nhau hoặc riêng biệt, có thể được sử dụng trong mùa trồng trọt, ví dụ, hai lần áp dụng (như áp dụng trước khi trồng và áp dụng sau khi mọc hoặc áp dụng trước khi mọc và áp dụng sau khi mọc) hoặc ba lần áp dụng trở lên (như một lần áp dụng trước khi trồng và hai lần áp dụng sau khi mọc).

Việc áp dụng thuốc diệt cỏ trong thực hành các phương pháp theo sáng chế có thể là ở tỷ lệ thương mại được khuyến nghị hoặc phân số hoặc bội số bất kỳ của chúng, như gấp đôi tỷ lệ thương mại được khuyến nghị. Tỷ lệ thuốc diệt cỏ có thể được thể hiện ở dạng đương lượng axit cho mỗi pao trên một mẫu Anh (pao đương lượng axit/mẫu Anh) hoặc thành phần có hoạt tính cho mỗi pao trên mỗi mẫu Anh (pao thành phần có hoạt tính/mẫu Anh), tùy thuộc vào thuốc diệt cỏ và dạng chế phẩm. Lượng áp dụng thuốc diệt cỏ có thể là tỷ lệ thương mại được khuyến nghị hoặc một phân số hoặc bội số của chúng. Việc sử dụng mẫu Anh trong tỷ lệ áp dụng thuốc diệt cỏ như được đề xuất trong bản mô tả này chỉ mang tính chất hướng dẫn; tỷ lệ áp dụng thuốc diệt cỏ với liều lượng tương đương với tỷ lệ bất kỳ được đề xuất trong bản mô tả này có thể được sử dụng cho các diện tích lớn hơn hoặc nhỏ

hơn một mẫu Anh. Việc áp dụng thuốc diệt cỏ bao gồm ít nhất một thuốc diệt cỏ được chọn từ nhóm gồm (i) chất ức chế axetyl CoA carboxylaza (ACCaza) trong nhóm aryloxyphenoxy propionat (FOP) như quizalofop và haloxyfop; (ii) auxin tổng hợp như dicamba và 2,4-D; (iii) chất ức chế glutamin syntetaza như glufosinat; và (iv) chất ức chế 5-enolpyruvylshikimat-3-phosphat syntaza (EPSPS) glyphosat. Khu vực tăng trưởng của cây có thể có hoặc có thể không có cây cỏ dại tại thời điểm áp dụng thuốc diệt cỏ. Lượng hữu hiệu diệt cỏ của thuốc diệt cỏ FOP để sử dụng trong khu vực để kiểm soát cỏ dại nên gồm khoảng từ 0,01 pao (0,005kg) thành phần có hoạt tính/mẫu Anh đến khoảng 1,0 pao (0,5kg) thành phần có hoạt tính/mẫu Anh trong mùa trồng trọt (ví dụ, quizalofop có thể được áp dụng theo tỷ lệ từ khoảng 0,034 pao (0,017kg) thành phần có hoạt tính/mẫu Anh đến khoảng 0,083 pao (0,0415kg) thành phần có hoạt tính/mẫu Anh và haloxyfop có thể được áp dụng với tỷ lệ khoảng 0,018 pao (0,009kg) thành phần có hoạt tính/mẫu Anh đến khoảng 0,07 pao (0,035kg) thành phần có hoạt tính/mẫu Anh). Lượng hữu hiệu diệt cỏ của thuốc diệt cỏ auxin tổng hợp axit phenoxy để sử dụng trong khu vực để kiểm soát cỏ dại cần phải gồm khoảng từ khoảng 0,1 pao (0,05kg) đương lượng axit/mẫu Anh đến khoảng 10 pao (5kg) đương lượng axit/mẫu Anh trong mùa trồng trọt (ví dụ, 2,4-D có thể được áp dụng với tỷ lệ là khoảng 0,75 pao (0,375kg) đương lượng axit/mẫu Anh đến 1,0 pao (0,5kg) đương lượng axit/mẫu Anh). Lượng hữu hiệu diệt cỏ của thuốc diệt cỏ auxin tổng hợp axit pyridinyloxy để sử dụng trong khu vực để kiểm soát cỏ dại cần phải gồm khoảng từ khoảng 0,05 pao (0,025kg) đương lượng axit/mẫu Anh đến khoảng 5,0 pao (2,5kg) đương lượng axit/mẫu Anh trong mùa trồng trọt (ví dụ, fluroxypyr có thể được áp dụng với tỷ lệ là khoảng 0,14 pao (0,07kg) đương lượng axit/mẫu Anh đến khoảng 0,49 pao (0,245kg) đương lượng axit/mẫu Anh). Lượng hữu hiệu diệt cỏ của thuốc diệt cỏ auxin tổng hợp axit benzoic để sử dụng trong khu vực để kiểm soát cỏ dại cần phải gồm khoảng từ khoảng 0,1 pao (0,05kg) đương lượng axit/mẫu Anh đến mức nhiều đến tận khoảng 16 pao (8kg) đương lượng axit/mẫu Anh trong mùa trồng trọt (ví dụ, dicamba có thể được áp dụng với tỷ lệ là khoảng 0,5 pao (0,25kg) đương lượng axit/mẫu Anh đến khoảng 2,0 pao (1,0kg) đương lượng axit/mẫu Anh). Lượng hữu hiệu diệt cỏ của chất ức chế glutamin syntetaza để sử dụng trong khu vực để kiểm soát cỏ dại cần phải gồm khoảng từ khoảng 0,1 pao (0,05kg) đương lượng axit/mẫu Anh đến mức nhiều đến tận khoảng 10 pao (5kg) đương lượng axit/mẫu Anh trong mùa trồng trọt (ví dụ, glufosinat có thể được áp dụng với tỷ lệ là khoảng 0,4 pao (0,2kg) thành phần có hoạt tính/mẫu Anh đến khoảng 1,59 pao (0,795kg)

thành phần có hoạt tính/mẫu Anh). Lượng hữu hiệu diệt cỏ của chất ức chế EPSPS để sử dụng trong khu vực để kiểm soát cỏ dại cần phải gồm khoảng từ khoảng 0,5 pao (0,25kg) đương lượng axit/mẫu Anh đến khoảng 12 pao (6kg) đương lượng axit/mẫu Anh trong mùa trồng trọt (ví dụ, glyphosat có thể được áp dụng với tỷ lệ là khoảng 0,75 pao (0,375kg) đương lượng axit/mẫu Anh đến khoảng 2,25 pao (1,125kg) đương lượng axit/mẫu Anh).

Sáng chế đề xuất phương pháp kiểm soát ngô mọc dại bao gồm sự kiện ngô MON87429 trong khu vực trồng cây bằng cách áp dụng lượng hữu hiệu diệt cỏ của ít nhất một thuốc diệt cỏ xyclohexandion (DIM), như clethodim, sethoxydim và tralkoxydim, trong đó việc áp dụng thuốc diệt cỏ ngăn ngừa sự tăng trưởng của ngô bao gồm sự kiện ngô MON87429.

Lượng hữu hiệu diệt cỏ của thuốc diệt cỏ DIM để sử dụng trong khu vực để kiểm soát ngô mọc dại có thể được áp dụng với tỷ lệ là khoảng 0,03 pao (0,015kg) thành phần có hoạt tính/mẫu Anh đến khoảng 2,75 pao (1,675kg) thành phần có hoạt tính/mẫu Anh trong mùa trồng trọt (ví dụ, clethodim có thể được áp dụng từ khoảng 0,0625 pao (0,03125kg) thành phần có hoạt tính/mẫu Anh đến khoảng 0,125 pao (0,0625kg) thành phần có hoạt tính/mẫu Anh và sethoxydim có thể được áp dụng từ khoảng 0,188 pao (0,094kg) thành phần có hoạt tính/mẫu Anh đến 0,281 pao (0,1405kg) thành phần có hoạt tính/mẫu Anh).

Phương pháp sản xuất cây và hạt giống bao gồm sự kiện ngô MON87429 được đề xuất. Cây có thể được nhân giống bằng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, có thể tìm thấy các phần mô tả về phương pháp nhân giống thường được sử dụng trong tài liệu: WR Fehr, trong *Breeding Methods for Cultivar Development*, Wilcox J. ed., American Society of Agronomy, Madison WI (1987). Cây có thể tự thụ phấn (còn gọi là “tự nhân giống”) hoặc thụ phấn chéo (còn được gọi là “lai tạo”). Cây bao gồm sự kiện ngô MON87429 có thể tự thụ phấn để tạo ra dòng nhân giống thuần của cây đồng hợp tử đối với sự kiện ngô MON87429. Quá trình tự nhân giống đem lại thế hệ con được gọi là “con lai họ gần” và có thể được sử dụng để tạo ra các dòng con lai họ gần mà đồng nhất về mặt di truyền. Theo cách khác, cây bao gồm sự kiện ngô MON87429 có thể được thụ phấn chéo (được nhân giống với một cây khác mà chuyển gen hoặc không chuyển gen) để tạo ra hạt giống cùng giống hoặc hạt giống lai. Hạt giống và cây thế hệ con được tạo ra bằng phương pháp theo sáng chế bao gồm sự kiện ngô MON87429. Việc áp dụng một hoặc nhiều loại thuốc diệt cỏ mà vì đó sự kiện ngô MON87429 đem lại khả năng chống chịu có thể được sử dụng để chọn ra thế hệ con bao gồm sự kiện ngô MON87429. Theo cách khác, có thể phân tích thế hệ con bằng cách sử dụng phương pháp chẩn đoán để chọn cây hoặc

hạt giống bao gồm sự kiện ngô MON87429. Thế hệ con có thể là cây cùng giống hoặc cây lai; có thể được trồng từ hạt giống được tạo ra bằng cây bao gồm sự kiện ngô MON87429 hoặc từ hạt giống được tạo ra bằng cây được thụ phấn bằng phấn hoa từ cây bao gồm sự kiện ngô MON87429; và có thể là đồng hợp tử hoặc dị hợp tử đối với sự kiện ngô MON87429.

Phương pháp sản xuất hạt giống lai bằng cách sử dụng sự kiện ngô MON87429 được đề xuất. Cây bao gồm sự kiện ngô MON87429 có sự biểu hiện của protein CP4-EPSPS chống chịu glyphosat ở tất cả các mô trừ các mô sinh sản đực. Điều này đem lại khả năng chống chịu glyphosat ở mô sinh dưỡng và sinh sản cái và độ nhạy với glyphosat ở mô sinh sản đực. Độ nhạy glyphosat này có thể được sử dụng để gây tình trạng bất dục đực thông qua việc áp dụng glyphosat đúng cách. Glyphosat là loại thuốc diệt cỏ toàn thân được chuyển vị từ mô nguồn đến mô bể chứa ở cây. Do tốc độ chuyển hóa glyphosat ở ngô, nên việc áp dụng cho cây trồng bao gồm sự kiện ngô MON87429 trước khi phát triển mô sinh sản đực có thể ngăn chặn sự phát triển phấn hoa, rụng phấn hoa hoặc đùn bao phấn. Tình trạng bất dục đực do glyphosat gây ra này có thể được sử dụng để tăng hiệu quả sản xuất hạt giống lai, ví dụ, bằng cách loại bỏ hoặc giảm nhu cầu khử nhị bằng phương pháp vật lý đối với cây ngô được sử dụng làm cây cái trong một lần lai tạo đã cho trong quá trình sản xuất hạt giống lai.

Sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất hạt giống lai bao gồm (a) trồng cây bao gồm sự kiện ngô MON87429, (b) áp dụng một lượng hữu hiệu của glyphosat cho cây để kích thích tình trạng bất dục đực, trong đó việc áp dụng thuốc diệt cỏ là trước hoặc trong quá trình phát triển của mô sinh sản đực của cây nhờ đó kích thích tình trạng bất dục đực ở cây; (c) thụ phấn cho cây bằng phấn hoa từ cây thứ hai; và (d) thu hoạch hạt giống lai từ cây này. Theo một phương án, glyphosat được áp dụng trước hoặc trong quá trình phát triển với một lượng hữu hiệu là khoảng 0,25 pao (0,125kg) đương lượng axit/mẫu Anh đến khoảng 11,0 pao (5,5kg) đương lượng axit/mẫu Anh, được áp dụng trong một hoặc nhiều lần áp dụng. Theo một phương án khác, bước thụ phấn có thể được thực hiện bằng cách cho phép thụ phấn thụ động (ví dụ, thông qua phương pháp thụ phấn nhờ gió), bằng các phương tiện khác như thụ phấn cơ học hoặc bằng tay, hoặc bằng dạng kết hợp của các phương pháp này. Quá trình áp dụng thuốc diệt cỏ có thể được áp dụng trong một hoặc nhiều lần áp dụng trước hoặc trong quá trình phát triển mô sinh sản đực, như ở giai đoạn được chọn từ nhóm gồm giai đoạn V4, V5, V6, V7, V8, V9, V10, V11, V12, V13 và V14 của quá trình phát

triển của cây ngô và có thể ngăn chặn ít nhất là sự phát triển phấn hoa, rụng phấn hoa hoặc đùn bao phấn. Tình trạng bất dục đực có thể là một phần hoặc hoàn toàn. Theo một phương án, lượng hữu hiệu của glyphosat sẽ vào khoảng 0,5 pao (0,25kg) đương lượng axit/mẫu Anh đến khoảng 2,5 pao (1,25kg) đương lượng axit/mẫu Anh (trong một lần áp dụng hoặc được tách thành hai lần áp dụng trở lên) được áp dụng ở giai đoạn V4 đến V8 hoặc lên tới 100 đơn vị độ tăng trưởng (growing degree unit-GDU) trước khi ra hoa.

Cây, thế hệ con, hạt giống, tế bào và bộ phận của cây theo sáng chế còn có thể chứa một hoặc nhiều (các) tính trạng bổ sung của ngô hoặc sự kiện chuyển gen, đặc biệt là tính trạng được đưa vào bằng cách lai tạo cây ngô bao gồm sự kiện ngô MON87429 với một cây ngô khác chứa (các) tính trạng bổ sung hoặc sự kiện chuyển gen. (Các) tính trạng hoặc sự kiện chuyển gen như vậy bao gồm, nhưng không giới hạn ở khả năng chống côn trùng tăng, hiệu quả sử dụng nước tăng, năng suất tăng, khả năng chịu hạn tăng, chất lượng hạt giống tăng, chất lượng dinh dưỡng, sản xuất hạt lai và/hoặc khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ được cải thiện, trong đó tính trạng được đo so với cây ngô thiếu tính trạng chuyển gen như vậy. Các sự kiện chuyển gen ngô là đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này; ví dụ, một danh sách về các tính trạng như vậy được cung cấp bởi Cơ quan Dịch vụ Kiểm tra Sức khỏe Động vật và Thực vật (APHIS) của Bộ Nông nghiệp Hoa Kỳ (USDA) và có thể được tìm thấy trên trang web tại địa chỉ: www.aphis.usda.gov. Do đó, hai sự kiện chuyển gen trở lên có thể được kết hợp ở một hạt giống hoặc cây thế hệ con bằng cách lai tạo hai cây mẹ, mỗi cây chứa một hoặc nhiều (các) sự kiện chuyển gen, thu gom hạt giống thế hệ con và chọn để có được hạt giống hoặc cây thế hệ con chứa hai sự kiện chuyển gen trở lên; sau đó, các bước này có thể được lặp lại cho đến khi đạt được dạng kết hợp mong muốn của các sự kiện chuyển gen ở thế hệ con đạt được. Việc lai trở lại với cây bố mẹ và lai xa với cây không chuyển gen cũng được dự liệu, và nhân giống sinh dưỡng cũng vậy. Phần nộp lưu của mẫu hạt giống tiêu biểu bao gồm sự kiện ngô MON87429 đã được thực hiện theo Hiệp ước Budapest với Bảo tàng Giống chuẩn Mỹ (American Type Culture Collection-ATCC®) có địa chỉ tại 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia USA, Zip Code 20110. Tên gọi nộp lưu bằng độc quyền sáng chế theo ATCC (số truy cập) của hạt giống bao gồm sự kiện ngô MON87429 là PTA-124635 và ngày nộp lưu là ngày 12 tháng 1 năm 2018. Phần nộp lưu sẽ được duy trì trong kho lưu trong thời gian 30 năm hoặc 5 năm sau lần yêu cầu sau cùng hoặc trong thời hạn hiệu lực của bằng độc quyền sáng chế, tùy theo thời hạn nào dài hơn.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “bao gồm” có nghĩa là “gồm cả nhưng không giới hạn ở”.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ sau đây được bao gồm để mô tả đầy đủ hơn về sáng chế. Đây là phân tổng kết về việc xây dựng và thử nghiệm ba mươi lăm cấu trúc biểu hiện, việc sản xuất hơn mười lăm nghìn sự kiện đơn nhất và phân tích hàng trăm ngàn cây riêng biệt trong bảy năm thông qua thử nghiệm phân tử, nông học và thực địa nghiêm ngặt cần thiết cho việc tạo và chọn cuối cùng của sự kiện ngô MON87429.

Chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ nhận thấy rằng có thể tạo ra nhiều dạng cải biến trong các ví dụ cụ thể được bộc lộ và vẫn thu được kết quả tương tự. Các chất nhất định mà có liên quan về mặt hóa học và sinh lý có thể được dùng để thay thế cho các chất được mô tả trong bản mô tả này trong khi đạt được cùng kết quả hoặc kết quả tương tự. Tất cả các dạng thay thế và cải biến như vậy là rõ ràng đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này thì được coi là nằm trong phạm vi của sáng chế.

Ví dụ 1: Thử nghiệm bằng biểu hiện, thiết kế cấu trúc và thử nghiệm cây R0

Ví dụ này mô tả kiểu thiết kế và thử nghiệm ở cây ngô có ba mươi lăm cấu trúc khác nhau. Mỗi cấu trúc chứa bốn băng biểu hiện, mỗi băng biểu hiện được sử dụng để biểu hiện một gen chuyển khác. Thử nghiệm này được thực hiện để chọn cấu trúc tốt nhất để sử dụng nhằm biểu hiện tất cả bốn gen chuyển ở ngô. Mỗi cấu trúc có một cấu hình đơn nhất, thay đổi theo các yếu tố biểu hiện và hướng băng biểu hiện.

Các băng biểu hiện riêng biệt khác nhau với các dạng kết hợp yếu tố biểu hiện và gen chuyển khác nhau được thiết kế, tạo dòng vô tính vào các vật truyền biến nạp thực vật và được kiểm tra về tính hiệu quả tính trạng ở cây ngô để tạo ra tập hợp băng biểu hiện riêng biệt tốt nhất. Bằng cách sử dụng tập hợp băng biểu hiện riêng biệt này, 35 cấu trúc khác nhau được thiết kế sao cho mỗi cấu trúc chứa bốn băng biểu hiện (mỗi băng biểu hiện có gen chuyển đối với PAT, DMO, CP4-EPSPS hoặc FT) và có thể được sử dụng để kiểm tra dạng kết hợp bốn cách của các băng biểu hiện khác nhau. Các dạng kết hợp băng biểu hiện thay đổi theo các yếu tố biểu hiện, trình tự mã hóa protein và hướng. Điều này đem lại việc thử nghiệm hai băng biểu hiện PAT, 6 băng biểu hiện DMO, 5 băng biểu hiện FT, 18 băng biểu hiện CP4-EPSPS.

35 cấu trúc bốn băng biểu hiện được tạo dòng vô tính vào các vật truyền biến nạp thực vật và các vật truyền này được sử dụng cho việc biến nạp phôi chưa trưởng thành của ngô LH244 do *Agrobacterium* làm trung gian bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này để tạo ra 15.326 sự kiện biến nạp đơn nhất, mỗi sự kiện được tạo ra bằng cách chèn ngẫu nhiên đoạn chèn gen chuyển vào hệ gen của ngô. Sau đó, cây R0 được tái tạo từ các tế bào chuyển gen và cây có rễ có đặc điểm kiểu hình bình thường được chuyển vào đất để sinh trưởng và đánh giá thêm.

15.326 cây R0 được phân tích để có một bản sao đơn lẻ của đoạn chèn chuyển gen và sự vắng mặt của trình tự khung chính vật truyền. Các cây có một bản sao đơn lẻ của đoạn chèn được đi tiếp sang thử nghiệm hiệu quả chống chịu thuốc diệt cỏ. Cây R0 một bản sao đơn lẻ được đánh giá trong nhà kính về khả năng chống chịu quizalofop (0,16 pao (0,08kg)) thành phần có hoạt tính/mẫu Anh của thuốc diệt cỏ Assure II®), sau đó là hỗn hợp bể chứa của glufosinat (0,98 pao (0,49kg) đương lượng axit/mẫu Anh của thuốc diệt cỏ Ignite® 280), dicamba (2,0 pao 1,0kg) đương lượng axit/mẫu Anh của thuốc diệt cỏ Clarity®), hoặc thuốc diệt cỏ 2,4-D ((2,0 pao 1,0kg) đương lượng axit/mẫu Anh của thuốc diệt cỏ amin 2,4-D 4®) (hoặc dạng kết hợp của thuốc diệt cỏ bất kỳ trong số các thuốc diệt cỏ này) được phun ở giai đoạn tăng trưởng V1/V2. Các cây thể hiện mức tổn thương > 30% bị loại bỏ.

Từ 15.326 sự kiện biến nạp đơn nhất ban đầu được tạo ra bằng cách sử dụng 35 vật truyền biến nạp, 1.945 sự kiện đơn nhất được chọn sau khi phân tích số lượng bản sao và dữ liệu phun thuốc diệt cỏ. Dữ liệu được đưa ra ở Bảng 2. Các cây R0 dùng cho các sự kiện được chọn được tự thụ phấn để tạo ra hạt giống R1 hoặc được lai tạo để tạo ra hạt giống F1 mà đã được đi tiếp vào thử nghiệm trên ruộng đồng mùa thứ nhất.

Bảng 2: Hiệu quả lai họ gần trong thử nghiệm trên ruộng đồng mùa thứ nhất

Cấu trúc	Sự kiện R0	Sự kiện được đi tiếp
HT4-1	515	39
HT4-2	263	30
HT4-3	158	53
HT4-4	340	79
HT4-5	97	20

HT4-6	121	24
HT4-7	49	10
HT4-8	88	16
HT4-9	853	112
HT4-10	366	55
HT4-11	600	78
HT4-12	729	73
HT4-13	459	63
HT4-14	1026	151
HT4-15	224	44
HT4-16	1877	76
HT4-17	365	39
HT4-18	127	24
HT4-19	94	27
HT4-20	23	4
HT4-21	409	74
HT4-25	123	13
HT4-26	57	3
HT4-27	76	1
HT4-29	118	5
HT4-30	177	24
HT4-31	311	18
HT4-32	913	123
HT4-34	884	124
HT4-36	1364	185
HT4-37	1019	179
HT4-38	1021	129
HT4-39	98	15
HT4-50	250	26
HT4-51	132	9
Tổng	15326	1945

Ví dụ 2: Thử nghiệm trên ruộng đồng mùa thứ nhất

Thử nghiệm trên ruộng đồng được thực hiện trong nhiều năm với các sự kiện được đi tiếp từ phân tích R0 đối với mỗi cấu trúc trong số 35 cấu trúc, và sau đó, hiệu suất của mỗi cây đối với mỗi cấu trúc trong mùa thử nghiệm thứ nhất trên ruộng đồng được phân tích ở dạng tập hợp. Do đó, mỗi cấu trúc được biểu thị bằng nhiều sự kiện đơn nhất. Điều này cho phép số lượng cấu trúc lớn hơn được thử nghiệm trong các thử nghiệm trên ruộng đồng mùa thứ nhất trong khi chỉ cho đi tiếp qua thử nghiệm mùa thứ nhất các cấu trúc có hiệu suất hàng đầu. Các thử nghiệm trên ruộng đồng mùa thứ nhất được thực hiện với các cây R2 (đồng hợp tử đối với mỗi sự kiện) về (1) hiệu quả lai họ gần đối với khả năng chống chịu glufosinat + dicamba, quizalofop và 2,4-D, (2) hiệu quả của Hệ thống Lai tạo Roundup (Roundup Hybridization System-RHS) và (3) thử nghiệm áp lực thuốc diệt cỏ đối với khả năng chống chịu với tỷ lệ áp dụng thuốc diệt cỏ quizalofop, 2,4-D, glufosinat và dicamba cao hơn.

Việc sàng lọc về hiệu quả lai họ gần của cây để đánh giá khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ đối với glufosinat + dicamba, quizalofop và 2,4-D được thực hiện. Các phương pháp xử lý bằng thuốc diệt cỏ bao gồm: áp dụng hỗn hợp bể chứa glufosinat ở mức 0,8 pao (0,4kg) thành phần có hoạt tính/mẫu Anh cộng với dicamba ở mức 2,0 pao (1,0kg) đương lượng axit/mẫu Anh; quizalofop ở mức 0,16 pao (0,08kg) thành phần có hoạt tính/mẫu Anh; hoặc 2,4-D ở mức 2,0 pao (1,0kg) thành phần có hoạt tính/mẫu Anh. Các mảnh đất được đánh giá trực quan về tổn thương cây trồng 10 - 14 ngày sau khi xử lý thuốc diệt cỏ trên thang điểm từ 0 đến 100 mà điểm “0” là không có tổn thương cây trồng và “100” là phá hủy cây trồng hoàn toàn. Chiều cao cây (PHT), chiều cao bông (EHT), số ngày đến khi đạt 50% râu (S50D), số ngày đến khi đạt 50% phân hoa (P50D), trọng lượng vỏ (SHW), trọng lượng thử nghiệm (TWT), độ ẩm (MST) và năng suất hạt (YLD) cũng được thu thập. Tất cả các dữ liệu được đưa vào phép phân tích phương sai và phương pháp tách trung bình ở mức $p < 0,05$. Giá trị trung bình tổng thể của nhiều cây chứa cùng một sự kiện được sử dụng và hiệu quả lai họ gần được tổng kết đối với glufosinat + dicamba, quizalofop và 2,4-D là xuất sắc (4), tốt (3), khá (2) hoặc kém (1) hoặc không áp dụng (NA). Dữ liệu được đưa ra trong Bảng 3.

Bảng 3: Hiệu quả lai họ gân trong thử nghiệm trên ruộng đồng mùa thứ nhất

Cấu trúc	Glufosinat/Dicamba	Quizalofop	2,4-D
HT4-1	4	4	4
HT4-2	4	4	4
HT4-3	4	4	4
HT4-4	4	4	4
HT4-5	4	4	4
HT4-6	4	4	4
HT4-7	4	4	4
HT4-8	4	4	4
HT4-9	4	4	4
HT4-10	4	4	4
HT4-11	4	4	4
HT4-12	4	4	4
HT4-13	4	4	4
HT4-14	4	4	4
HT4-15	4	4	4
HT4-16	4	4	4
HT4-17	4	4	4
HT4-18	4	4	3
HT4-19	4	4	4
HT4-20	4	4	4
HT4-21	4	4	4
HT4-25	4	4	4
HT4-26	NA	NA	NA
HT4-27	NA	NA	NA
HT4-29	4	4	4
HT4-30	4	4	4
HT4-31	4	4	4
HT4-32	4	4	4
HT4-34	4	4	4

HT4-36	4	4	4
HT4-37	4	4	4
HT4-38	4	4	4
HT4-39	4	4	4
HT4-50	4	4	4
HT4-51	4	4	4

Việc sàng lọc về hiệu quả RHS của cây được thực hiện để nhận diện sự khác biệt về khả năng chống chịu glyphosat và tính bất dục bông cờ do glyphosat gây ra của vật liệu lai. Một phương pháp xử lý bằng thuốc diệt cỏ đơn lẻ được sử dụng cho việc sàng lọc và bao gồm glyphosat ở mức 1,5 pao (1,5 pao (0,75kg)) đương lượng axit/mẫu Anh được áp dụng cho V2, sau đó là 0,75 pao (0,375kg) đương lượng axit/mẫu Anh đến khoảng V8 (875 ngày độ tăng trưởng), sau đó là khoảng V10 (1025 ngày độ tăng trưởng). Các mảnh đất được đánh giá trực quan về mức tổn thương cây trồng tính theo % (CIPV2, CIPV8, CIPV10 và CIPVT) 10-14 ngày sau khi áp dụng thuốc diệt cỏ trên thang điểm từ 0 đến 100 cộng với phần đánh giá tổn thương cuối cùng tại VT (sau khi mọc bông cờ). Các mảnh đất cũng được đánh giá trực quan về mức mọc râu tính theo % [(SES9A (S90) và SES9C (S90 cộng với 4 ngày) SES9E (S90 cộng với 8 ngày))] và mức đùn bao phần tính theo % [(AES9A (S90), AES9C (S90 cộng với 4 ngày) và AES9E (S90 cộng với 8 ngày))] trên thang điểm tương tự từ 0 đến 100 mà điểm “0” là không có sự mọc râu hoặc đùn bao phần và “100” là sự đùn bao phần hoặc mọc râu hoàn toàn. Các thông số nông học khác được thu thập, như trong phương pháp sàng lọc về hiệu quả lai họ gần. Các giá trị trung bình tổng thể của nhiều cây chứa cùng một sự kiện được sử dụng, và khả năng chống chịu glyphosat, tình trạng bất dục bông cờ, và năng suất thì mỗi đặc điểm được tổng kết ở dạng xuất sắc (4), tốt (3), khá (2), hoặc kém (1) hoặc không áp dụng (NA). Dữ liệu được đưa ra trong Bảng 4.

Bảng 4: Hiệu quả RHS trong thử nghiệm trên ruộng đồng mùa thứ nhất

Cấu trúc	Khả năng chống chịu glyphosat	Tính bất dục bông cờ	Năng suất
HT4-1	4	2	NA
HT4-2	4	2	NA
HT4-3	2	2	NA

HT4-4	4	2	NA
HT4-5	2	2	NA
HT4-6	2	2	NA
HT4-7	4	2	NA
HT4-8	4	2	NA
HT4-9	2	2	NA
HT4-10	2	2	NA
HT4-11	2	2	NA
HT4-12	4	2	NA
HT4-13	4	2	NA
HT4-14	4	4	4
HT4-15	4	2	NA
HT4-16	3/2	4	1
HT4-17	4	2	NA
HT4-18	2	2	NA
HT4-19	1	NA	NA
HT4-20	1	NA	NA
HT4-21	4	2	NA
HT4-25	2	2	NA
HT4-26	NA	NA	NA
HT4-27	NA	NA	NA
HT4-29	1	NA	NA
HT4-30	4	2	NA
HT4-31	2	2	NA
HT4-32	4	4	4
HT4-34	4	4	4
HT4-36	4	2	NA
HT4-37	4	2	NA
HT4-38	4	2	NA
HT4-39	4	2	NA
HT4-50	2	2	NA

HT4-51	2	2	NA
--------	---	---	----

Thử nghiệm áp lực thuốc diệt cỏ được thực hiện để đánh giá khả năng chống chịu của cây trồng ở cấp độ cấu trúc với tỷ lệ áp dụng thuốc diệt cỏ quizalofop, 2,4-D, glufosinat và dicamba cao hơn như sau. Các phương pháp xử lý quizalofop bao gồm: 1) quizalofop ở mức 0,32 pao (0,16kg) thành phần có hoạt tính/mẫu Anh (4X) cộng với chất hoạt động bề mặt không ion (non-ionic surfactant-NIS) 0,25% thể tích/thể tích được áp dụng cho VE-V2, sau đó là V4, sau đó là V8; 2) quizalofop ở mức 0,64 pao (0,32kg) thành phần có hoạt tính/mẫu Anh (8X) cộng với NIS 0,25% thể tích/thể tích được áp dụng cho VE-V2, sau đó là V4, sau đó là V8; hoặc 3) quizalofop ở mức 1,28 pao (0,64kg) thành phần có hoạt tính/mẫu Anh (16X) cộng với NIS 0,25% thể tích/thể tích được áp dụng cho VE-V2, sau đó là V4, sau đó là V8. Các phương pháp xử lý 2,4-D bao gồm 1) Amin 2,4-D ở mức 2 pao (1kg) thành phần có hoạt tính/mẫu Anh cộng với NIS 0,25% thể tích/thể tích được áp dụng cho VE-V2, sau đó là V4, sau đó là V8; 2) Amin 2,4-D ở mức 4 pao (2kg) thành phần có hoạt tính/mẫu Anh cộng với NIS 0,25% thể tích/thể tích được áp dụng cho VE-V2, sau đó là V4, sau đó là V8; 3) Amin 2,4-D ở mức 8 pao (4kg) thành phần có hoạt tính/mẫu Anh cộng với NIS 0,25% thể tích/thể tích được áp dụng cho VE-V2, sau đó là V4, sau đó là V8; hoặc 4) Amin 2,4-D ở mức 16 pao (8kg) thành phần có hoạt tính/mẫu Anh cộng với NIS 0,25% thể tích/thể tích được áp dụng cho VE-V2, sau đó là V4, sau đó là V8. Các phương pháp xử lý glufosinat bao gồm: 1) glufosinat 1,0 pao (0,5kg) thành phần có hoạt tính/mẫu Anh được áp dụng cho V2, sau đó là V4, sau đó là V8; 2) glufosinat 2,0 pao (1,0kg) thành phần có hoạt tính/mẫu Anh được áp dụng cho V2 sau đó là V4, sau đó là V8; 3) glufosinat 4,0 pao (2,0kg) thành phần có hoạt tính/mẫu Anh được áp dụng cho V2, sau đó là V4, sau đó là V8; hoặc 4) glufosinat 8,0 pao (4,0kg) thành phần có hoạt tính/mẫu Anh được áp dụng cho V2, sau đó là V4, sau đó là V8. Các phương pháp xử lý dicamba bao gồm: 1) dicamba ở mức 2,0 pao (1,0kg) thành phần có hoạt tính/mẫu Anh được áp dụng cho V2, sau đó là V4, sau đó là V8; 2) dicamba ở mức 4,0 pao (2,0kg) thành phần có hoạt tính/mẫu Anh được áp dụng cho V2, sau đó là V4, sau đó là V8; 3) dicamba ở mức 8,0 pao (4,0kg) thành phần có hoạt tính/mẫu Anh được áp dụng cho V2, sau đó là V4, sau đó là V8; hoặc 4) dicamba ở mức 16 pao (8kg) thành phần có hoạt tính/mẫu Anh được áp dụng cho V2, sau đó là V4, sau đó là V8. Các mảnh đất được đánh giá trực quan về tổn thương cây trồng và các thông số được thu thập, như trong phương pháp sàng lọc về hiệu quả lai họ gần. Các

giá trị trung bình tổng thể của nhiều cây chứa cùng một sự kiện được sử dụng, và hiệu quả chống chịu thuốc diệt cỏ được tổng kết đối với mỗi thuốc diệt cỏ trong số bốn loại thuốc diệt cỏ là xuất sắc (4), tốt (3), khá (2), hoặc kém (1) hoặc không áp dụng (NA). Dữ liệu được đưa ra trong Bảng 5.

Bảng 5: Thử nghiệm áp lực thuốc diệt cỏ mùa thứ nhất

Cấu trúc	Glufosinat	Dicamba	Quizalofop	2,4-D
HT4-1	4	4	3	3
HT4-2	4	4	4	4
HT4-3	4	4	4	4
HT4-4	4	4	4	4
HT4-5	4	4	4	4
HT4-6	4	4	4	4
HT4-7	4	4	4	4
HT4-8	4	4	4	4
HT4-9	4	4	4	4
HT4-10	4	4	4	4
HT4-11	4	4	4	4
HT4-12	4	4	4	4
HT4-13	4	4	4	4
HT4-14	4	4	4	4
HT4-15	4	4	4	4
HT4-16	4	4	4	4
HT4-17	4	4	4	4
HT4-18	4	4	4	4
HT4-19	4	4	4	4
HT4-20	4	4	4	4
HT4-21	4	4	4	4
HT4-25	4	4	4	4
HT4-26	NA	NA	NA	NA
HT4-27	NA	NA	NA	NA
HT4-29	4	4	4	4

HT4-30	4	4	4	4
HT4-31	4	4	4	4
HT4-32	4	4	4	4
HT4-34	4	4	4	4
HT4-36	4	4	4	4
HT4-37	4	4	4	4
HT4-38	4	4	4	4
HT4-39	4	4	4	4
HT4-50	4	4	4	4
HT4-51	4	4	4	4

Dữ liệu về hiệu suất đa hợp của các cây R2 được tạo ra có mỗi cấu trúc trong số 35 cấu trúc được kết hợp và phân tích đối với (1) thử nghiệm hiệu quả lai họ gần đối với khả năng chống chịu glufosinat + dicamba, quizalofop và 2,4-D, (2) thử nghiệm hiệu quả RHS đối với khả năng chống chịu glyphosat, tính bất dục bông cờ, và năng suất, và (3) thử nghiệm áp lực thuốc diệt cỏ đối với khả năng chống chịu tỷ lệ áp dụng thuốc diệt cỏ quizalofop, 2,4-D, glufosinat và dicamba cao hơn. Bằng cách sử dụng dữ liệu này, 3 cấu trúc (HT4-14, HT4-32 và HT4-34) được chọn để cho đi tiếp từ 35 cấu trúc được thử nghiệm. Sau đó, các sự kiện của 3 cấu trúc này được đi tiếp sang thử nghiệm trên ruộng đồng mùa thứ hai.

Ví dụ 3: Phân tích phân tử

Phân tích phân tử được thực hiện đồng thời với các thử nghiệm trên ruộng đồng về các sự kiện được đi tiếp. Phương pháp khuếch đại và giải trình tự ADN được sử dụng để xác nhận trình tự chèn, số bản sao chèn và sự vắng mặt của khung chính trong đoạn chèn. Vị trí chèn trong hệ gen ngô đối với mỗi sự kiện được lập bản đồ. Phân tích phương Bắc được thực hiện để phát hiện và đo các sản phẩm phiên mã ARN thông tin của các gen *pat*, *dmo*, *ft_t* và *cp4-epsps*. Việc giải trình tự protein đầu tận cùng N của các protein PAT, DMO, FT_T và CP4-EPSPS được tinh chế từ cây chuyển gen được thực hiện để xác nhận trình tự protein tái tổ hợp. Phân tích thẩm tách phương Tây để phát hiện các protein PAT, DMO, FT_T và CP4-EPSPS được thực hiện với các mẫu cây chuyển gen. Phân tích phương Nam chuyên sâu được thực hiện trên ADN hệ gen từ các cây R1 để xác nhận số lượng bản sao và sự vắng mặt của khung chính.

Ví dụ 4: Thử nghiệm trên ruộng đồng nâng cao

Các thử nghiệm trên ruộng đồng nâng cao (thử nghiệm mùa thứ hai và hơn thế nữa) được thực hiện trong nhiều năm với các sự kiện được đi tiếp từ các thử nghiệm trên ruộng đồng mùa thứ nhất đối với các cấu trúc HT4-14, HT4-32 và HT4-34. Hiệu suất của nhiều cây riêng biệt đối với mỗi sự kiện trong mỗi thử nghiệm trên ruộng đồng được phân tích ở dạng tập hợp. Do đó, mỗi sự kiện được biểu thị bằng nhiều cây đơn nhất. Điều này cho phép hiệu suất của mỗi sự kiện được phân tích trong nhiều điều kiện, tại các địa điểm và khu vực địa lý khác nhau và đối với nhiều thuộc tính khác nhau.

Các thử nghiệm trên ruộng đồng được thực hiện với cây lai họ gần (đồng hợp tử đối với sự kiện) và cây lai (bán hợp tử đối với sự kiện) để đánh giá (1) hiệu quả tính trạng của các tỷ lệ thương mại có khả năng chống chịu glufosinat, dicamba, quizalofop, và 2,4-D, (2) hiệu suất nông học, (3) hiệu quả của hệ thống lai Roundup (Roundup Hybridization System - RHS) và glyphosat, và (4) thử nghiệm áp lực thuốc diệt cỏ đối với khả năng chống chịu với tỷ lệ áp dụng các thuốc diệt cỏ quizalofop, 2,4-D, glufosinat và dicamba cao hơn.

Trong các thử nghiệm trên ruộng đồng mùa 1, 30 sự kiện được thử nghiệm đối với cấu trúc HT4-14, 41 sự kiện được thử nghiệm đối với cấu trúc HT4-32 và 21 sự kiện được thử nghiệm đối với cấu trúc HT4-34. Bằng việc sử dụng dữ liệu đa hợp tử từ các thử nghiệm này, các sự kiện được chọn để cho đi tiếp. Trong các thử nghiệm trên ruộng đồng mùa 2, 15 sự kiện được thử nghiệm đối với cấu trúc HT4-14, 38 sự kiện đối với cấu trúc HT4-32 và 38 sự kiện đối với cấu trúc HT4-34 (con số này bao gồm một số sự kiện không được thử nghiệm trong thử nghiệm trên ruộng đồng mùa 1 vì thiếu hạt giống trong mùa đó). Các sự kiện đối với cấu trúc HT4-14 được mô tả đặc tính bằng phân tích phân tử như được mô tả trong Ví dụ 3 và dữ liệu này cũng được sử dụng để chọn các sự kiện. Dữ liệu đa hợp tử từ các thử nghiệm này và phương pháp mô tả đặc tính phân tử chuyên sâu về các sự kiện đối với cấu trúc HT4-14 được sử dụng để chọn 3 sự kiện để cho đi tiếp đối với cấu trúc HT4-14. Dữ liệu đa hợp tử từ các thử nghiệm này được sử dụng để chọn 24 sự kiện để cho đi tiếp đối với cấu trúc HT4-32 và quyết định không cho đi tiếp các sự kiện bất kỳ đối với cấu trúc HT4-34. Trong các thử nghiệm trên ruộng đồng mùa 3, 3 sự kiện đối với cấu trúc HT4-14 và 24 sự kiện đối với cấu trúc HT4-34 được thử nghiệm. Dữ liệu đa hợp tử từ các thử nghiệm này được sử dụng để chọn 2 sự kiện để cho đi tiếp đối với cấu trúc HT4-14 và quyết định không cho đi tiếp các sự kiện bất kỳ đối với HT4-32. Các thử nghiệm trên ruộng đồng mùa

4 được sử dụng để so sánh hai sự kiện cuối cùng ở một số lượng lớn các địa điểm, trong nhiều điều kiện khác nhau, và trong chất mầm nguyên sinh lai và lai họ gần để tạo ra dữ liệu cần thiết để chọn sự kiện ưu việt. Bảng 6 đưa ra số lượng các sự kiện đơn nhất được thử nghiệm đối với mỗi cấu trúc trong các thử nghiệm trên ruộng đồng được thực hiện trong mỗi mùa.

Bảng 6: Tổng kết thử nghiệm trên ruộng đồng nâng cao

Mốc	HT4-14	HT4-32	HT4-34
Ruộng đồng mùa 1	30	41	21
Ruộng đồng mùa 2	15	38	38
Ruộng đồng mùa 3	3	24	0
Ruộng đồng mùa 4	2	0	0
Chọn sự kiện cuối cùng	1	0	0

Các thử nghiệm trên ruộng đồng về hiệu suất nông học được chạy trong cùng một mùa với các thử nghiệm trên ruộng đồng về hiệu quả tính trạng. Tất cả các thử nghiệm trên ruộng đồng đã sử dụng một thiết kế khối hoàn chỉnh ngẫu nhiên và được thực hiện tại nhiều địa điểm. Các thử nghiệm trên ruộng đồng được thực hiện tại các địa điểm ở Bắc Mỹ và Nam Mỹ. Đối với cả thử nghiệm trên ruộng đồng về hiệu quả và nông học, việc tính điểm nông học được thu thập trong suốt mùa thử nghiệm trên ruộng đồng và vào cuối mùa, năng suất được xác định (năng suất hiệu quả hoặc năng suất nông học). Các thử nghiệm trên ruộng đồng về hiệu quả được thực hiện để đánh giá tổn thương cây trồng 10 đến 14 ngày sau khi áp dụng thuốc diệt cỏ. Đánh giá tổn thương cây trồng đích là điểm số dưới 10% để cho đi tiếp một sự kiện nào đó. Đối với các thử nghiệm trên ruộng đồng nông học, duy trì được các mảnh đất không có cỏ dại và không có chất diệt cỏ thử nghiệm nào được áp dụng trong mùa trồng trọt. Các thử nghiệm trên ruộng đồng nông học lai bao gồm các đối chứng lai có thể so sánh được (đối chứng lai) được tạo ra bằng cách sử dụng cùng dòng ngô bố mẹ được sử dụng để tạo ra cây nhân giống lai chuyển gen, nhưng không chứa sự kiện chuyển gen. Các đối chứng lai họ gần là sản phẩm lai họ gần có thể so sánh được với các dòng lai họ gần chuyển gen.

Để so sánh dữ liệu thử nghiệm trên ruộng đồng, phép phân tích tổng hợp được thực hiện bằng cách sử dụng phần tổng hợp của tất cả các cây trong dữ liệu thử nghiệm trên ruộng

đồng đa mùa, đa địa điểm. Ví dụ, Bảng 7 minh họa qua nhiều mùa số lần sao chép (lần sao chép) trong đó một cách quan sát được lặp lại đối với hai sự kiện HT4-14 được chọn và tổng số cây riêng biệt được thử nghiệm trong mỗi thử nghiệm đối với mỗi sự kiện.

Bảng 7: Các lần sao chép trong thử nghiệm trên ruộng đồng

Mốc	Sự kiện	Tổng số lần sao chép	Tổng số cây
Ruộng đồng mùa 1	SỰ KIỆN 2	235	16.450
Ruộng đồng mùa 1	MON87429	235	16.450
Ruộng đồng mùa 2	SỰ KIỆN 2	100	7.000
Ruộng đồng mùa 2	MON87429	100	7.000
Ruộng đồng mùa 3	SỰ KIỆN 2	529	37.030
Ruộng đồng mùa 3	MON87429	513	35.910
Ruộng đồng mùa 4	SỰ KIỆN 2	228	15.960
Ruộng đồng mùa 4	MON87429	228	15.960
Ruộng đồng mùa 4	SỰ KIỆN 2	56	3.920
Ruộng đồng mùa 4	MON87429	2465	172.550

Phép phân tích tổng hợp về nhiều thử nghiệm trên ruộng đồng về hiệu quả lai được hoàn thành để so sánh xếp hạng tổn thương lai. Ví dụ, Bảng 8 đưa ra xếp hạng tổn thương qua nhiều mùa đối với hai sự kiện HT4-14 được chọn ở V8 (trong đó phân tích V8 bao gồm tổn thương tích lũy từ các lần áp dụng thuốc diệt cỏ V2, V4, V6 và V8) với sự khác biệt

nhỏ nhất có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức tin cậy 95% (LSD ở $p < 0,05$). Các cây bao gồm sự kiện ngô MON87429 và các cây chứa sự kiện 2 đều thể hiện hiệu suất tốt trong các thử nghiệm này.

Bảng 8: Phân tích tổng hợp về sự xếp hạng tổn thương từ các thử nghiệm trên ruộng đồng về hiệu quả lai

Mốc	Sự kiện	Tổn thương V8	LSD (P <0,05)
Ruộng đồng mùa 1	MON87429	1,3	2,1
Ruộng đồng mùa 1	SỰ KIỆN 2	1,1	2,1
Ruộng đồng mùa 2	MON87429	1,7	3,1
Ruộng đồng mùa 2	SỰ KIỆN 2	2,6	3,1
Ruộng đồng mùa 3	MON87429	0,08	3,4
Ruộng đồng mùa 3	SỰ KIỆN 2	0,13	3,4

Phép phân tích tổng hợp về nhiều thử nghiệm trên ruộng đồng về hiệu quả lai được hoàn thành để so sánh năng suất ở dạng giả/mẫu Anh (Bu/ac). Ví dụ, Bảng 9 đưa ra năng suất từ các giống lai qua nhiều mùa đối với hai sự kiện HT4-14 được chọn với sự khác biệt nhỏ nhất có ý nghĩa thống kê ở mức tin cậy 95% (LSD ở $p < 0,05$). Các cây bao gồm sự kiện ngô MON87429 và các cây chứa sự kiện 2 đều thể hiện hiệu suất tốt trong các thử nghiệm này.

Bảng 9: Phân tích tổng hợp về năng suất từ các thử nghiệm trên ruộng đồng về hiệu quả lai

Mốc	Sự kiện	Năng suất (Bu/ac)	LSD ($p < 0,05$)
-----	---------	----------------------	-----------------------

Ruộng đồng mùa 1	MON87429	222	12
Ruộng đồng mùa 1	SỰ KIỆN 2	222	12
Ruộng đồng mùa 2	MON87429	197	15,4
Ruộng đồng mùa 2	SỰ KIỆN 2	197	15,4
Ruộng đồng mùa 3	MON87429	210,9	9,1
Ruộng đồng mùa 3	SỰ KIỆN 2	211,5	9,1

Thử nghiệm trên ruộng đồng về thực hiện thử nghiệm áp lực với thuốc diệt cỏ được áp dụng ở tỷ lệ áp dụng cao hơn so với cách sử dụng thương mại được thực hiện với các cây lai và lai họ gần chứa sự kiện chuyển gen đơn nhất. Các loại thuốc diệt cỏ glufosinat (trong khoảng từ 1,6 pao (0,8kg) đến 6,4 pao (3,2kg) thành phần có hoạt tính/mẫu Anh), dicamba (trong khoảng từ 2,0 pao (1,0kg) đến 16 pao (8kg) thành phần có hoạt tính/mẫu Anh), quizalofop (trong khoảng từ 0,32 pao (0,16kg) đến 1,28 pao (0,64kg) thành phần có hoạt tính/mẫu Anh), 2,4-D (trong khoảng từ 2,0 pao (1,0kg) đến 8,0 pao (4,0kg) thành phần có hoạt tính/mẫu Anh) và glyphosat (ở mức 3,0 pao (1,5kg) đương lượng axit/mẫu Anh) được áp dụng trong các thử nghiệm trên ruộng đồng để kiểm tra áp lực về hiệu quả của các tính trạng chống chịu thuốc diệt cỏ. Vào cuối mùa, các thử nghiệm trên ruộng đồng về việc thực hiện thử nghiệm áp lực lai được thu hoạch và năng suất (Bu/ac) được xác định. Ví dụ, Bảng 10 đưa ra dữ liệu năng suất từ giống lai và giống lai họ gần trong các thử nghiệm khác nhau đối với hai sự kiện HT4-14 được chọn với sự khác biệt nhỏ nhất có ý nghĩa thống kê ở mức tin cậy 95% (LSD ở $p < 0,05$). Các cây bao gồm sự kiện ngô MON87429 và các cây chứa sự kiện 2 đều thể hiện hiệu suất tốt trong các thử nghiệm về năng suất giống lai và giống lai họ gần đối với tất cả các phương pháp xử lý bằng thuốc diệt cỏ. Kết quả này cho thấy rằng việc thực hiện thêm thử nghiệm trên ruộng có thể nhận diện lợi thế năng suất lai họ gần đối với sự kiện ngô MON87429 so với sự kiện 2.

Bảng 10: Năng suất từ các thử nghiệm trên ruộng đồng về hiệu quả thực hiện thử nghiệm áp lực lai/lai họ gần

Thuốc diệt cỏ	Cây	Sự kiện	Năng suất (Bu/ac)	LSD (p<0,05)
Glufosinat	Lai	MON87429	256	28,4
Glufosinat	Lai	SỰ KIỆN 2	240	28,4
Dicamba	Lai	MON87429	264	39,2
Dicamba	Lai	SỰ KIỆN 2	256	39,2
Quizalofop	Lai	MON87429	251	48,5
Quizalofop	Lai	SỰ KIỆN 2	257	48,5
2,4-D	Lai	MON87429	261	38,4
2,4-D	Lai	SỰ KIỆN 2	254	38,4
Glyphosat	Lai họ gần	MON87429	90,1	46
Glyphosat	Lai họ gần	SỰ KIỆN 2	67,2	46

Các thử nghiệm nông học lai trên ruộng đồng được thực hiện, các số đo nông học được thu thập trong suốt mùa và năng suất nông học được xác định vào cuối mùa. Phép phân tích tổng hợp xuyên suốt các thử nghiệm trên ruộng đồng nông học lai đa mùa, đa địa điểm được sử dụng để so sánh năng suất của đối chứng lai và giống lai. Ví dụ, Bảng 11 đưa ra dữ liệu năng suất (Bu/ac) đối với hai sự kiện HT4-14 được chọn với sự khác biệt nhỏ nhất có ý nghĩa thống kê ở mức tin cậy 95% (LSD ở $p<0,05$). Các cây bao gồm sự kiện ngô MON87429 và các cây chứa Sự kiện 2 đều thể hiện hiệu suất tốt trong các thử nghiệm này và không tìm thấy sự khác biệt thống kê nào về năng suất lai đối với các cây chứa một trong hai sự kiện này khi so sánh với các cây đối chứng.

Bảng 11: Phân tích tổng hợp về năng suất từ các thử nghiệm trên ruộng đồng về nông học lai

Mốc	Sự kiện	Năng suất (Bu/ac)	LSD ($p < 0,05$)
Ruộng đồng mùa 1	Đối chứng - không có	222	9
Ruộng đồng mùa 1	MON87429	220	9
Ruộng đồng mùa 1	SỰ KIỆN 2	224	9
Ruộng đồng mùa 2	Đối chứng - không có	224,6	13,7
Ruộng đồng mùa 2	MON87429	211	13,7
Ruộng đồng mùa 2	SỰ KIỆN 2	215	13,7
Ruộng đồng mùa 3	Đối chứng - không có	213,6	9,7
Ruộng đồng mùa 3	MON87429	213,3	9,7
Ruộng đồng mùa 3	SỰ KIỆN 2	212,4	9,7

Các thử nghiệm trên ruộng đồng về hiệu quả lai họ gần được thực hiện đối với khả năng chống chịu glyphosat và Hệ thống Lai tạo Roundup (RHS) và năng suất được xác định vào cuối mùa. Glyphosat được áp dụng với tỷ lệ 1,5 pao (0,75kg) đương lượng axit/mẫu Anh để kiểm soát cỏ dại, sau đó là hai lần áp dụng gây bất dục bằng glyphosat ở mức 0,75 pao (0,375kg) đương lượng axit/mẫu Anh ở khoảng V8, sau đó là 0,75 pao (0,375kg) đương lượng axit/mẫu Anh ở khoảng V10. Phép phân tích tổng hợp xuyên suốt các thử nghiệm trên ruộng đồng về hiệu quả lai họ gần đa mùa, đa địa điểm được sử dụng để so sánh năng suất của cây. Ví dụ, Bảng 12 đưa ra dữ liệu năng suất (Bu/ac) đối với hai sự kiện HT4-14 được chọn với sự khác biệt nhỏ nhất có ý nghĩa thống kê ở mức tin cậy 95% (LSD ở

$p < 0,05$). Cả hai thử nghiệm trên ruộng đồng mùa 2 và mùa 3 đều thể hiện mức giảm có ý nghĩa về mặt thống kê về năng suất ở các cây chứa Sự kiện 2 khi so sánh với các cây chứa sự kiện MON87429. Những dữ liệu này biểu lộ hiệu suất ưu việt trong các thử nghiệm năng suất hiệu quả lai họ gần của các cây bao gồm sự kiện ngô MON87429.

Bảng 12: Phân tích tổng hợp về năng suất từ các thử nghiệm trên ruộng đồng về hiệu quả lai họ gần được xử lý bằng glyphosat

Mốc	Sự kiện	Năng suất (Bu/ac)	LSD ($p < 0,05$)
Ruộng đồng mùa 1	MON87429	89,9	14,3
Ruộng đồng mùa 1	Sự kiện 2	87,5	14,3
Ruộng đồng mùa 2	MON87429	119,6	18,0
Ruộng đồng mùa 2	Sự kiện 2	99,0	18,0
Ruộng đồng mùa 3	MON87429	105,6	10,5
Ruộng đồng mùa 3	Sự kiện 2	90,13	10,5

Các thử nghiệm trên ruộng đồng nông học lai họ gần được thực hiện và năng suất được xác định vào cuối mùa đối với các cây không được xử lý. Các thử nghiệm này bao gồm đối chứng của các dòng lai họ gần có thể so sánh được với dòng lai họ gần chuyển gen. Phép phân tích tổng hợp xuyên suốt các thử nghiệm trên ruộng đồng nông học lai họ gần đa mùa, đa địa điểm được thực hiện, có so sánh năng suất của đối chứng theo cặp và giống lai họ gần chuyển gen. Ví dụ, Bảng 13 đưa ra dữ liệu năng suất (Bu/ac) đối với hai sự kiện HT4-14 được chọn với sự khác biệt nhỏ nhất có ý nghĩa thống kê ở mức tin cậy 95% (LSD ở $p < 0,05$). Không phát hiện thấy sự khác biệt thống kê nào về năng suất nông học lai họ gần giữa các cây đối chứng và cây bao gồm sự kiện ngô MON87429. Ngược lại, đối với các thử nghiệm trên ruộng đồng mùa 3, có mức giảm có ý nghĩa về mặt thống kê về năng suất ở các cây chứa sự kiện 2 khi so sánh với các cây đối chứng và cây bao gồm sự kiện ngô

MON87429. Các dữ liệu này biểu lộ hiệu suất ưu việt trong các thử nghiệm trên ruộng đồng nông học lai họ gần của cây bao gồm sự kiện ngô MON87429.

Bảng 13: Phân tích tổng hợp về năng suất từ các thử nghiệm trên ruộng đồng về nông học lai họ gần

Mốc	Sự kiện	Tổng (Bu/ac)	LSD ($p < 0,05$)
Ruộng đồng mùa 1	Đối chứng - không có	105,2	8,9
Ruộng đồng mùa 1	MON87429	104,1	8,9
Ruộng đồng mùa 1	Sự kiện 2	102,5	8,9
Ruộng đồng mùa 2	Đối chứng - không có	103,7	15,3
Ruộng đồng mùa 2	MON87429	93,4	15,3
Ruộng đồng mùa 2	Sự kiện 2	91,4	15,3
Ruộng đồng mùa 3	Đối chứng - không có	116,6	6,2
Ruộng đồng mùa 3	MON87429	112,8	6,2
Ruộng đồng mùa 3	Sự kiện 2	106,1	6,2

Các thử nghiệm hiệu quả lai được thực hiện tại bốn địa điểm ở Argentina để đánh giá khả năng chống chịu của cây với glufosinat, dicamba, quizalofop, haloxyfop, 2,4-D và glyphosat. Cây chứa MON87429 được lai tạo với cây chứa cả sự kiện ngô MON88017 và sự kiện ngô MON89034 để tạo ra thế hệ con chứa tất cả ba sự kiện (MON87429 x MON88017 x MON89034). Các phương pháp xử lý bằng thuốc diệt cỏ bao gồm 1) đối chứng không được xử lý; 2) glufosinat ở mức 0,448kg thành phần có hoạt tính/ha được áp dụng ở giai đoạn V2, sau đó là cùng một cách áp dụng cho giai đoạn V6; 3) glufosinat ở mức 0,896kg thành phần có hoạt tính/ha được áp dụng ở giai đoạn V2, sau đó là, cùng một

cách áp dụng cho giai đoạn V6; 4) dicamba ở mức 0,56 pao (0,28kg) đương lượng axit/mẫu Anh được áp dụng ở giai đoạn V2, sau đó là, cùng một cách áp dụng cho giai đoạn V6; 5) dicamba ở mức 1,12 pao (0,56kg) đương lượng axit/mẫu Anh được áp dụng ở giai đoạn V2, sau đó là, cùng một cách áp dụng cho giai đoạn V6; 6) quizalofop ở mức 0,09kg đương lượng axit/ha được áp dụng ở giai đoạn V2, sau đó là, cùng một cách áp dụng cho giai đoạn V6; 7) quizalofop ở mức 0,18kg đương lượng axit/ha được áp dụng ở giai đoạn V2, sau đó là, cùng một cách áp dụng cho giai đoạn V6; 8) haloxyfop ở mức 0,1kg đương lượng axit/ha được áp dụng ở giai đoạn V2, sau đó là, cùng một cách áp dụng cho giai đoạn V6; 9) haloxyfop ở mức 0,2kg đương lượng axit/ha được áp dụng ở giai đoạn V2, sau đó là, cùng một cách áp dụng cho giai đoạn V6; 10) 2,4-D ở mức 1,12 pao (0,56kg) thành phần có hoạt tính/mẫu Anh được áp dụng ở giai đoạn V2, sau đó là cùng một cách áp dụng cho giai đoạn V6; 11) 2,4-D ở mức 2,24 pao (1,12kg) đương lượng axit/mẫu Anh được áp dụng ở giai đoạn V2, sau đó là, cùng một cách áp dụng cho giai đoạn V6; hoặc 12) glyphosat ở mức 2,24 pao (1,12kg) đương lượng axit/mẫu Anh được áp dụng ở giai đoạn V2, sau đó là, cùng một cách áp dụng cho giai đoạn V6. Việc thu thập dữ liệu bao gồm tổn thương cây trồng 10 đến 14 ngày sau khi áp dụng thuốc diệt cỏ V2 và V6 và xếp hạng cuối cùng ở VT, số ngày đến khi đạt 50% phân hoa, số ngày đến khi đạt 50% râu, chiều cao cây, chiều cao bông, trọng lượng vỏ, trọng lượng kiểm tra, độ ẩm, và năng suất hạt. Tất cả các dữ liệu được đưa vào phép phân tích phương sai và phương pháp tách trung bình ở mức $p < 0,05$.

Khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ của cây chứa MON87429 x MON88017 x MON89034 là xuất sắc (tổn thương cây trồng $< 10\%$) đối với tất cả các tỷ lệ glyphosat, glufosinat, dicamba, quizalofop, haloxyfop và 2,4-D được thử nghiệm. Tỷ lệ xử lý thuốc diệt cỏ không tạo ra sự khác biệt đối với tổn thương cây trồng trực quan. Chiều cao bông không khác biệt đáng kể đối với phương pháp xử lý bất kỳ trong số phương pháp xử lý này so với phương pháp xử lý bằng thuốc diệt cỏ tiêu chuẩn 12 (glyphosat ở mức 2,24 pao (1,12kg) đương lượng axit/mẫu Anh). Không có sự giảm về chiều cao cây hoặc trọng lượng thử nghiệm, sự tăng về độ ẩm của hạt, độ trễ của quá trình trưởng thành (được đo bằng số ngày đến khi đạt 50% phân hoa hoặc râu tăng), sự giảm về năng suất hạt đáng kể nào của cây chứa MON87429 x MON88017 x MON89034 trong phương pháp xử lý bất kỳ so với đặc điểm đó của cây không được xử lý. Cây lai được tạo ra thông qua việc lai tạo cây chứa MON87429 với cây chứa sự kiện đem lại khả năng chống chịu glyphosat ở mô đực (như sự kiện ngô có bán trên thị trường MON88017 hoặc NK603) đem lại khả năng chống chịu

sinh dưỡng xuất sắc đối với glyphosat, glufosinat, dicamba, quizalofop, haloxyfop, 2,4-D khi được áp dụng ở tỷ lệ thương mại ghi trên nhãn.

Ba năm thử nghiệm trên ruộng đồng được sử dụng để kiểm tra về đối chứng của các cây bao gồm sự kiện ngô MON87429 bằng cách sử dụng clethodim. Các thử nghiệm này đã đánh giá việc sử dụng trong các phương pháp đối chứng mọc đại của thuốc diệt cỏ DIM với các cây bao gồm sự kiện ngô MON87429. Quan sát các cây được xử lý bằng clethodim theo tỷ lệ thương mại ghi trên nhãn và đối chứng hoàn toàn của các cây bao gồm sự kiện ngô MON87429.

Dữ liệu được tích lũy từ phép phân tích phân tử và từ thử nghiệm trên ruộng đồng với cây lai họ gần và cây lai bằng cách đánh giá (1) hiệu quả tính trạng của các tỷ lệ thương mại có khả năng chống chịu glufosinat, dicamba, quizalofop, và 2,4-D, (2) hiệu suất nông học, (3) hiệu quả của Hệ thống Lai tạo Roundup (RHS) và khả năng chống chịu glyphosat, và (4) thử nghiệm áp lực thuốc diệt cỏ đối với khả năng chống chịu với tỷ lệ áp dụng các thuốc diệt cỏ quizalofop, 2,4-D, glufosinat và dicamba cao hơn được phân tích đối với tất cả các sự kiện được kiểm tra về các cấu trúc HT4-14, HT4-32 và HT4-34. Phép phân tích dữ liệu tích lũy đã chứng minh hiệu suất ưu việt tổng thể của sự kiện ngô MON87429 so với các sự kiện khác và đem lại việc chọn sự kiện này cho mục đích thương mại.

Ví dụ 5: Mô tả đặc tính phân tử của sự kiện ngô MON87429

Sự kiện ngô MON87429 được đưa vào quá trình mô tả đặc tính phân tử rộng rãi sau khi được chọn làm sự kiện thương mại. Đoạn chèn chuyển gen của sự kiện ngô MON87429 chứa các yếu tố và trình tự được mô tả trong Bảng 1.

Việc phân tích trình tự ADN của sự kiện ngô MON87429 được thực hiện. Phép phân tích thẩm tách phương Nam được thực hiện để xác nhận rằng các cây bao gồm sự kiện ngô MON87429 chứa một bản sao nguyên vẹn đơn lẻ của toàn bộ đoạn chèn chuyển gen mà không có khung chính vật truyền biến nạp bất kỳ. ADN kẹp được giải trình tự ở cả hai đầu mút 5' và 3' của đoạn chèn, và các điểm nối tương ứng được xác định bằng cách sử dụng kỹ thuật chụp trình tự, làm giàu, giải trình tự, PCR nghịch đảo và bước đi hệ gen. Các trình tự ADN kẹp đối với sự kiện ngô MON87429 được lập bản đồ theo dạng lắp ráp vật lý hệ gen ngô đã biết. Thông tin trình tự vị trí chèn được sử dụng cho phép phân tích tin sinh học về vị trí nhiễm sắc thể của sự kiện. Tính toàn vẹn của vị trí chèn được xác định bằng PCR xuyên suốt các alen loại hoang dại bằng cách sử dụng các đoạn mồi đặc hiệu với các vùng

kep của sự kiện ngô MON87429. Vị trí chèn loại hoang dại được sử dụng để lập bản đồ vị trí tích hợp chuyển gen đơn nhất đối với sự kiện ngô MON87429 vào hệ gen tham chiếu của ngô. Để đảm bảo rằng không có sự thay đổi hoặc đột biến nào được đưa vào vùng bất kỳ của gen chuyển trong suốt quá trình biến nạp, toàn bộ đoạn chèn chuyển gen của sự kiện ngô MON87429 được phân lập từ cây và được giải trình tự. Thông tin trình tự của điểm nối 5', điểm nối 3' và đoạn chèn chuyển gen được đề xuất trong bản mô tả này ở dạng SEQ ID NO: 1-10.

Phép phân tích ARN về các cây chứa cấu trúc của sự kiện ngô MON87429 được thực hiện. Phép phân tích phương Bắc được thực hiện trên ARN tổng được phân lập từ hạt của cây bao gồm sự kiện ngô MON87429. Phương pháp này đã xác nhận kích cỡ và số lượng sản phẩm phiên mã của các sản phẩm ARN thông tin *pat*, *dmo*, *ft_t* và *cp4-epsps*. Mức độ biểu hiện ARN đối với CP4-EPSPS cũng được đo bằng phương pháp PCR thời gian thực bằng cách sử dụng các mẫu từ mô cây bao gồm sự kiện ngô MON87429. Phương pháp khuếch đại nhanh các đầu mút ADN bổ trợ (RACE) được sử dụng để nhận diện các sản phẩm phân cắt CP4-EPSPS để xác nhận rằng hiện tượng phân cắt sản phẩm phiên mã CP4-EPSPS chỉ xảy ra ở các bông cờ của cây bao gồm sự kiện ngô MON87429 và rằng hiện tượng này được kích hoạt bởi ARN cản trở nhỏ đặc hiệu với mô thực nội sinh của ngô (ARN cản trở nhỏ) theo phương thức đặc hiệu với trình tự. Phép phân tích phương Bắc trọng lượng phân tử thấp được thực hiện để chứng minh rằng không có ARN cản trở nhỏ của CP4-EPSPS nào mà có thể làm phương hại đến khả năng chống chịu glyphosat ở các mô không phải bông cờ.

Phép phân tích protein về cây chứa cấu trúc của sự kiện ngô MON87429 được thực hiện. Phương pháp giải trình tự protein đầu tận cùng N về các protein PAT, DMO, FT_T và CP4-EPSPS đã được biểu hiện được thực hiện bằng cách sử dụng chất chiết protein được tinh chế miễn dịch từ hạt để xác nhận trình tự axit amin đầu tận cùng N xác thực. Phép phân tích thẩm tách phương Tây được thực hiện trên chất chiết protein từ hạt bao gồm sự kiện ngô MON87429 để xác nhận rằng một loại protein có kích cỡ dự kiến đơn lẻ đang lần lượt được tạo ra đối với PAT, DMO, FT_T và CP4-EPSPS. ELISA được sử dụng để xác định mức protein ở lá, hạt giống, rễ và phần hoa của cây đối với các protein PAT, DMO, FT_T và CP4-EPSPS.

Ví dụ 6: Phát hiện sự kiện ngô MON87429

Việc phát hiện sự kiện ngô MON87429 trong mẫu có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các kỹ thuật phát hiện ADN, ARN hoặc protein. Các vật liệu và phương pháp phát hiện làm ví dụ được đề xuất dưới đây. Việc phát hiện có thể xác định sự có mặt hoặc vắng mặt của sự kiện ngô MON87429 trong mẫu. Việc phát hiện có thể biểu lộ số lượng bản sao hệ gen của sự kiện ngô MON87429 (đó là bán hợp tử, đồng hợp tử hoặc dị hợp tử) trong mẫu của ADN hệ gen.

Phương pháp khuếch đại nhiệt theo chỉ tiêu đặc hiệu với sự kiện Applied Biosystems™ TAQMAN® (Thermo Fisher Scientific) được phát triển để nhận diện sự kiện ngô MON87429 trong mẫu. Đoạn dò và đoạn mồi ADN được sử dụng trong thử nghiệm chỉ tiêu là các đoạn mồi SQ51062 (SEQ ID NO: 11), SQ51053 (SEQ ID NO: 12) và đoạn dò PB50370 được đánh dấu 6-FAM™ (SEQ ID NO: 13). 6-FAM là sản phẩm nhuộm huỳnh quang của Applied Biosystems (Foster City, CA) được gắn kết vào đoạn dò ADN. Đối với các đoạn dò TAQMAN MGB™, hoạt tính exonucleaza 5' của ADN polymeraza *Taq* phân cắt đoạn dò từ đầu mút 5', giữa hợp chất huỳnh quang và chất dập tắt. Khi được lai tạo với dải ADN đích, chất dập tắt và hợp chất huỳnh quang được tách ra đủ để tạo ra tín hiệu huỳnh quang, vì vậy mà giải phóng huỳnh quang. SQ51062 và SQ51053 khi được sử dụng với các phương pháp phản ứng này và PB50370 tạo ra sản phẩm khuếch đại ADN mà có tính chẩn đoán về sự kiện ngô MON87429. Các đối chứng dùng cho phép phân tích này cần phải bao gồm đối chứng dương bao gồm sự kiện ngô MON87429, đối chứng âm từ ngô không chuyển gen và đối chứng âm không chứa ADN khuôn mẫu. Ngoài ra, tối ưu là, đối chứng dùng cho phản ứng PCR cần phải bao gồm Đoạn mồi Đối chứng Bên trong và Đoạn dò Đối chứng Bên trong, đặc hiệu với một gen bản sao đơn lẻ trong hệ gen của ngô. Các thử nghiệm này được tối ưu hóa để sử dụng với Applied Biosystems GeneAmp® PCR System 9700 (Thermo Fisher Scientific) được chạy ở vận tốc tối đa, nhưng có thể sử dụng thiết bị khác.

Một ví dụ về các điều kiện hữu ích với các phương pháp TAQMAN để phát hiện sự kiện ngô MON87429 là như sau. Bước 1: nước 18 triệu ôm được điều chỉnh để có thể tích cuối cùng là 5µl. Bước 2: 2,28µl Universal Master Mix 2X (dNTP, enzym, chất đệm) đến nồng độ cuối cùng 1X. Bước 3: 0,05µl đoạn mồi sự kiện-1 (SQ51062) và đoạn mồi sự kiện-2 (SQ51053) (được tái tạo huyền phù trong nước 18 triệu ôm đến nồng độ là 100uM đối với

mỗi đoạn môi) đến nồng độ cuối cùng $0,9\mu\text{M}$. Bước 4: $0,01\mu\text{l}$ đoạn môi sự kiện 6-FAM MGB PB50370 (được tái tạo huyền phù trong nước 18 triệu ôm đến nồng độ là $100\mu\text{M}$) đến nồng độ cuối cùng $0,2\mu\text{M}$. Bước 5: $0,05\mu\text{l}$ hỗn hợp đoạn môi đối chứng bên trong-1 và đoạn môi đối chứng bên trong-2 (được tái tạo huyền phù trong nước 18 triệu ôm đến nồng độ là $100\mu\text{M}$ đối với mỗi đoạn môi) đến nồng độ cuối cùng $0,9\mu\text{M}$. Bước 6: $0,01\mu\text{l}$ đoạn môi đối chứng bên trong VIC™ (được tái tạo huyền phù trong nước 18 triệu ôm đến nồng độ là $100\mu\text{M}$) đến nồng độ cuối cùng $0,2\mu\text{M}$. Bước 7: $2,5\mu\text{l}$ ADN được chiết (khuôn mẫu) của mỗi mẫu với một trong các mẫu sau bao gồm: (a) các mẫu lá cần phân tích; (b) đối chứng âm (ADN không chuyển gen); (c) đối chứng nước âm (không có khuôn mẫu); và (d) ngô đối chứng dương chứa ADN sự kiện ngô MON87429. Bước 8: Điều kiện máy luân nhiệt như sau: một chu kỳ ở 95°C trong 20 giây; bốn mươi chu kỳ 95°C trong 3 giây, sau đó, 60°C trong 20 giây; và chu kỳ cuối cùng là 10°C .

Thử nghiệm về đặc tính hợp tử được phát triển để xác định xem liệu cây trồng bao gồm sự kiện ngô MON87429 là dị hợp tử hay đồng hợp tử đối với sự kiện hoặc alen loại hoang dại. Có thể thiết kế thử nghiệm phản ứng khuếch đại bằng cách sử dụng thông tin trình tự được đề xuất trong bản mô tả này. Ví dụ, thử nghiệm PCR như vậy thường bao gồm kiểu thiết kế của ít nhất ba đoạn môi: đoạn môi-1, đoạn môi-2 và đoạn môi-3, trong đó đoạn môi-1 đặc hiệu với ADN hệ gen của ngô trên phần kẹp 3' của sự kiện ngô MON87429; đoạn môi-2 là đặc hiệu với đoạn chèn chuyển gen sự kiện ngô MON87429; và đoạn môi-3 là đặc hiệu với alen loại hoang dại. Khi được sử dụng làm cặp đoạn môi trong phản ứng khuếch đại, đoạn môi-1 với đoạn môi-2 sẽ tạo ra sản phẩm khuếch đại PCR đặc hiệu với sự kiện ngô MON87429. Khi được sử dụng làm cặp đoạn môi trong phản ứng khuếch đại, thì đoạn môi-1 với đoạn môi-3 sẽ tạo ra sản phẩm khuếch đại PCR đặc hiệu với alen loại hoang dại. Trong phản ứng PCR được thực hiện trên ADN hệ gen ngô, các sản phẩm khuếch đại PCR tương ứng được tạo ra từ đoạn môi-1 + đoạn môi-2 và sản phẩm khuếch đại PCR được tạo ra từ đoạn môi-1 + đoạn môi-3 sẽ khác biệt về trình tự và kích cỡ của sản phẩm khuếch đại. Khi ba đoạn môi được lấy vào trong phản ứng PCR với ADN được chiết từ cây đồng hợp tử với sự kiện ngô MON87429, thì chỉ có sản phẩm khuếch đại đoạn môi-1 + đoạn môi-2 (đặc hiệu với đoạn chèn MON87429 của ngô) sẽ được tạo ra. Khi ba đoạn môi được lấy vào phản ứng PCR với ADN được chiết từ cây dị hợp tử đối với sự kiện ngô MON87429, thì cả sản phẩm khuếch đại đoạn môi-1 + đoạn môi-2 (đặc hiệu với đoạn chèn MON87429 của ngô) và sản phẩm khuếch đại đoạn môi-1 + đoạn môi-3 (đặc hiệu

với alen loại hoang dại hoặc sự vắng mặt của đoạn chèn MON87429 của ngô) sẽ được tạo ra. Khi ba đoạn môi được trộn cùng nhau trong phản ứng PCR với ADN được chiết từ cây mà khuyết thiếu đối với sự kiện ngô MON87429 (đó là loại hoang dại), thì chỉ có sản phẩm khuếch đại đoạn môi-1 + đoạn môi-3 (đặc hiệu với alen loại hoang dại) sẽ được tạo ra. Các sản phẩm khuếch đại được tạo ra bằng cách sử dụng phản ứng PCR có thể được nhận diện hoặc phân biệt bằng cách sử dụng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Một thử nghiệm về tính hợp tử khác đối với sự kiện ngô MON87429 là phản ứng khuếch đại nhiệt TAQMAN. Đối với loại thử nghiệm này, ngoài các đoạn môi như được mô tả ở trên ra, thử nghiệm này thường bao gồm hai đoạn dò được đánh dấu huỳnh quang. Đoạn dò-1 thường là đặc hiệu với sự kiện ngô MON87429, và đoạn dò-2 thường là đặc hiệu với cây ngô mà khuyết thiếu đối với sự kiện ngô MON87429 (loại hoang dại) và trong đó hai đoạn dò chứa các chất đánh dấu huỳnh quang khác nhau, ví dụ như chất đánh dấu 6-FAM hoặc chất đánh dấu VIC™. Khi được sử dụng trong phản ứng TAQMAN, đoạn môi-1 + đoạn môi-2 + đoạn dò-1 sẽ tạo ra tín hiệu huỳnh quang thứ nhất đặc hiệu với sự kiện ngô MON87429 và đoạn môi-1 + đoạn môi-3 + đoạn dò-2 sẽ tạo ra tín hiệu huỳnh quang thứ hai đặc hiệu với ngô loại hoang dại. Khi ba đoạn môi và hai đoạn dò được lấy vào phản ứng TAQMAN với ADN được chiết từ cây đồng hợp tử với sự kiện ngô MON87429, thì chỉ có tín hiệu huỳnh quang thứ nhất (đặc hiệu với đoạn môi-1 + đoạn môi-2 + đoạn dò-1) sẽ được tạo ra. Khi ba đoạn môi được lấy vào phản ứng TAQMAN với ADN được chiết từ cây dị hợp tử với sự kiện ngô MON87429, thì cả tín hiệu huỳnh quang thứ nhất (đặc hiệu với đoạn môi-1 + đoạn môi-2 + đoạn dò-1) và tín hiệu huỳnh quang thứ hai (đặc hiệu với đoạn môi-1 + đoạn môi-3 + đoạn dò-2) sẽ được tạo ra. Khi ba đoạn môi được trộn cùng nhau trong phản ứng TAQMAN với ADN được chiết từ cây mà khuyết thiếu đối với sự kiện ngô MON87429 (loại hoang dại), thì chỉ có tín hiệu huỳnh quang thứ hai (đặc hiệu với đoạn môi-1 + đoạn môi-3 + đoạn dò-2) sẽ được tạo ra.

Một phương pháp khác để phát hiện sự có mặt của sự kiện ngô MON87429 trong mẫu cây thường là phép phân tích phương Nam. Chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ hiểu cách thiết kế (các) đoạn dò lai tạo phương Nam đặc hiệu với sự kiện ngô MON87429 và đoạn dò lai tạo phương Nam thứ hai đặc hiệu với cây ngô mà khuyết thiếu với sự kiện ngô MON87429 (loại hoang dại). Với phép phân tích phương Nam, tín hiệu chỉ được phát hiện từ đoạn dò lai tạo phương Nam thứ nhất sẽ có tính chỉ báo về cây đồng hợp tử với sự kiện ngô MON87429; tín hiệu được phát hiện từ cả đoạn dò lai tạo phương Nam thứ nhất và

đoạn dò lai tạo phương Nam thứ hai sẽ có tính chỉ báo về cây dị hợp tử với sự kiện ngô MON87429; và tín hiệu chỉ được phát hiện từ đoạn dò lai tạo phương Nam thứ hai sẽ có tính chỉ báo rằng ADN được chiết từ cây mà khuyết thiếu đối với sự kiện ngô MON87429 (loại hoang dại).

Một ví dụ khác về kit phát hiện bao gồm ít nhất một kháng thể đặc hiệu với ít nhất một protein được mã hóa bởi sự kiện ngô MON87429. Ví dụ, kit như vậy có thể sử dụng một dải dòng chảy bên bao gồm các chất phản ứng được hoạt hóa khi đầu của dải được tiếp xúc với dung dịch nước. Các protein làm ví dụ đủ để sử dụng trong sản xuất kháng thể là những protein được mã hóa bởi trình tự được đề xuất ở dạng SEQ ID NO: 10 hoặc mảnh bất kỳ của nó.

Một phương pháp phát hiện protein được phát triển để xác định xem liệu một mẫu nào đó là từ cây, hạt giống, tế bào hay bộ phận của cây bao gồm sự kiện ngô MON87429. Ít nhất một kháng thể đặc hiệu với ít nhất một protein được mã hóa bởi sự kiện ngô MON87429 được sử dụng để phát hiện protein được mã hóa bởi sự kiện ngô MON87429 trong mẫu. Kit phát hiện bao gồm một hoặc nhiều kháng thể đặc hiệu với một hoặc nhiều protein được mã hóa bởi sự kiện ngô MON87429 có thể sử dụng dải dòng chảy bên chứa chất phản ứng được hoạt hóa khi đầu dải tiếp xúc với dung dịch nước. Các mẫu mô ngô có thể được nghiền nát và protein được chiết để phân tích bằng cách sử dụng nước hoặc chất đệm nước (ví dụ, dung dịch muối đệm phosphat chứa chất tẩy và albumin huyết thanh bò). Sau khi ly tâm, phần nổi ở trên chứa nước được phân tích bằng cách sử dụng phương pháp ELISA theo dạng thức bánh kẹp trên dải dòng chảy bên chứa miếng hấp thụ. Quá trình phát hiện được kích hoạt bằng cách nhúng đầu của dải vào dung dịch nước chứa mẫu cần kiểm tra. Dung dịch nước được đưa lên dải bằng tác dụng mao dẫn và hòa tan các kháng thể được đánh dấu bằng vàng trên dải. Các kháng thể được đánh dấu bằng vàng là đặc hiệu với ít nhất một protein được mã hóa bởi sự kiện ngô MON87429 và sẽ liên kết với epitop trên protein trong mẫu để tạo thành phức hợp kháng nguyên-kháng thể. Sau đó, phức hợp kháng thể được đánh dấu bằng vàng-kháng nguyên được đưa lên dải đến màng nitroxenluloza. Màng này bao gồm một dòng thử nghiệm các kháng thể bất động mà liên kết với epitop tách biệt thứ hai trên protein được mã hóa bởi sự kiện ngô MON87429, làm cho dòng nhìn thấy xuất hiện trên dải xét nghiệm nếu protein được mã hóa bởi sự kiện ngô MON87429 có mặt trong mẫu.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phân tử ADN tái tổ hợp bao gồm trình tự được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:2, và SEQ ID NO:1.

2. Phân tử ADN tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó

- a) phân tử ADN này bao gồm SEQ ID NO: 1 và SEQ ID NO: 2; hoặc
- b) phân tử ADN này bao gồm SEQ ID NO: 3 và SEQ ID NO: 4.

3. Phân tử ADN tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó phân tử ADN tái tổ hợp này là sản phẩm khuếch đại có tính chẩn đoán về sự có mặt của sự kiện ngô MON87429.

4. Cây ngô, hạt giống ngô, tế bào ngô, bộ phận của cây ngô hoặc sản phẩm hàng hóa ngô bao gồm phân tử ADN bao gồm trình tự được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8 và SEQ ID NO:10.

5. Cây ngô, hạt giống ngô, tế bào ngô, hoặc bộ phận của cây ngô theo điểm 4, trong đó cây ngô, hạt giống ngô, tế bào ngô, hoặc bộ phận của cây ngô này bao gồm khả năng chống chịu với ít nhất một thuốc diệt cỏ được chọn từ nhóm gồm chất ức chế axetyl CoA carboxylaza (ACCaza) trong nhóm aryloxyphenoxy propionat (FOP), auxin tổng hợp, chất ức chế glutamin syntetaza, và chất ức chế 5-enolpyruvylshikimat-3-phosphat syntaza (EPSPS), hoặc dạng kết hợp bất kỳ của chúng.

6. Cây ngô, hạt giống ngô, tế bào ngô, hoặc bộ phận của cây ngô theo điểm 5, trong đó cây ngô, hạt giống ngô, tế bào ngô, hoặc bộ phận của cây ngô này có khả năng chống chịu với với quizalofop, haloxyfop, dicamba, 2,4-D, glufosinat và glyphosat.

7. Phương pháp kiểm soát cỏ dại trong khu vực trồng trọt bao gồm:

a) trồng ngô bao gồm sự kiện ngô MON87429 trong khu vực trồng trọt, trong đó mẫu tiêu biểu của hạt giống bao gồm sự kiện đã được nộp lưu với số truy cập ATCC PTA-124635; và

b) áp dụng cho khu vực trồng trọt, hoặc bất kỳ phần nào trong số đó, một lượng hữu hiệu của ít nhất một loại thuốc diệt cỏ được chọn từ nhóm gồm các chất ức chế axetyl CoA carboxylaza (ACCaza) trong nhóm aryloxyphenoxy propionat (FOP), auxin tổng hợp, chất ức chế glutamin syntetaza và chất ức chế 5-enolpyruvylshikimat-3-phosphat syntaza (EPSPS) hoặc dạng kết hợp bất kỳ của chúng, để kiểm soát cỏ dại trong khu vực mà không làm tổn thương ngô.

8. Phương pháp theo điểm 7, trong đó việc áp dụng lượng hữu hiệu của ít nhất một thuốc diệt cỏ bao gồm áp dụng ít nhất hai hoặc nhiều thuốc diệt cỏ được chọn từ nhóm gồm chất ức chế axetyl CoA carboxylaza (ACCaza) trong nhóm aryloxyphenoxy propionat (FOP), auxin tổng hợp, chất ức chế glutamin syntetaza, và chất ức chế 5-enolpyruvylshikimat-3-phosphat syntaza (EPSPS) trong mùa trồng trọt.

9. Phương pháp theo điểm 7, trong đó việc áp dụng lượng hữu hiệu của ít nhất một thuốc diệt cỏ bao gồm áp dụng thuốc diệt cỏ được chọn từ nhóm gồm quizalofop, haloxyfop, dicamba, 2,4-D, glufosinat, và glyphosat, hoặc dạng kết hợp bất kỳ của chúng.

10. Phương pháp theo điểm 9, trong đó lượng hữu hiệu của dicamba là khoảng 0,5 pao (0,25kg) đương lượng axit/mẫu Anh đến khoảng 2 pao (1kg) đương lượng axit/mẫu Anh của dicamba trong mùa trồng trọt, hoặc trong đó lượng hữu hiệu của glufosinat là khoảng 0,4 pao (0,2kg) thành phần có hoạt tính/mẫu Anh đến khoảng 1,59 pao (0,795kg) thành phần có hoạt tính/mẫu Anh trong mùa trồng trọt, hoặc trong đó lượng hữu hiệu của 2,4-D là khoảng 0,75 pao (0,375kg) đương lượng axit/mẫu Anh đến 1,0 pao (0,5kg) đương lượng axit/mẫu Anh trong mùa trồng trọt, hoặc trong đó lượng hữu hiệu của quizalofop là khoảng 0,034 pao (0,017kg) thành phần có hoạt tính/mẫu Anh đến khoảng 0,083 pao (0,0415kg) thành phần có hoạt tính/mẫu Anh trong mùa trồng trọt, hoặc trong đó lượng hữu hiệu của haloxyfop là khoảng 0,018 pao (0,009kg) thành phần có hoạt tính/mẫu Anh đến khoảng 0,07 pao (0,035kg) thành phần có hoạt tính/mẫu Anh trong mùa trồng trọt.

11. Phương pháp sản xuất cây ngô bao gồm khả năng chống chịu với ít nhất một thuốc diệt cỏ được chọn từ nhóm gồm chất ức chế axetyl CoA carboxylaza (ACCaza) trong nhóm aryloxyphenoxy propionat (FOP), auxin tổng hợp, chất ức chế glutamin syntetaza, và chất ức chế 5-enolpyruvylshikimat-3-phosphat syntaza (EPSPS), hoặc dạng kết hợp bất kỳ của chúng, phương pháp này bao gồm:

- a) nhân giống cây ngô bao gồm sự kiện ngô MON87429 với chính nó hoặc một cây thứ hai để sản xuất hạt giống, trong đó mẫu tiêu biểu của hạt giống bao gồm sự kiện đã được nộp lưu với số truy cập ATCC PTA-124635; và
- b) nhận diện hạt giống ngô thế hệ con bao gồm sự kiện ngô MON87429.

12. Phương pháp theo điểm 11, trong đó việc nhận diện hạt giống ngô thế hệ con bao gồm sự kiện ngô MON87429 bao gồm:

- a) trồng hạt giống ngô thế hệ con để sản xuất các cây thế hệ con;
- b) xử lý các cây ngô thế hệ con bằng một lượng hữu hiệu của ít nhất một thuốc diệt cỏ được chọn từ nhóm gồm quizalofop, haloxyfop, dicamba, 2,4-D, glufosinat, và glyphosat, hoặc dạng kết hợp bất kỳ của chúng; và
- c) chọn cây ngô thế hệ con mà chống chịu với ít nhất một thuốc diệt cỏ được chọn từ nhóm gồm chất ức chế axetyl CoA carboxylaza (ACCaza) trong nhóm aryloxyphenoxy propionat (FOP), auxin tổng hợp, chất ức chế glutamin syntetaza, và chất ức chế 5-enolpyruvylshikimat-3-phosphat syntaza (EPSPS), hoặc dạng kết hợp bất kỳ của chúng.

13. Phương pháp theo điểm 11, trong đó việc nhận diện hạt giống ngô thế hệ con mà bao gồm sự kiện ngô MON87429 bao gồm việc phát hiện sự có mặt của sự kiện ngô MON87429 trong mẫu được tạo ra từ hạt giống ngô thế hệ con hoặc trong đó việc nhận diện hạt giống ngô thế hệ con mà bao gồm sự kiện ngô MON87429 bao gồm việc phát hiện sự có mặt của ít nhất một protein được mã hóa bởi sự kiện ngô MON87429 trong mẫu được tạo ra từ hạt giống ngô thế hệ con.

14. Phương pháp sản xuất hạt giống ngô lai bao gồm:

- a) trồng cây ngô chứa SEQ ID NO: 10;
- b) áp dụng một lượng hữu hiệu của glyphosat trước hoặc trong quá trình phát triển mô sinh sản đực của cây ngô, nhờ đó kích thích tình trạng bất dục đực ở cây ngô;

- c) thụ phấn cho cây ngô bằng phấn hoa từ cây ngô thứ hai; và
- d) thu hoạch hạt giống ngô lai từ cây ngô.

15. Phương pháp theo điểm 14, trong đó việc áp dụng lượng hữu hiệu của glyphosat bao gồm việc áp dụng glyphosat trước hoặc trong quá trình phát triển với lượng hữu hiệu là khoảng 0,5 pao (0,25kg) đương lượng axit/mẫu Anh đến khoảng 2,5 pao (1,25kg) đương lượng axit/mẫu Anh.

16. Phương pháp theo điểm 14, trong đó việc áp dụng lượng hữu hiệu của glyphosat bao gồm việc áp dụng glyphosat ở giai đoạn phát triển được chọn từ nhóm gồm giai đoạn V4, V5, V6, V7, V8, V9, V10, V11, V12, V13 và V14 của quá trình phát triển cây ngô.

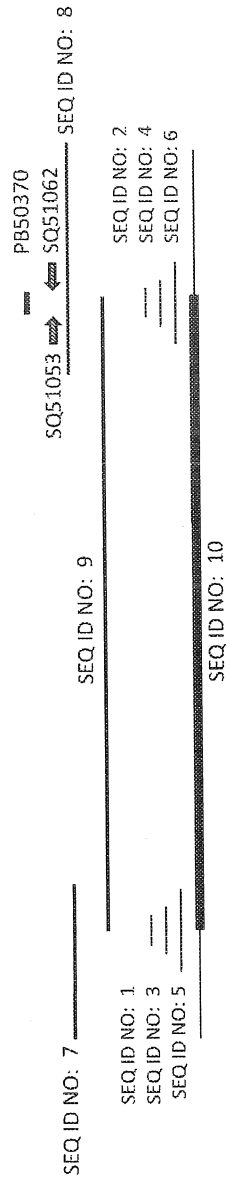
17. Hạt giống ngô lai được sản xuất bằng phương pháp theo điểm 14, trong đó hạt giống ngô lai bao gồm SEQ ID NO: 10.

18. Phương pháp xác định tính hợp tử của cây ngô đối với sự kiện ngô MON87429 bao gồm:

- a) cho mẫu chứa ADN được tạo ra từ cây ngô tiếp xúc với tập hợp đoạn mồi có khả năng tạo ra sản phẩm khuếch đại thứ nhất có tính chẩn đoán về sự có mặt của ngô MON87429 và sản phẩm khuếch đại thứ hai có tính chẩn đoán về ADN hệ gen ngô loại hoang dại không bao gồm sự kiện ngô MON87429;
- b) thực hiện phản ứng khuếch đại axit nucleic; và
- c) phát hiện sản phẩm khuếch đại thứ nhất và sản phẩm khuếch đại thứ hai, trong đó sự có mặt của cả hai sản phẩm khuếch đại này thể hiện mẫu có tính dị hợp tử đối với sự kiện ngô MON87429 và sự có mặt của chỉ sản phẩm khuếch đại thứ nhất thể hiện mẫu có tính đồng hợp tử đối với sự kiện ngô MON87429, trong đó mẫu tiêu biểu của hạt giống bao gồm sự kiện đã được nộp lưu với số truy cập ATCC PTA-124635.

19. Phương pháp theo điểm 18, trong đó tập hợp đoạn mồi bao gồm SEQ ID NO: 11 và SEQ ID NO: 12.

1 / 3

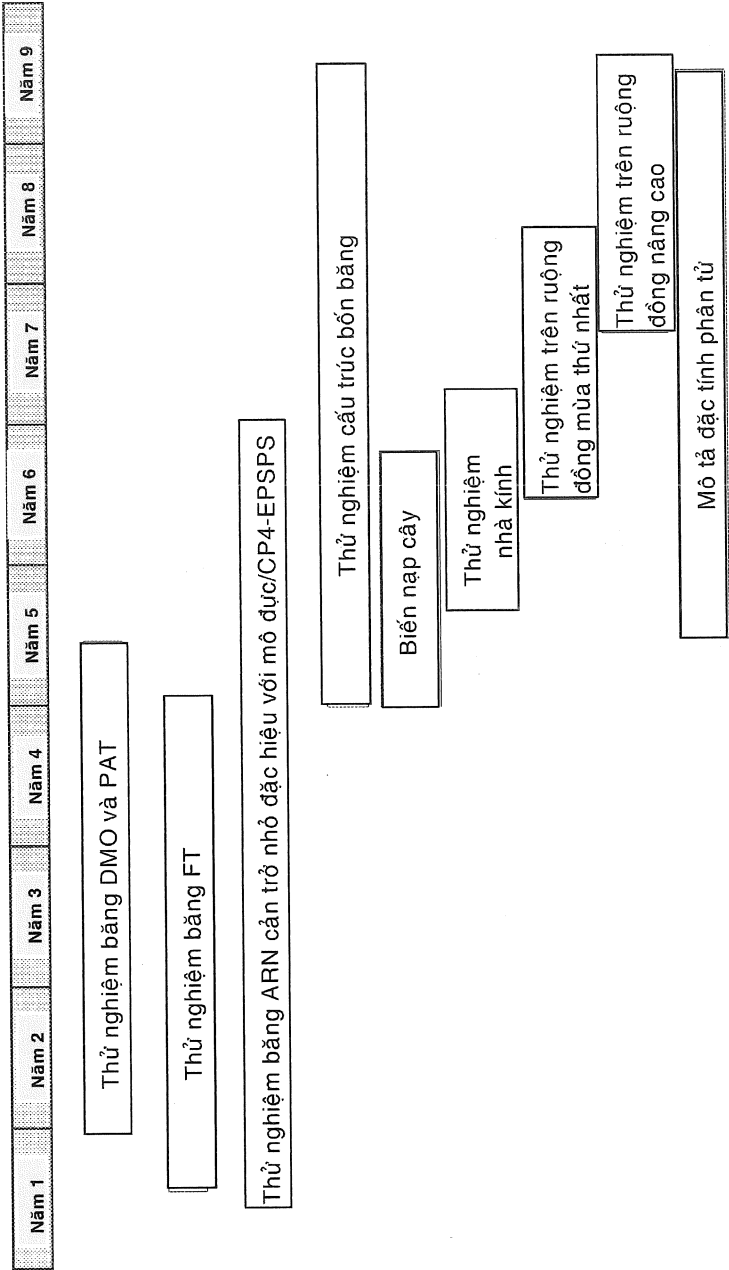


Hình 1

SEQ ID NO: 9

LB	PAT	DMO	FT	CP4-EPSPS	RB
P-I-Ea.ubq	Sv.pat	T-Si.fba	P-I-Clj.ubq	P-L-CaMV.35S	L-Ta.Cab + I-Os.ractI
		TS-At.opg6 + Sm.dmo	T-Os.mt	TS-At.MDH + Sh.ft_t	T-Os.nam
			P-I-Ad.ubq		TS-At.CTP2 + cp4epsps
					mts-siRNA
					T-Os.grp3

Hình 2



Hình 3

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Monsanto Technology LLC

<120> Phân tử ADN tái tổ hợp, cây, hạt giống, tế bào ngô hoặc bộ phận của cây ngô chứa phân tử này, phương pháp kiểm soát cỏ dại, phương pháp sản xuất cây ngô và hạt giống ngô lai và phương pháp xác định tính hợp tử của cây ngô đối với sự kiện ngô MON87429

<130> MONS:430WO

<160> 13

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Phân tử ADN thể khảm của ADN hệ gen của ngô và ADN gen chuyển

<400> 1

ccactcttgt ttggtttcat gtccgggaaa

30

<210> 2

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Phân tử ADN thể khảm của ADN hệ gen của ngô và ADN gen chuyển

<400> 2

cggtgcacaa actatagcaa gtgtggtcta

30

<210> 3

<211> 60

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Phân tử ADN thể khảm của ADN hệ gen của ngô và ADN gen chuyển

<400> 3

acttgcaaaa atagaccact cttgttttgt ttcattgtccg ggaaatctac atggatcagc

60

<210> 4

<211> 60

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Phân tử ADN thể khảm của ADN hệ gen của ngô và ADN gen chuyển

<400> 4
 gcacaacaaa cgcaccggtg cacaaactat agcaagtgtg gtctatTTTT atataGcaag 60

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

<220>
 <223> Phân tử ADN thể khảm của ADN hệ gen của ngô và ADN gen chuyển

<400> 5
 agatactctt gtttggttac acttgcaaaa atagaccact cttgtttggt ttcattgtccg 60
 ggaaatctac atggatcagc aatgagtatg atggtcaata 100

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

<220>
 <223> Phân tử ADN thể khảm của ADN hệ gen của ngô và ADN gen chuyển

<400> 6
 atgacgtccc gcgatcgccc gcacaacaaa cgcaccggtg cacaaactat agcaagtgtg 60
 gtctatTTTT atataGcaag tgaggtcaga taaaataata 100

<210> 7
 <211> 1350
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Phân tử ADN thể khảm của ADN hệ gen của ngô và ADN gen chuyển

<400> 7
 atctacaggg cgcgcagcgg ctgacacatg ggaccacgg gcaaaggcag cggcagactc 60
 gcgcgcgaga gcacgcaagc accgattgac gcgcgtgccc cttttgtcgg agaacgaggg 120
 tgccgcatcg tccgtgcatg gttgagacgg ccaggcgggg cccacccatt ggcgccatgc 180
 cgcgcgagca gcagctggcc cgcacaggtg caaagggtga gtgggctaga agcgaagacc 240
 tagtccaagc gacggtttct tccttttttc tctttttttc tttttccttt atattttctt 300
 gttttatttt attttcattt ttttattttc aaatctaaat ttgaactcaa gtgtgagatt 360
 catactttga attaaatgct cacattcaaa tatcagtagg aatagaatat ttttaactat 420
 atgtttattt tctctatttt atacaatctt ttcctttttt cattttttaa cctcaatttg 480
 taaattatat ctaaattcca attttgggtca ttagtatact cctactaata tcattttatt 540
 gttatgaaat gcacacacaa taaactccaa cttgatgaat agatatctat ttatttctaat 600

taattttat	gtttggtaga	tggtcaaaat	atgaaacaca	cacatattgt	tttctttctt	660	
tttagaaaa	tggtat	tttt	attgtgggac	aagaactaaa	agtcacctca	aaattaaata	720
ctcatgtata	atttgggata	tctgaattta	ctat	ttttttat	ttcttcatat	atttaattta	780
ttattaat	ttttcttat	tgggccttac	acttatgaga	tcatagaggc	atgtggatca		840
gtggcataca	agttgaaatt	actgccaaaa	atgtctgtca	tacacaatcc	gtgtgtttgg		900
tttgtggacc	agcagagcct	ggctactcta	atccgtatgt	agagaaccaa	gctcccacga		960
gacagactca	atgtatccga	gatactcttg	tttggttaca	cttgcaaaaa	tagaccactc		1020
ttgtttggtt	tcatgtccgg	gaaatctaca	tggtatcagca	atgagtatga	tggtcaatat		1080
ggagaaaaag	aaagagtaat	taccaat	ttttcaattc	aaaaatgtag	atgtccgcag		1140
cgttattata	aatgaaagt	acat	ttttgat	aaaacgacaa	attacgatcc	gtcgtattta	1200
taggcgaaag	caataaacia	attattctaa	ttcggaaatc	tttatttcga	cgtgtctaca		1260
ttcacgtcca	aatgggggct	tagatgagaa	acttcacgat	ttggcgcgac	taactaagca		1320
ctagcgtacg	ggaccagat	atcgaattca					1350

<210> 8

<211> 1069

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Phân tử ADN thể khảm của ADN hệ gen của ngô và ADN gen chuyển

<400> 8

gatcgccgc	acaaciaacg	caccggtgca	caaactatag	caagtgtggt	ctat	tttttat	60
atagcaagtg	aggtcagata	aaataataaa	taaaatcatt	aaat	ttttata	tagcaagtgt	120
ggtctat	tttt	tgcttgtaaa	ctacagagaa	tatatatatg	ttaaatcggg	agaacaattg	180
gctatt	taaa	ctaaaagatt	taaaaaaaac	aaagataaaa	aatgtttttg	aactgcgtgt	240
ctcgagagca	gccagcatgc	ttccgacctg	catgagcagc	gatgctcctg	gtgaccgcac		300
gaacggaacc	tgccccgatg	gatgat	ttttg	catcaacagc	gcctgtatgc	aacgatcatc	360
caaccaaaca	tacttcgctt	tgaggatcca	cgctacaac	gtccgcgctc	gtccatgcaa		420
ccaaacacac	ggaatgtggt	ccatgtgtcc	caattgaaag	aagtgtattc	ggttaacaac		480
ggaagtcata	accgagccag	atatagagat	agaaccagat	ctatcatacc	agaacacccc		540
ctccaagatt	ctagactgca	aggaaagatc	cactcgtgcg	aagacgacca	agatgtataa		600
gatccaatgg	agcaaccata	cggaagaaga	ggctacgtgg	gagactgagg	attatctatg		660
caaatactac	cccgattgtc	tacctaagga	agtcagtagc	taaccatgcc	ccagccccct		720

gccctccgat tccaaatata gaaaagatac tcttaatgaa aactgaatta agaaatgaaa 780
 ttaagcgaag aaggacttcc ttctgaagtt gcaaagagga tggcattcga agagcagatt 840
 tttctcgcga accttaaaaa gctaaccaat actatgcaag caagctataa ccacctctc 900
 actcctgggt gatctcgact cgaatctcgg ggcgagattc ttttaagggg ggagagctgt 960
 aacaccccag gtgttactta gggtttcccc cttagtagct ccatthgtga cctattatca 1020
 catgtgggtt ggtttaagaa aaaggcacca aacttgaggg gccaaagccc 1069

<210> 9

<211> 14008

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn chèn gen chuyển

<400> 9

ttcatgtccg ggaaatctac atggatcagc aatgagtatg atggtcaata tggagaaaaa 60
 gaaagagtaa ttaccaattt tttttcaatt caaaaatgta gatgtccgca gcgttattat 120
 aaaatgaaag tacattttga taaaacgaca aattacgacg cgtcgtattt ataggcgaaa 180
 gcaataaaca aattattcta attcggaat ctttatttcg acgtgtctac attcacgtcc 240
 aaatgggggc ttagatgaga aacttcacga tttggcgca ctaactaagc actagcgtac 300
 gggaccaga tatcgaattc aagctgaccg ccaccggcaa acaaccacga atttgtaatg 360
 gtactaggca aattctccgt ttggcgggtgt gtgccggcca attacacgtt tttgcgggtg 420
 cctccgacaa aatttgcctt ttaaaaacaa ttttataaga gaagctccgg agataaaagg 480
 ccgtcaatgt tacaagagtg aagtcgtcta ctccctccat ccaaaaaaat gtaattctaa 540
 gtatgagttg tattattatt tttggacaaa aggagtatac cacaagaatg atatcatcgt 600
 catgcttaga tccttttttag taaagcttga gcttctctaa aagtagagaa attagaaaaa 660
 aatcacgttt ttgtggtcct gatttctagc ctccacaaaa tctttgggtt tacatttttt 720
 gtttgatttt ggtttcagaa gtccttattt atatgtgcta gtttggcagc acttaaaatc 780
 gttagagaga gcctaaacaa aagccttttc aaaacgacct tgagccagat tggttgatgg 840
 ccaaaatttg attgtcaaaa cttaggcaag ccaagatttt agcagctatt tggtttggtg 900
 ccaaaatttg ccaatgatct gttcttttgc cttttcaacc ggtttatcag ccgtacttca 960
 gcttattctc tctcacagaa cactattgaa tcagccgaaa agccaccgca gaacaggacc 1020
 agtatctcac aaatggcatg ccaaataac tcaccgtcag tgagcccgtt taacggcgctc 1080
 gacaagtcta acggccacca accagcgaac caccagcgtc aagctagcca agcgaagcag 1140

acggccgaga cgttgacacc ttggcgcggg catctctctg gccccctctc gagagttccg	1200
ctccacctcc actggtggcg gtttccaagt ccgttccgcc tcctgctcct cctcacacgg	1260
cacgaaaccg tcacggcacc ggcagcacgg gggattcctt tcccaccgct ccttcccttt	1320
cccttcctcg cccgccgttt taaatagcca gccccatccc cagcttctct ccccaacctc	1380
agcttctctc gttgttcgga gcgcacacac aaccgatcc ccaatcccct cgtctctcct	1440
cgcgagcctc gtcgatcccc gcttcaaggc acggcgatca tcctcccttt ctctaccttc	1500
tcttctctag actaggtcgg cgatccatgg ttagggcctg ctagttctgt tcctgttttt	1560
ccgtggctgc gaggtacaat agatctgatg gcgttatgat ggtaacttg tcatactcct	1620
gcggtgtgcg gtctatagtg cttttaggac atcaatttga cctggctcgt tcgagatcgg	1680
cgatccatgg ttaggaccct aggcggtgga gtcggggttag atccgcgctg tttgtgttag	1740
tagatggatg cgacctttac ttcagacacg ttctgattgt taacttgtca gcacctggga	1800
gtcctgggat ggttctagct ggttcgcaga tgagatcgat ttcatgatct gctgtatctt	1860
gtttcgttag gttcctttta atctatccgt ggtattatgc taacctatga tatggttcga	1920
tcgtgctagc tacgtcctgt gtcataattt ttagcatgcc cttttttgtt tggttttgtc	1980
tgattgggct gtagatcaga gtatactgtt tcaaactacc tactggatat atttattaaa	2040
tttgaatctg tatgtgtgtc acatatatct tcataattaa aatggatgga aagatatatg	2100
gataggtaca tgtgttgctg tgggtttttac tgggtactttg ttagatatac atgcttagat	2160
acatgaagca acatgatgtt acagttcaat aattcttggt tacctaataa acaaataagg	2220
ataggtgtat gttgctgtgg gttttgctgg tactttgtta gatatatatg cttagatata	2280
tgaagcaaca tcctgctacg gtttaataat tattgtttat atctaataga caagcctgct	2340
ttttaattat tttgatatac ttggatgatg gcatacagca gctatgtgtg gatttttaaa	2400
taccagcat catgagcatg catgaccctg ccttagtatg ctgtttatct gcttgagact	2460
tctttttttg ttggtactca ccttttgtag tttggtgact cttctgcagg tgcaaccatg	2520
tctccggaga ggagaccagt tgagattagg ccagctacag cagctgatat ggccgcggtt	2580
tgtgatatcg ttaaccatta cattgagacg tctacagtga actttaggac agagccacaa	2640
acaccacaag agtggattga tgatctagag aggttgcaag atagataccc ttggttggtt	2700
gctgagggtg aggggtgtgt ggctggtatt gcttacgctg ggccctggaa ggctaggaac	2760
gcttacgatt ggacagttga gagtactgtt tacgtgtcac ataggcatca aagggtgggc	2820
ctaggatcca cattgtacac acatttgctt aagtctatgg aggcgcaagg ttttaagtct	2880
gtgggttgctg ttataggcct tccaaacgat ccatctgtta ggttgcatga ggctttggga	2940

tacacagccc ggggtacatt gcgcgcagct ggatacaagc atggtggatg gcatgatgtt 3000
ggtttttggc aaagggattt tgagttgcca gctcctccaa ggccagttag gccagttacc 3060
cagatctgat acgcgctgct agtagccaag tacctacctc gagggcacac tgtaggcagt 3120
gtgccatatt acaggttcag attggccggg acaaagagta cactgcgatt ttactatcct 3180
cggtatgctg gtactacagg ttcacattca catggttact acctggcctg tggtatgctg 3240
gtactacagg tgttgctctg aatagctcag gcttgaccca agtaagagca gtgcaaattc 3300
ccaatttcca gaaaacagga ggacctccaa aggacttcaa tgtaattcaa atttctttca 3360
gaggtccttt tgcaaggggc tggatgtaaa gtacttttat aataatccaa gccattgtgc 3420
ttctcaaaaa aaggaaaaga aaaaaatttg ttgcggcccg gccgtgacgg ccacgagcga 3480
actcctgcag gagcagactc gcattatcga tggagctcta ccaaactggc cctaggcatt 3540
aacctaccat ggatcacatc gtaaaaaaaaa aacctacca tggatcctat ctgttttctt 3600
tttgccctga aagagtgaag tcatcatcat atttaccatg gcgcgcgtag gagcgcttcg 3660
tcgaagaccc ataggggggc ggtactcgca ccgtggttgt ttctgttat gtaatatcgg 3720
atgggggagc agtcggctag gttggtccca tcggtactgg tcgtccccta gtgcgctaga 3780
tgcgcgatgt ttgtcctcaa aaactctttt cttcttaata acaatcatac gcaaattttt 3840
tgcgatttcg agaaaaaaag aagattctat ctgttttttt tttgaaatgg ctccaattta 3900
taggaggagc ccgtttaacg gcgtcgacaa atctaacgga caccaaccag cgaatgagcg 3960
aaccaccag cgccaagcta gccaagcgaa gcagacggcc gagacgctga cacccttgcc 4020
ttggcgcggc atctccgtcg ctggctcgct ggctctggcc ccttcgcgag agttccggtc 4080
cacctccacc tgtgtcggtt tccaactccg ttccgccttc gcgtgggact tgttccgttc 4140
atccgttggc ggcatccgga aattgcgtgg cgtagagcac ggggccctcc tctcacacgg 4200
cacggaaccg tcacgagctc acggcaccgg cagcacggcg gggattcctt cccaccacc 4260
gctccttccc tttcccttcc tcgcccgcga tcataaatag ccacccctcc cagcttcctt 4320
cgccacatcc tctcatcatc ttctctcgct tagcacgcgc agcccgatcc ccaatcccct 4380
ctcctcgca gcctcgctga tccctcgctt caaggtagtg ctatcgctct tctctctct 4440
ctctttacct tatctagatc ggcgatccat ggttagggcc tgctagttct ccgttcgtgt 4500
ttgtcgatgg ctgtgaggca caatagatcc gtcggcggtta tgatggtag cctgtcatgc 4560
tcttgcgatc tgtggttcct ttaggaaagg cattaattta atccctgatg gttcgagatc 4620
ggtgatccat ggtagtacc ctaagctgtg gagtcggggt tagatccgcg ctgttcgtag 4680
gcgatctgtt ctgattgtta acttgtcagt acctgcgaat cctcggtggt tctagctggt 4740

tccgagatca gatcgattcc attatctgct atacatcttg tttcggtgcc taggctccgt	4800
ttaatctatc catcgatga tgtagcctt tgatatgatt cgatcggtc agctatgtcc	4860
tgtggactta attgtcaggt cctaattttt aggaagactg ttccaaacca tctgctggat	4920
ttattaaatt tggatctgga tgtgtcacat acaccttcac aattaaaatg gatggaaata	4980
tctcttatct ttagatatg gataggcatt tatatgatgc tgtgagtttt actagtactt	5040
tcttagaata tatgtacttt ttagacgga atattgatat gtatacatgt gtagatacat	5100
gaagcaacat gctgctgtag tctaataatt cctgttcac taataatcaa gtatgtatat	5160
gttctgtgtg ttttattggt atttgattag atatatacat gcttagatac atacatgaag	5220
cagcatgctg ctacagttta atcattattg tttatccaat aaacaaacat gctttttaat	5280
ttatcttgat atgcttggt gacggaatat gcagagattt taagtaccca gcatcatgag	5340
catgcatgac cctgcgttag tatgctgttt atttgcttga gactctttct tttgtagata	5400
ctcaccctgt tttctggtga tcctactgca ggtgaccggt cgccatggcc accgccacca	5460
ctaccgccac cgctgcgttc tccggcgtgg tgagcgctcg cactgagacg cgcaggatct	5520
actccttcag ccacctccag cttctgctg cgttccccgc taagccgtct tcgttcaaga	5580
gcctgaagct gaaacagtcc gcacgcctta cccggcgctt ggaccatagg ccattcgttg	5640
tcaggtgcat gctcaccttc gttaggaacg cctggtacgt cgccgctctc cctgaggagc	5700
tgagcgagaa gcccttgggt cgcaccatcc tagacactcc gttagccctt taccgccagc	5760
ctgacggcgt agtggcggcc ctgcttgaca tctgcccgca taggttcgct ccgctcagcg	5820
acggcatcct cgtcaacggg catcttcagt gcccgtagca cgggctggaa tttgacggcg	5880
gtgggcagtg tgtccacaac ccgcacggca acggcgcacg gccagcttcc ctcaacgtta	5940
ggtcgttccc tgttgctgag cgcgacgcac tgatctggat ctggcctggc gaccagctc	6000
tggccgatcc aggagccatt cccgacttcg gttgccgct ggaccagcc tatcgacgg	6060
tcggcggtta cgggcacgtc gattgtaact ataagctcct tgtggacaac cttatggatt	6120
tgggccacgc tcagtacgtg caccgggcta acgctcagac tgacgccttt gaccgtctcg	6180
aaaggagggt catcgtcggc gacggagaga ttcaggcgct gatgaagatc cctggaggca	6240
cgccctctgt gctcatggcg aagtttctca gaggcgcgaa cagccccgtg gacgcctgga	6300
acgacatccg ctggaataag gtctccgcga tgctgaactt catcgccgtt gcgccgagg	6360
gcacacccaa agagcagtca atccacagca gagggacca tattcttaca ccggaaaccg	6420
aggctagttg ccactacttc ttcggctcgt cacggaattt cgggatagac gatccggaga	6480
tggacggtgt tcttcgatct tggcaagcgc aagctctcgt caaggaagat aaggtggtcg	6540

tgagggctat cgagcgtagg cgcgcctacg ttgaggcgaa cgggtattagg cccgcgatgc	6600
tgtcctgcga cgaggccgca gttagagtgt cgcgcgagat agaaaagctg gagcagctag	6660
aggccgcctg attaattaag gccaaaggcga tctatgactg aattgccaat gcaccagcct	6720
gtctacatga tgaataaata aagagtccat ccagtgtgat ggctcatgcc tgtgtgagtg	6780
tgactgaatc catcagtgtg tgtgtgtgtt tgtgtcaacc atgtgtgaat caggtgtcaa	6840
aaatcgtggc tggaaatcca tgtggtttct agctttatgt aaatgttggt tgtgaaatat	6900
aaatattggt ttgtgtatgt gaattttact ctctcatttt tctcttgac tcaccattct	6960
attatagtaa tttttttaag cggccgctga tgtatccgtc cacggtggtg tgtccaatca	7020
gtgaataatc tagttagtga agccagaagt ccatagtgcc ccttgctctg tcaccatata	7080
tccagttcaa ccgcaccaat ttgccatctc gaactgggtc atgttttatt caggttggtg	7140
aatgaatttt gccaatcca tgtagttaga tatttccatg tcattttagt acatttacca	7200
attttttata ttctggctag aaaaggagaa tggtgacgtc tttcggaaga tcaagatcaa	7260
ttatcaagta tcagcaacag cacctgaagg ttggagtgc ttagttgtca ttgagaataa	7320
tgctagctat tcattgcact ggcattagag acagagaggg cgagccagtt tgacatggca	7380
aattagcaca gtcaaactgg atacgtggtg acggaggagg gggcactatg aatttttggt	7440
gacggaggga ggggcactat gaatttttg ctttgctgac gggacacgcc actatggatg	7500
aaattggaca aaatacgaat attcaaggat gaaagtggc ggtttgatag ttcagggatg	7560
aaatgtgtct ttgggcaaac tttgaggacg aagttgccta ttttgatta aacgaatata	7620
tttatatacc ccaaaaaaaaa gaatacacat ctccactccg agccggcatg tggggtcccc	7680
actagtcagc cactgtatgg cgccgactag ctcaacggcc acgaaccagc caaccaccag	7740
cgcaacctaa acggcgtaaa cgttgacggc atctctctct cgccccgtct cgaagcttcc	7800
gcaccgctcg ctggctgctg cccggcgccg ctctgtctgg actctttccg tggcggcttc	7860
cgcgaaattg cgtggtggag aggagagacg gaaccgtcac ggcactggat tccttcccca	7920
cccggcttgg cgggccctc ctgcctcca taaataggca cccgctcctc gcctcctctc	7980
cccacctcat ctctccttt cccgtgaacc gtgaacacaa cccgaccagc atcccctctt	8040
gcgagcttcg tcgatccctc ctccgcgtca aggtacggag cttctcctcc cccttcttct	8100
ctagatcggc gtgttatgtt gtttccgtgg ttgcttggtt ggatgaatcg aatgattctt	8160
agggcctagg aggtggtta gatctgttgc gttctgtttc gtagatggat tttggtgtaa	8220
gatcaggctg gttccgctgt ttaacttgtg atgctagtgt gatttttggg aggatttgag	8280
ttgttaatat gggagttggt gggaggttct cgtaggcgga ttgtagatga agtcgccccg	8340

acgatttgcg tggcttggtg ggtagctagg gtagatctg ctcggatttt tcattgttac	8400
ttattgagag ataatgtagc taacctttac ttgttcatct atgtatctcg tattcgtatt	8460
catctgggttc gatgggtgcta gatagatgcg cctgatttgt ccgatcgaat tgggtagcat	8520
ccgcggccttg tttggtagtg ttctgattga tttgtcgctc tagatctgag tggaataata	8580
ttacatctca acatgttact agaaacttgg tttatagctc cggatttaca tgtttattct	8640
tatgtaaggt tttaaatgaa agatttatgc tactgctgct cgttgatcct ttagcatcca	8700
cctgaggaac atgcatgcat ctgttacttc ttttgatata tgcttagata gttgttagta	8760
tatactgctg ttgttcgatg atccttcagg atgaacatgc atgatcatgt tacttgtttt	8820
tatatgcttc tgctgttcgt tgattcttta gtactaccta cctgatcatc ttgcatgttt	8880
cctgcttggt agagattaat tgattaggct taccttggtg cctggtgatt cttccttgca	8940
gggtgggtacc cggaccgatg gcaacagcaa catcagcttc tctgttttca actgtttctt	9000
catcttactc caaagctagc tccataccac attcaagact ccaatctgtg aaattcaact	9060
cagtccctag cttcaccggt ctcaaataca cctctctcat ctccgatct gattcctctt	9120
ccttagccaa gactctacgc gggtccgtaa cgaaagcaca aacatctgac aagaagcctt	9180
acggattcaa aatcaacgct atgcacgcgg cgctgactcc tctaccaac aagtatcgct	9240
ttatcgacgt gcagccgctg acaggcgctc tcggtgcaga gattacaggc gtggatctgc	9300
gggagcctct cgatgacagc acttggaatg agatcctgga cgcctttcac acctaccaag	9360
tgatctactt tccgggtcaa gctatcacta acgagcagca catcgcgctc tccgcccgtt	9420
tcggccctgt ggaccocggtg ccgatcttaa agagtatcga gggctatcca gaggtgcaga	9480
tgatacggcg cgaggcgaac gagagcagcc gggtcatcgg agatgactgg cacaccgatt	9540
ccaccttcct ggacgctccg cctgccgcgc tgggtgatgag agctatcgaa gtgccggagt	9600
atggaggtga cacaggcttc ctctccatgt acagtgcctg ggagacactc tcgcctacga	9660
tgcaagctac catcgaaggc ttaaactgtg tccactcggc gacgaaggtc ttcgggtcat	9720
tgtaccaggc gactaattgg cgcttctcga acaccagcgt gaaagtgatg gacgtggacg	9780
ccggagatag agagactgtg caccactcgc tcgtgacgca tcctgttacg ggaaggcgcg	9840
cactctactg caaccagggt tactgccaga agatccaggg aatgacggac gcggagtcga	9900
agtccctggt gcaattcctt tacgagcacg ccaccaagtt cgacttcacc tgccgggtcc	9960
gggtggaagaa ggaccaagtc ctggtgtggg acaacctgtg taccatgcac cgcgccgtcc	10020
cggactacgc tgggaaattc agatacctga cccgcaccac cgtggcggga gacaagccgt	10080
cgcgttgacg gtccgttaat taatcgagtg tgaaggaagt gaactgagtc tcaagaataa	10140

aaactgcaag tatggcgctc cattccatgg aagacctgca tgcatacctat atatgtgctt	10200
ttatgttcaa gttggagaac tatgtgtgtt gtctttaagt tggagtactc taagctattc	10260
gatctggaga ttatgctgtt ttttaataaaa gtttgaagtg tatctgtcct gtttaattag	10320
tttcaagaaa gccaagcgtg tttgggttct aggatgaaca aagtcgtcca agatgcaaga	10380
agttctagag aggtagctac atttctggaa attgttgcac cttcctttct tcaatatata	10440
tatatgtgcc tatttcataa tgtcattcta gccagctatc tatattctat atatccattt	10500
ccgttgccat actttattca ctatgttgca tcgagtgagc tgcattgctc tgtactacat	10560
gttacttgat atgtgttggt cataaacaca cacattaata atgatcagat tgtgaaaaat	10620
acgcgtccga tcctacctgt cacttcatca aaaggacagt agaaaaggaa ggtggcacct	10680
acaaatgcc a cattgcat aaaggaaagg ctatcattca agatgcctct gccgacagtg	10740
gtcccaaaga tggaccccca cccacgagga gcatcgtgga aaaagaagac gttccaacca	10800
cgtcttcaaa gcaagtggat tgatgtgata cttccactga cgtaagggat gacgcacaat	10860
cccactatcc ttcgcaagac ccttcctcta tataaggaag ttcatttcat ttggagagga	10920
cacgctgaaa tcaccagtct ctctctacaa gatcggggat ctctagccct agaaccatct	10980
tccacacact caagccacac tattggagaa cacacaggga caacacacca taagatccaa	11040
gggaggcctc cgccgccgcc ggtaaccacc ccgcccctct cctctttctt tctccgtttt	11100
tttttccgtc tcggtctcga tctttggcct tggtagtttg ggtgggagag aggcggcttc	11160
gtgcgcgccc agatcgggtgc gcgggagggg cgggatctcg cggctggggc tctcgccggc	11220
gtggatccgg cccggatctc gcggggaatg gggctctcgg atgtagatct gcgatccgcc	11280
gttgttgggg gagatgatgg ggggtttaaa atttccgccg tgctaaacaa gatcaggaag	11340
aggggaaaag ggcactatgg tttatatattt tataatattt tgctgcttcg tcaggcttag	11400
atgtgctaga tctttctttc ttctttttgt gggtagaatt tgaatccctc agcattgttc	11460
atcggtagtt tttcttttca tgatttgtga caaatgcagc ctctgctgga gcttttttgt	11520
aggtagaagt gatcaacat gccgcaagtt agcagaatct gcaatggtgt gcagaacca	11580
tctcttatct ccaatctctc gaaatccagt caacgcaa atctcccttct ggtttctctg	11640
aagacgcagc agcatccacg agcttatccg atttcgtcgt cgtggggatt gaagaagagt	11700
gggatgacgt taattggctc tgagcttcgt cctcttaagg tcatgtcttc tgtttccacg	11760
gcgtgcatgc ttcattggagc ttcattctagg ccagctactg ccagggaagtc tagcgggctc	11820
agtggcaccg tgcgcatccc tggcgataaa agtattttcac acaggagctt catgttcgga	11880
ggacttgcta gtggagagac gagaatcact ggtttgcttg agggcggaaga tgttatcaac	11940

accggttaagg cgatgcaagc aatgggtgcc agaatccgaa aagagggcga tacgtggatc	12000
atcgacgggtg ttggtaacgg aggattgctc gctcccgaag cgccacttga ctttgggaac	12060
gcagctacgg ggtgccgtct tactatggga ctggtaggcg tgtatgactt tgactctacc	12120
ttcatcgggtg acgcgagcct cactaagaga ccaatgggac gagtgctgaa tcccctgagg	12180
gagatgggtg tccaggtgaa atctgaggat ggtgatcgtc ttccggttac tctgcgaggc	12240
cccaagaccc ccacgccaat cacgtacagg gttccgatgg cgtcagcaca ggtcaagtca	12300
gcgggtactcc tggcgggcct caacacacct ggaatcacao ccgtgattga acccatcatg	12360
actagagacc acacggagaa gatgttgacg ggtttcggcg ctaatctaac ggtcgaaacc	12420
gacgccgacg gcgtgaggac aatccgcttg gagggcagag gtaaaactgac tggccaagtc	12480
atcgatgtgc ctggagatcc ctcgccaca gcgtttcccc tcgtagctgc gttgctcgtc	12540
cctggatctg atgtgacgat cctgaatgtc ctcatgaatc caactagaac cggcctcatc	12600
ctcacattgc aggagatggg tgctgacatc gaggttatca atcctagggtt ggcaggtgga	12660
gaggatgtgg ccgatctgcg cgtgcgttct agtacactca aaggcgtgac cgtccctgag	12720
gatcgcgctc catccatgat cgacgagtac ccatttctcg ccgttgctgc tgcgtttgcc	12780
gagggcgcaa ctgtaatgaa cggccttgag gagttgaggg ttaaggagag tgacaggctg	12840
tccgcggtgg cgaatggcct gaagctaaac ggcgtggact gcgacgaagg tgaaacgtcc	12900
cttgtagtcc gtggtcgccc agacgggaag gggttgggga atgcttcggg agctgctgtg	12960
gcgacgcacc ttgatcatag aatcgccatg tcatttctgg tgatgggact tgtctccgag	13020
aatccggtga ccgttgacga tgctaccatg atcgccacct cctttcctga gttcatggac	13080
ctcatggcag gcttgggggc caagatcgag ctgtctgata ctaaggccgc ttgacacgtg	13140
agacgacgac cgtgcatggt gatgaatcac agacgacgaa cacgcatgtc gcatcgccgt	13200
cctctttgta tcacacagca tcaccttctt cgctctacta ctcccccgag caatcaccga	13260
ccaataacac caaccatcaa cctccccgt cgccgccgcc ttcaccgtcc tcccctcaca	13320
ccatagaact gcaaattgcc gcctgcaggg tggggcccat cgtggccagt tatecttagc	13380
tatccgtgtc agaatcatct tatcatcgag tcgagtcgtt atcgtgtcca gtggctctct	13440
cgagtcgaga agccctctat ccatccatcc agtgttagggt gttcttcgtc cgtgatgtta	13500
ccatgaattg agttcgcttt gggttatggtg tttgaactgc ttgttgctat ctatcggaat	13560
gaaatgaaat agaagacaag gagaaaaaaa agagttcgaa agttttgttc gcataccata	13620
tatttccttc cggtgcgcgc tgtttattcc tcgctcagca gcaagattgt ttgatcgata	13680
ttgcagcaag caattacaca ataaatatat tgctacactg gtacttcaaa ctacactgggt	13740

ggtcggtgat tttcaatagc atgaacctta attgaacatc tgtgtagctt acatctcctt 13800
 cgaaagctgc aatgcttgag aacttggaag gaaattcttg tgatggcaga agctattcac 13860
 tgtccttcgc tgcatttaca gtccatacag acacagcatt tccattttgc acaagataga 13920
 gaacaacaat cagcctttta ggtcaatccc aagtgtgcat gacgtcccg c gatcgcccg 13980
 acaacaaacg caccggtgca caaactat 14008

<210> 10

<211> 16068

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Phân tử ADN thể khảm của ADN hệ gen của ngô và ADN gen chuyển

<400> 10

atctacaggg cgcgcgagcg ctgacacatg ggaccacag gcaaaggcag cggcagactc 60
 gcgcgcgaga gcacgcaagc accgattgac gcgcggtgcc cttttgtcgg agaacgaggg 120
 tgcgcgatcg tccgtgcatg gttgagacgg ccaggcgagg cccaccatt ggcgccatgc 180
 cgcgcgagca gcagctggcc cgcacaggtg caaagggtga gtgggctaga agcgaagacc 240
 tagtccaagc gacggtttct tccttttttc tctttttttc tttttccttt atattttctt 300
 gttttatttt attttcattt ttttattttc aaatctaaat ttgaactcaa gtgtgagatt 360
 catactttga attaaatgct cacattcaaa tatcagtagg aatagaatat ttttaactat 420
 atgtttattt tctctatttt atacaatctt ttcctttttt cattttttaa cctcaatttg 480
 taaattatat ctaaattcca attttgggtca ttagtatact cctactaata tcattttatt 540
 gttatgaaat gcacacacaa taaactcaa cttgatgaat agatatctat ttatttcta 600
 taattttatt gtttggtaga tgttcaaaat atgaaacaca cacatattgt tttctttctt 660
 tttagaaaaa tgggtatttt attgtgggac aagaactaaa agtcacctca aaattaaata 720
 ctcatgtata atttgggata tctgaattta ctatttttat ttcttcatat atttaattta 780
 ttattaattt tttttcttat tgggccttac acttatgaga tcatagaggc atgtggatca 840
 gtggcataca agttgaaatt actgccaaaa atgtctgtca tacacaatcc gtgtgtttgg 900
 tttgtggacc agcagagcct ggctactcta atccgtatgt agagaaccaa gctcccacga 960
 gacagactca atgtatccga gatactcttg tttggttaca cttgcaaaaa tagaccactc 1020
 ttgtttgggt tcatgtccgg gaaatctaca tggatcagca atgagtatga tgggtcaatat 1080
 ggagaaaaag aaagagtaat taccaatttt ttttcaattc aaaaatgtag atgtccgcag 1140
 cgttattata aaatgaaagt acattttgat aaaacgacaa attacgatcc gtcgtattta 1200

taggcgaaag caataaacia attattctaa ttcggaaatc tttatttcga cgtgtctaca	1260
ttcacgtcca aatgggggct tagatgagaa acttcacgat ttggcgcgac taactaagca	1320
ctagcgtacg ggaccagat atcgaattca agctgaccgc caccggcaaa caaccacgaa	1380
tttgtaatgg tactaggcaa attctccgtt tggcgggtgtg tgccggccaa ttacacgttt	1440
ttgcgggtgtc ctccgacaaa atttgccttt taaaaacaat tttataagag aagctccgga	1500
gataaaaggc cgtcaatggt acaagagtga agtcgtctac tccctccatc ccaaaaaatg	1560
taattctaag tatgagttgt attattattt ttggacaaaa ggagtatacc acaagaatga	1620
tatcatcgtc atgcttagat cctttttagt aaagcttgag cttctctaaa agtagagaaa	1680
ttagaaaaaa atcacgtttt tgtggtcttg atttctagcc tccacaaaat ctttggtttt	1740
acattttttg tttgattttg gtttcagaag tccttattta tatgtgctag tttggcagca	1800
cttaaaatcg ttagagagag cctaaacaaa agccttttca aaacgacctt gagccagatt	1860
ggttgatggc caaaatttga ttgtcaaaac ttaggcaagc caagatttta gcagctattt	1920
ggtttggtac caaaatttgc caatgatctg ttcttttgcc ttttcaaccg gtttatcagc	1980
cgtacttcag cttattctct ctacagaaac actattgaat cagccgaaaa gccaccgcag	2040
aacaggacca gtatctcaca aatggcatgc caaatatact caccgtcagt gagcccgttt	2100
aacggcgtcg acaagtctaa cggccaccaa ccagcgaacc accagcgtca agctagccaa	2160
gcgaagcaga cggccgagac gttgacacct tggcgcgggc atctctctgg cccctctcg	2220
agagttccgc tccacctcca ctggtggcgg tttccaagtc cgttccgcct cctgctcctc	2280
ctcacacggc acgaaaccgt cacggcaccg gcagcacggg ggattccttt cccaccgctc	2340
cttccctttc ccttctctgc ccgccgtttt aaatagccag ccccatcccc agcttctctc	2400
cccaacctca gcttctctcg ttgttcggag cgcacacaca acccgatccc caatcccctc	2460
gtctctcctc gcgagcctcg tcgatccccg cttcaaggta cggcgatcat cctccctttc	2520
tctaccttct cttctctaga ctaggtcggc gatccatggt tagggcctgc tagttctggt	2580
cctgtttttc cgtggctgcg aggtacaata gatctgatgg cgttatgatg gttaacttgt	2640
catactcctg cgggtgtgcg tctatagtgc ttttaggaca tcaatttgac ctggctcggt	2700
cagatcggc gatccatggt taggacctta ggcgggtggag tcgggttaga tccgcgctgt	2760
ttgtgttagt agatggatgc gacctttact tcagacacgt tctgattgtt aacttgctag	2820
cacctgggag tcctgggatg gttctagctg gttcgcagat gagatcgatt tcatgatctg	2880
ctgtatcttg tttcgtagg ttcttttta tctatccgtg gtattatgct aacctatgat	2940
atgggttcgat cgtgctagct acgtcctgtg tcataatttt tagcatgccc ttttttggtt	3000

ggttttgtct gattgggctg tagatcagag tatactgttt caaactacct actggatata 3060
 tttattaaat ttgaatctgt atgtgtgtca catatatctt cataattaa atggatggaa 3120
 agatatatgg ataggtacat gtgttgctgt gggttttact ggtactttgt tagatataca 3180
 tgcttagata catgaagcaa catgatgtta cagttcaata attcttgttt acctaataaa 3240
 caaataagga taggtgtatg ttgctgtggg ttttgctggg actttgtag atatatatgc 3300
 ttagatatat gaagcaacat cctgctacgg ttaataaatt attgtttata tctaatagac 3360
 aagcctgctt ttaattatt ttgatatact tggatgatgg catacagcag ctatgtgtgg 3420
 atttttaaat acccagcatc atgagcatgc atgaccctgc cttagtatgc tgtttatttg 3480
 cttgagactt ctttttttgt tgggtactcac cttttgtagt ttggtgactc ttctgcaggt 3540
 gcaaccatgt ctccggagag gagaccagtt gagattaggc cagctacagc agctgatatg 3600
 gccgcggttt gtgatatcgt taaccattac attgagacgt ctacagtga ctttaggaca 3660
 gagccacaaa caccacaaga gtggattgat gatctagaga ggttgcaaga tagataccct 3720
 tggttggttg ctgaggttga ggggtgttg gctgggtattg cttacgctgg gccctggaag 3780
 gctaggaacg cttacgattg gacagttgag agtactgttt acgtgtcaca taggcatcaa 3840
 aggttgggcc taggatccac attgtacaca catttgctta agtctatgga ggcgcaaggt 3900
 tttaaagtctg tggttgctgt tataggcctt ccaaacgatc catctgttag gttgcatgag 3960
 gctttgggat acacagcccg gggtagattg cgcgagctg gatacaagca tgggtggatgg 4020
 catgatgttg gtttttggca aagggtttt gagttgccag ctctccaag gccagttagg 4080
 ccagttacc cagatctgata cgcgctgcta gtagccaagt acctacctcg agggcacact 4140
 gtaggcagtg tgccatatta caggttcaga ttggccggga caaagagtac actgcgattt 4200
 tactatctc ggtatgctgg tactacaggt tcacattcac atggttacta cctggcctgt 4260
 ggtatgctgg tactacaggt gttgctctga atagctcagg cttgacccaa gtaagagcag 4320
 tgcaaattcc caatttccag aaaacaggag gacctcaaa ggacttcaat gtaattcaaa 4380
 tttctttcag aggtcctttt gcaaggggct ggatgtaaag tacttttata ataatccaag 4440
 ccattgtgct tctcaaaaaa aggaaaagaa aaaaatttgt tgcgggcccg ccgtgacggc 4500
 cacgagcgaa ctctgcagg agcagactcg cattatcgat ggagctctac caaactggcc 4560
 ctaggcatta acctaccatg gatcacatcg taaaaaaaaa accctaccat ggatcctatc 4620
 tgttttcttt ttgccctgaa agagtgaagt catcatcata ttaccatgg cgcgcgtagg 4680
 agcgcttcgt cgaagacca taggggggag gtactcgcac cgtgggttgt tctgttatg 4740
 taatatcgga tgggggagca gtcggctagg ttggtcccat cggtactggt cgtcccctag 4800

tgcgctagat gcgcgatggt tgtcctcaaa aactcttttc ttcttaataa caatcatacg	4860
caaatttttt gcgatttcga gaaaaaaga agattctatc tgtttttttt ttgaaatggc	4920
tccaatttat aggaggagcc cgtttaacgg cgtcgacaaa tctaacggac accaaccagc	4980
gaatgagcga acccaccagc gccaaagctag ccaagcgaag cagacggccg agacgctgac	5040
acccttgcct tggcgcgga tctccgtcgc tggctcgctg gctctggccc cttecgagaga	5100
gttccgggtcc acctccacct gtgtcgggtt ccaactccgt tccgccttcg cgtgggactt	5160
gttccgttca tccgttggcg gcatccggaa attgctgtggc gtagagcacg gggccctcct	5220
ctcacacggc acggaaccgt cacgagctca cggcacggc agcacggcgg ggattccttc	5280
cccaccaccg ctcttccct ttcccttccct cgcccgccat cataaatagc caccctccc	5340
agcttccctc gccacatcct ctcatcatct tctctcgtgt agcacgcga gcccgatccc	5400
caatcccctc tcctcgcgag cctcgtcgat ccctcgcttc aaggatggc tatcgtcctt	5460
cctctctctc tctttacct atctagatcg gcgatccatg gttagggcct gctagttctc	5520
cgttcgtgtt tgtcgatggc tgtgaggcac aatagatccg tcggcgttat gatggtagc	5580
ctgtcatgct cttgcgatct gtggttccct taggaaaggc attaatataa tccctgatgg	5640
ttcgagatcg gtgatccatg gttagtacc taagctgtgg agtcgggttt agatccgcgc	5700
tgttcgtagg cgatctgttc tgattgttaa cttgtcagta cctgcgaatc ctcggtggtt	5760
ctagctgggt cggagatcag atcgattcca ttatctgcta tacatcttgt ttcggtgcct	5820
aggctccgtt taatctatcc atcgatgat gttagccttt gatatgattc gatcgtgcta	5880
gctatgtcct gtggacttaa ttgtcaggtc ctaattttta ggaagactgt tccaaacat	5940
ctgctggatt tattaaattt ggatctggat gtgtcacata caccttcata attaaaatgg	6000
atggaaatat ctcttatctt ttagatatgg ataggcattt atatgatgct gtgagtttta	6060
ctagtacttt cttagaatat atgtactttt ttagacggaa tattgatatg tatacatgtg	6120
tagatacatg aagcaacatg ctgctgtagt ctaataattc ctgttcatct aataatcaag	6180
tatgtatatg ttctgtgtgt ttattggta ttgattaga tatatacatg cttagatata	6240
tacatgaagc agcatgctgc tacagtttaa tcattattgt ttatccaata aacaaacatg	6300
ctttttaatt tatcttgata tgcttggatg acggaatatg cagagatttt aagtaccag	6360
catcatgagc atgcatgacc ctgcgttagt atgctgttta tttgcttgag actctttctt	6420
ttgtagatac tcacctgtt ttctggtgat cctactgcag gtgaccggtc gccatggcca	6480
ccgccaccac taccgccacc gctgcgttct ccggcgtggg gagcgtcggc actgagacgc	6540
gcaggatcta ctcttcagc cacctccagc cttctgctgc gttccccgct aagccgtctt	6600

cgttcaagag cctgaagctg aaacagtccg cacgccttac ccggcgctg gaccataggc	6660
cattcgttgt caggtgcatg ctcaccttcg ttaggaacgc ctggtacgtc gccgctctcc	6720
ctgaggagct gagcgagaag cccttgggtc gcaccatect agacactccg ttagcccttt	6780
accgccagcc tgacggcgta gtggcggccc tgcttgacat ctgcccgcac aggttcgctc	6840
cgctcagcga cggcatcctc gtcaacgggc atcttcagtg cccgtaccac gggctggaat	6900
ttgacggcgg tgggcagtgt gtccacaacc cgcacggcaa cggcgcacgg ccagcttccc	6960
tcaacgttag gtcgttcctt gttgtcgagc gcgacgcact gatctggatc tggcctggcg	7020
accagctct ggccgatcca ggagccattc ccgacttcgg ttgccgcgtg gaccagcct	7080
atcggaaggc cggcggttac gggcacgtcg attgtaacta taagctcctt gtggacaacc	7140
ttatggattt gggccacgct cagtacgtgc accgggctaa cgctcagact gacgcctttg	7200
accgtctcga aaggaggtc atcgtcggcg acggagagat tcaggcgctg atgaagatcc	7260
ctggaggcac gccctctgtg ctcatggcga agtttctcag aggcgcgaac acgcccgtgg	7320
acgcctggaa cgacatccgc tggaataagg tctccgcgat gctgaacttc atcgccgttg	7380
cgcccgaggg cacacccaaa gagcagtcaa tccacagcag agggacccat attcttacac	7440
cggaaaccga ggctagttgc cactacttct tcggctcgtc acggaatttc gggatagacg	7500
atccggagat ggacggtgtt cttcgatctt ggcaagcgca agctctcgtc aaggaagata	7560
aggtggtcgt ggaggctatc gagcgtaggc gcgcctacgt tgaggcgaac ggtattaggc	7620
ccgcgatgct gtcttgcgac gaggccgcag ttagagtgtc gcgcgagata gaaaagctgg	7680
agcagctaga ggccgcctga ttaattaagg ccaaggcgat ctatgactga attgccaatg	7740
caccagcctg tctacatgat gaataaataa agagtccatc cagtgtgatg gctcatgcct	7800
gtgtgagtgt gactgaatcc atcagtgtgt gtgtgtgttt gtgtcaacca tgttgtaatc	7860
aggtgtcaaa aatcgtggct ggaaatccat gtggtttcta gctttatgta aatgttgttt	7920
gtgaaatata aatattgttt tgtgtatgtg aattttactc tctcattttt ctcttgact	7980
caccattcta ttatagtaat ttttttaagc ggccgctgat gtatccgtcc acggtggtgt	8040
gtccaatcag tgaataatct agttagtgaa gccagaagtc catagtgcc cttgctctgt	8100
caccatatat ccagttcaac cgcaccaatt tgccatctcg aactgggttca tgttttattc	8160
aggttggtaa atgaattttg ccaattcaat gtagttagat atttccatgt catttttagta	8220
catttaccaa ttttttatat tctggctaga aaaggagaat ggtgacgtct ttcggaagat	8280
caagatcaat tatcaagtat cagcaacagc acctgaagggt tggagtgcac tagttgtcat	8340
tgagaataat gctagctatt cattgcactg gcattagaga cagagagggc gagccagttt	8400

gacatggcaa attagcacag tcaaactgga tacgtggtga cggagggagg ggcactatga 8460
atTTTTggtg acggagggag gggcactatg aatTTTTggc tttgctgacg ggacacgcca 8520
ctatggatga aattggacaa aatacgaata ttcaaggatg aaagtggtcg gtttgatagt 8580
tcagggatga aatgtgtctt tgggcaaact ttgaggacga agttgcctat tttgcattaa 8640
acgaatatat ttatatacc caaaaaaaaag aatacacatc tccactccga gccggcatgt 8700
ggggTCCCCa ctagtcagcc actgtatggc gccgactagc tcaacggcca cgaaccagcc 8760
aaccaccagc gcaacctaaa cggcgtaaac gttgacggca tctctctctc gccccgtctc 8820
gaagcttccg caccgctcgc tggtcgctgc ccggcgccgc tcgtgctgga ctctttccgt 8880
ggcggttcc gcgaaattgc gtggtggaga ggagagacgg aaccgtcacg gcactggatt 8940
ccttccccac ccggcttggc cggccctcc tcgcctccat aaataggcac cccgtcctcg 9000
cctcctctcc ccacctcatc tcctcctttc ccgtgaaccg tgaacacaac ccgaccaga 9060
tcccctcttg cgagcttcgt cgatccctcc tccgcgtcaa ggtacggagc ttctcctccc 9120
ccttctctc tagatcggcg tgttatgttg tttccgtggt tgcttggttg gatgaatcga 9180
atgattctta gggcctagga ggctggttag atctgttgcg ttctgtttcg tagatggatt 9240
ttggtgtaag atcaggtcgg ttccgctgtt taacttgtga tgctagtgtg atTTTTggga 9300
ggatttgagt tgTTaatctg ggagttgttg ggaggttctc gtaggcggat tgtagatgaa 9360
gtcgcccga cgatttgctg ggcttggttg gtagctaggg ttagatctgc tcggattttt 9420
cattgttact tattgagaga taatgtagct aacctttact tgttcatcta tgtatctcgt 9480
attcgtattc atctggttcg atggtgctag atagatgcgc ctgatttgct cgatcgaatt 9540
gggtagcatc cgcggcttgt ttggtagtgt tctgattgat ttgtcgctct agatctgagt 9600
ggaataatat tacatctcaa catgttacta gaaacttggg ttatagctcc ggatttacat 9660
gtttattctt atgtaagggt ttaaagaaa gatttatgct actgctgctc gttgatcctt 9720
tagcatccac ctgaggaaca tgcattgcac tggtacttct tttgatatat gcttagatag 9780
ttgttagtat atactgctgt tgttcgatga tccttcagga tgaacatgca tgatcatgtt 9840
acttgTTTT atatgcttct gctgttcgtt gattctttag tactacctac ctgatcatct 9900
tgcattgttc ctgcttgtaa gagattaatt gattaggctt accttggtgc ctggtgatcc 9960
ttccttgca gTgggtaccc ggaccgatgg caacagcaac atcagcttct ctgttttcaa 10020
ctgtttcttc atcttactcc aaagctagct ccataccaca ttcaagactc caatctgtga 10080
aattcaactc agtccctagc ttcaccggtc tcaaatcaac ctctctcatc tccgatctg 10140
attcctcttc cttagccaag actctacgcg gttccgtaac gaaagcacia acatctgaca 10200

agaagcctta cggattcaaa atcaacgcta tgcacgcggc gctgactcct ctcaccaaca	10260
agtatcgctt tatcgacgtg cagccgctga caggcgctct cgggtgcagag attacaggcg	10320
tggatctgcg ggagcctctc gatgacagca cttggaatga gatcctggac gcctttcaca	10380
cctaccaagt gatctacttt ccgggtcaag ctatcactaa cgagcagcac atcgcgttct	10440
cccgccggtt cggccctgtg gacccggtgc cgatcttaaa gagtatcgag ggctatccag	10500
aggtgcagat gatacggcgc gaggcgaacg agagcagccg gttcatcgga gatgactggc	10560
acaccgattc caccttcttg gacgctccgc ctgccgccgt ggtgatgaga gctatcgaag	10620
tgccggagta tggaggtgac acaggcttcc tctccatgta cagtgcctgg gagacactct	10680
cgcctacgat gcaagctacc atcgaaggct taaacgtggc cactcggcg acgaaggctct	10740
tccgggtcatt gtaccaggcg actaattggc gcttctcgaa caccagcgtg aaagtgatgg	10800
acgtggacgc cggagataga gagactgtgc acccactcgt cgtgacgcat cctgttacgg	10860
gaaggcgcgc actctactgc aaccagggtgt actgccagaa gatccaggga atgacggacg	10920
cggagtcgaa gtccctgttg caattccttt acgagcacgc caccaagttc gacttcacct	10980
gccgggtccg gtggaagaag gaccaagtcc tgggtgtggga caacctgtgt accatgcacc	11040
gcgccgtccc ggactacgct gggaaattca gatacctgac ccgcaccacc gtggcgggag	11100
acaagccgtc gcgttgacgg tccgttaatt aatcgagtgt gaaggaagtg aactgagtct	11160
caagaataaa aactgcaagt atggcgctcc attccatgga agacctgcat gcacacctata	11220
tatgtgcttt tatgttcaag ttggagaact atgtgtgttg tctttaagtt ggagtactct	11280
aagctattcg atctggagat tatgctgttt ttaataaaaag tttgaagtgt atctgtcctg	11340
tttaattagt ttcaagaaag ccaagcgtgt ttgggttcta ggatgaacaa agtcgtccaa	11400
gatgcaagaa gttctagaga ggtagctaca tttctggaaa ttgttgcatc ttcctttctt	11460
caatatatat atattgtcct atttcataat gtcattctag ccagctatct atattctata	11520
tatccatttc cgttgccata ctttattcac tatgttgcat cgagtgaagt gcattgctct	11580
gtactacatg ttacttgata tgtgttggtc ataaacacac acattaataa tgatcagatt	11640
gtgaaaaata cgcgtccgat cctacctgtc acttcatcaa aaggacagta gaaaaggaag	11700
gtggcaccta caaatgccat cattgcgata aaggaaaggc tatcattcaa gatgcctctg	11760
ccgacagtgg tcccaaagat ggacccccac ccacgaggag catcgtggaa aaagaagacg	11820
ttccaaccac gtcttcaaag caagtggatt gatgtgatac ttccactgac gtaagggatg	11880
acgcacaatc ccactatcct tcgcaagacc cttcctctat ataaggaagt tcatttcatt	11940
tggagaggac acgctgaaat caccagtctc tctctacaag atcggggatc tctagcccta	12000

gaaccatctt ccacacactc aagccacact attggagaac acacagggac aacacaccat	12060
aagatccaag ggaggcctcc gccgccgccg gtaaccaccc cgcccctctc ctctttcttt	12120
ctccgttttt tttccgtctc cggctctgat ctttggcctt ggtagtttgg gtgggcgaga	12180
ggcggtctcg tgcgcgcca gatcgggtgc cgggaggggc gggatctcgc ggctggggct	12240
ctcgccggcg tggatccggc ccggatctcg cggggaatgg ggctctcgga tgtagatctg	12300
cgatccgccg ttgttggggg agatgatggg gggtttaaaa tttccgccgt gctaaacaag	12360
atcaggaaga ggggaaaagg gcactatggg ttatatTTTT atatatttct gctgcttcgt	12420
caggcttaga tgtgctagat ctttctttct tctttttgtg ggtagaattt gaatccctca	12480
gcattgttca tcggtagttt ttcttttcat gatttgtgac aaatgcagcc tcgtgcggag	12540
cttttttgta ggtagaagtg atcaaccatg gcgcaagtta gcagaatctg caatggtgtg	12600
cagaacccat ctcttatctc caatctctcg aaatccagtc aacgcaaata tcccttatcg	12660
gtttctctga agacgcagca gcatccacga gcttatccga tttcgtcgtc gtggggattg	12720
aagaagagtg ggatgacgtt aattggctct gagcttcgtc ctcttaaggt catgtcttct	12780
gtttccacgg cgtgcatgct tcatggagct tcatctaggc cagctactgc caggaagtct	12840
agcgggctca gtggcaccgt gcgcatccct ggcgataaaa gtatttcaca caggagcttc	12900
atgttcggag gacttgctag tggagagacg agaatcactg gtttgcttga gggcgaagat	12960
gttatcaaca ccggttaaggc gatgcaagca atgggtgcc gaatccgaaa agagggcgat	13020
acgtggatca tcgacgggtg tggtaacgga ggattgctcg ctcccgaagc gccacttgac	13080
tttgggaacg cagctacggg gtgccgtctt actatgggac tggtaggcgt gtatgacttt	13140
gactctacct tcatcgggtga cgcgagcctc actaagagac caatgggacg agtgctgaat	13200
cccctgaggg agatgggtgt ccaggtgaaa tctgaggatg gtgatcgtct tccggttact	13260
ctgcgaggcc ccaagacccc cacgccaata acgtacaggg ttccgatggc gtcagcacag	13320
gtcaagtcag cgggtactcct ggcgggcctc aacacacctg gaatcacaac cgtgattgaa	13380
cccatcatga ctagagacca cacggagaag atgttgacag gtttcggcgc taatctaacg	13440
gtcgaaaccg acgccgacgg cgtgaggaca atccgcttgg agggcagagg taaactgact	13500
ggccaagtca tcgatgtgcc tggagatccc tcgtccacag cgtttccctc cgtagctgcg	13560
ttgctcgtcc ctggatctga tgtgacgata ctgaatgtcc tcatgaatcc aactagaacc	13620
ggcctcatcc tcacattgca ggagatgggt gctgacatcg aggttatcaa tcctaggttg	13680
gcaggtggag aggatgtggc cgatctgcgc gtgcgttcta gtacactcaa aggcgtgacc	13740
gtccctgagg atcgcgctcc atccatgatc gacgagtacc ccattctcgc cgttgctgct	13800

gcgtttgccg agggcgcaac tgtaatgaac ggccttgagg agttgagggg taaggagagt	13860
gacaggctgt ccgcggtggc gaatggcctg aagctaaacg gcgtggactg cgacgaaggt	13920
gaaacgtccc ttgtagtccg tggtcgcccga gacgggaagg gggtggggaa tgcttcggga	13980
gctgctgtgg cgacgcacct tgatcataga atcgccatgt catttctggt gatgggactt	14040
gtctccgaga atccggtgac cgttgacgat gctaccatga tcgccacctc ctttcctgag	14100
ttcatggacc tcatggcagg cttggggggc aagatcgagc tgtctgatac taaggccgct	14160
tgacacgtga gacgacgacc gtgcatggtg atgaatcaca gacgacgaac acgcatgtcg	14220
catcgccgtc ctctttgtat cacacagcat caccttcttc gctctactac tccccgagc	14280
aatcaccgac caataacacc aaccatcaac ctccccgtc gccgccgcct tcaccgtcct	14340
cccctcacac catagaactg caaatgtccg cctgcagggg ggggcccatc gtggccagtt	14400
atccttagct atccgtgtca gaatcatctt atcatcgagt cgagtcgtta tcgtgtccag	14460
tggctctctc gagtcgagaa gccctctatc catccatcca gtgttaggtg ttcttcgtcc	14520
gtgatgttac catgaattga gttcgctttg gttatggtgt ttgaactgct tgttgctatc	14580
tatcggaatg aatatgaaata gaagacaagg agaaaaaaaa gagttcgaaa gttttgttcg	14640
cataccatat atttccttcc ggtgcgcgct gtttattcct cgctcagcag caagattggt	14700
tgatcgatat tgcagcaagc aattacacaa taaatatatt gctacactgg tacttcaaac	14760
tacactggtg gtcggtgatt ttcaatagca tgaaccttaa ttgaacatct gtgtagctta	14820
catctccttc gaaagctgca atgcttgaga acttggaag aaattcttgt gatggcagaa	14880
gctattcact gtccttcgct gcatttacag tccatacaga cacagcattt ccattttgca	14940
caagatagag aacaacaatc agccttttag gtcaatccca agtgtgcatg acgtcccgcg	15000
atcgcccgca caacaaacgc accggtgcac aaactatagc aagtgtggtc tatttttata	15060
tagcaagtga ggtcagataa aataataaat aaaatcatta aattttatat agcaagtgtg	15120
gtctatTTTT gcttgtaaac tacagagaat atatatatgt taaatcggtg gaacaattgg	15180
ctattttaaac taaaagattt aaaaaaaca aagataaaaa atgtttttga actgcgtgtc	15240
tcgagagcag ccagcatgct tccgacctgc atgagcagcg atgctcctgg tgaccgcagc	15300
aacggaacct ggcccgatgg atgattttgc atcaacagcg cctgtatgca acgatcatcc	15360
aaccaaacad acttcgcttt gaggatccac gcctacaacg tccgcgctcg tccatgcaac	15420
caaacacacg gaatgtgttc catgtgtccc aattgaaaga agtgtattcg gttaacaacg	15480
gaagtcataa ccgagccaga tatagagata gaaccagatc tatcatacca agaacacccc	15540
tccaagattc tagactgcaa ggaaagatcc actcgtgcga agacgaccaa gatgtataag	15600

atccaatgga gcaaccatac ggaagaagag gctacgtggg agactgagga ttatctatgc 15660
aaatactacc ccgattgtct acctaaggaa gtcagtacgt aaccatgcc cagccccctg 15720
ccctccgatt ccaaatatag aaaagatact cttaatgaaa actgaattaa gaaatgaaat 15780
taagcgaaga aggacttcct tctgaagttg caaagaggat ggcattcgaa gagcagattt 15840
ttctcgcgaa ccttaaaaag ctaaccaata ctatgcaagc aagctataac cacctcctca 15900
ctcctgggtg atctcgactc gaatctcggg gcgagattct tttaaggggg gagagctgta 15960
acaccccagg tgttacttag ggtttcccc ttagtacctc catttgtgac ctattatcac 16020
atgtgggttg gtttaagaaa aaggcaccaa acttgagggg ccaagccc 16068

<210> 11
<211> 29
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mỗi Oligonucleotit PCR được tổng hợp về mặt hóa học

<400> 11
ttgctatata aaaatagacc acacttgct 29

<210> 12
<211> 17
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mỗi Oligonucleotit PCR được tổng hợp về mặt hóa học

<400> 12
catgacgtcc cgcgatc 17

<210> 13
<211> 16
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn dò Oligonucleotit PCR được tổng hợp về mặt hóa học

<400> 13
cacaacaaac gcaccg 16