



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

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

(11)



1-0023434

(51)⁷ C12N 15/82; C12N 15/11; C12Q 1/68; (13) B
A01H 9/00; C12N 15/52

- (21) 1-2012-01825 (22) 16/11/2010
(86) PCT/US2010/056853 16/11/2010 (87) WO2011/062904 26/05/2011
(30) 61/263,530 23/11/2009 US; 61/263,526 23/11/2009 US
(45) 27/04/2020 385 (43) 26/11/2012 296A
(73) MONSANTO TECHNOLOGY LLC (US)
800 North Lindbergh Boulevard, Mail Zone E1NA, St. Louis, MO 63167, United States of America
(72) FENG, Paul, C.C. (US); FONSECA, Agustin, E. (AR); GARNAAT, Carl, W.; (US); HEREDIA, Oscar (MX); HUANG, Jintai (US); KELLY, Rebecca, A. (US); QI, Youlin (US); STOECKER, Martin, A. (US)
(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) PHÂN TỬ ADN TÁI TỔ HỢP TỪ CÂY NGÔ CHUYỂN GEN BAO GỒM SỰ
KIỆN MON 87427, PHƯƠNG PHÁP VÀ KIT PHÁT HIỆN SỰ CÓ MẶT CỦA
PHÂN TỬ ADN NÀY

(57) Sáng chế đề xuất sự kiện MON 87427 của cây ngô chuyển gen và cây, tế bào của cây, hạt, các bộ phận của cây và sản phẩm hàng hóa có nguồn gốc từ sự kiện MON 87427. Sáng chế cũng đề xuất các nucleotit đặc thù cho sự kiện 87427 của cây ngô chuyển gen và cây, tế bào cây, hạt, các bộ phận của cây và các sản phẩm hàng hóa bao gồm các nucleotit đặc thù cho sự kiện MON 87427 của cây ngô chuyển gen. Sáng chế còn đề xuất phương pháp liên quan đến sự kiện MON 87427 của cây ngô chuyển gen và Roundup® Hybridization System (RHS). Sáng chế còn đề xuất thang đo sự phát triển tương đối hữu ích cho việc kiểm tra và xác định sự phát triển sinh sản ở ngô mà điều hòa sự khác biệt phát triển qua các giống ngô khác nhau. Điều này hữu ích để xác định thời gian dự tính tối ưu của chế độ xử lý trong đó giai đoạn phát triển cò là yếu tố quan trọng, bao gồm các phương pháp đánh dấu hạt lai khác nhau.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực nhân giống, nghiên cứu cây trồng, và nông nghiệp. Cụ thể là sáng chế đề cập đến gen chuyển MON 87427 và các phân tử nucleotit của cây ngô, cây trồng, các bộ phận của cây, hạt, tế bào, các sản phẩm nông nghiệp và các phương pháp liên quan đến gen chuyển MON 87427 của cây ngô. Ngoài ra, sáng chế cũng đề cập đến việc dự đoán sự phát triển còi của cây ngô và sử dụng dự đoán này trong các phương pháp nhân giống, nghiên cứu cây trồng, và nông nghiệp để tạo ra hạt ngô lai.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Cây trồng có các tính trạng mới mong muốn là hữu ích cho các mục đích nhân giống, nghiên cứu cây trồng và nông học. Các cây trồng này có thể được tạo ra bằng cách sử dụng các phương pháp kỹ thuật sinh học. Tuy nhiên, việc tạo ra và chọn lọc sự kiện gen chuyển thích hợp trên thị trường có thể cần sự nghiên cứu, phân tích và xác định đặc tính rất nhiều sự kiện biến nạp thực vật riêng lẻ nhằm chọn ra sự kiện có cả tính trạng mong muốn và cả các đặc tính kiểu hình và nông học tối ưu cần thiết phù hợp với các mục đích thương mại. Quy trình chọn lọc sự kiện này thường cần có các thử nghiệm trong nhà kính và trên cánh đồng với nhiều sự kiện sau nhiều năm, ở nhiều vị trí, và trong nhiều điều kiện để có thể thu thập được nhiều dữ liệu về đặc tính nông học, kiểu hình và phân tử. Dữ liệu và các quan sát thu được sau đó phải được phân tích bởi đội ngũ các nhà khoa học và các nhà nông học với mục tiêu chọn ra sự kiện thích hợp để thương mại hóa. Sáng chế đề xuất sự kiện thích hợp về mặt thương mại để tạo ra tính trạng mới mong muốn ở ngô.

Việc xác định chính xác độ trưởng thành về mặt sinh sản ở ngô cũng hữu ích cho việc nhân giống, nghiên cứu cây trồng và các mục đích nông nghiệp, như trong sản xuất hạt ngô lai. Các công cụ thường được sử dụng trong lĩnh vực kỹ thuật để dự đoán và ước tính các giai đoạn sinh trưởng và phát triển của cây ngô bao gồm các thang đo như các thang V-Stages, dựa trên các đặc tính sinh dưỡng, và các đơn vị độ sinh

trường dựa trên số ngày đo độ sinh trưởng. Tuy nhiên, cả hai công cụ này đưa ra dự kiến giai đoạn phát triển còi mà chúng vốn thay đổi đáng kể qua các kiểu gen ở ngô. Như vậy, dựa trên các phương pháp đo này có thể khiến bỏ lỡ thời điểm hiệu quả tối ưu đối với các chế độ xử lý, trong đó giai đoạn phát triển là yếu tố quan trọng. Sáng chế đề xuất thang đo sự phát triển tương đối trên cơ sở sự phát triển còi thu được qua các kiểu gen, mà hữu ích đối với việc kiểm tra và dự đoán sự phát triển còi của cây ngô giữa các kiểu gen khác nhau.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất phân tử ADN tái tổ hợp bao gồm phân tử nucleotit bao gồm trình tự nucleotit được chọn từ nhóm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1-8. Sáng chế cũng đề xuất phân tử ADN tái tổ hợp được tạo thành bởi sự tiếp hợp của phân tử axit nucleic khác loại được chèn và ADN hệ gen của cây ngô, tế bào cây ngô, hoặc hạt ngô. Sáng chế cũng đề xuất phân tử ADN tái tổ hợp có nguồn gốc từ gen chuyển MON 87427 của cây ngô, mẫu hạt tiêu biểu đã được nộp lưu Bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật Hoa Kỳ (ATCC®) dưới số truy cập PTA-7899. Sáng chế còn đề xuất phân tử ADN tái tổ hợp là sản phẩm khuếch đại (amplicon) để xác định sự có mặt của ADN có nguồn gốc từ gen chuyển MON 87427 của cây ngô. Ngoài ra, sáng chế đề xuất phân tử ADN tái tổ hợp có trong cây ngô, tế bào cây ngô, hạt ngô, cây thế hệ con, bộ phận của cây, sản phẩm hàng hóa có nguồn gốc từ gen chuyển MON 87427 của cây ngô.

Sáng chế còn đề xuất phân tử ADN bao gồm ít nhất một phân tử axit nucleic có trình tự nucleotit có chiều dài vừa đủ gồm trình tự nucleotit liền kề nêu trong SEQ ID NO: 10 có chức năng là mẫu dò ADN mà lai với phân tử ADN bao gồm trình tự nucleotit được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1-10 trong các điều kiện lai nghiêm ngặt và lai với phân tử ADN không bao gồm trình tự nucleotit được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1-10 trong các điều kiện lai không nghiêm ngặt.

Sáng chế còn đề xuất cặp phân tử ADN bao gồm phân tử ADN thứ nhất và phân tử ADN thứ hai khác với phân tử ADN thứ nhất, trong đó các phân tử ADN thứ nhất và thứ hai, mỗi phân tử bao gồm phân tử axit nucleic có trình tự nucleotit có chiều dài vừa đủ bao gồm các nucleotit liền kề có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 10 có chức năng như các đoạn mồi ADN khi được sử dụng đồng thời trong phản ứng khuếch đại

với ADN có nguồn gốc từ gen chuyển MON 87427 để tạo ra sản phẩm khuếch đại (amplicon) để xác định gen chuyển MON 87427 của cây ngô trong mẫu.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất phương pháp phát hiện sự có mặt của phân tử ADN có nguồn gốc từ MON 87427 trong mẫu bằng cách cho mẫu tiếp xúc với mẫu dò ADN, đưa mẫu và mẫu dò ADN vào trong các điều kiện lai nghiêm ngặt, và phát hiện sự lai giữa mẫu dò ADN với phân tử ADN trong mẫu, trong đó phép lai của mẫu dò ADN với phân tử ADN cho thấy sự có mặt của phân tử ADN có nguồn gốc từ gen chuyển MON 87427 của cây ngô trong mẫu.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất phương pháp phát hiện sự có mặt của phân tử ADN có nguồn gốc từ gen chuyển MON 87427 của cây ngô trong mẫu bằng cách cho mẫu tiếp xúc với cặp phân tử ADN, thực hiện phản ứng khuếch đại đủ để tạo ra sản phẩm khuếch đại (amplicon) ADN bao gồm trình tự được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1-10, và phát hiện sự có mặt của sản phẩm khuếch đại (amplicon) ADN trong phản ứng, trong đó sự có mặt của sản phẩm khuếch đại (amplicon) ADN này trong phản ứng chỉ ra sự có mặt của phân tử ADN có nguồn gốc từ sự kiện MON 87427 trong mẫu.

Sáng chế còn đề xuất kit phát hiện ADN bao gồm ít nhất một phân tử ADN bao gồm trình tự nucleotit có chiều dài vừa đủ gồm trình tự nucleotit liền kề nêu trong SEQ ID NO: 10 có chức năng như đoạn môi hoặc mẫu dò ADN đặc hiệu cho việc phát hiện sự có mặt của ADN có nguồn gốc từ gen chuyển MON 87427 của cây ngô, trong đó việc phát hiện ADN này để xác định sự có mặt của ADN gen chuyển MON 87427 của cây ngô trong mẫu.

Sáng chế còn đề xuất cây ngô tái tổ hợp, hạt, tế bào, hoặc bộ phận của cây ngô tái tổ hợp bao gồm phân tử axit nucleic có trình tự nucleotit được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1-10. Ngoài ra, sáng chế đề xuất cây ngô tái tổ hợp, hạt, tế bào, hoặc bộ phận của cây ngô tái tổ hợp có khả năng chịu có chọn lọc mô với sự xử lý bằng thuốc diệt cỏ glyphosat. Ngoài ra, sáng chế đề xuất cây ngô tái tổ hợp, hạt, tế bào, hoặc bộ phận của cây ngô tái tổ hợp, hệ gen của cây ngô tái tổ hợp mà tạo ra sản phẩm khuếch đại (amplicon) bao gồm phân tử ADN được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1-10 khi được thử nghiệm trong phương pháp khuếch đại ADN.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất cây ngô hoặc hạt ngô, trong đó cây ngô hoặc hạt ngô có nguồn gốc từ gen chuyển MON 87427 của cây ngô. Ngoài ra, sáng chế đề xuất cây ngô hoặc hạt ngô, trong đó cây ngô hoặc hạt ngô là thể lai có ít nhất một bố mẹ có nguồn gốc từ gen chuyển MON 87427 của cây ngô.

Sáng chế còn đề xuất vật liệu thực vật không sống bao gồm phân tử ADN tái tổ hợp được chọn từ nhóm bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1-10.

Sáng chế còn đề xuất vi sinh vật bao gồm phân tử axit nucleic có trình tự nucleotit được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1-10. Ngoài ra, sáng chế còn đề xuất vi sinh vật là tế bào thực vật.

Sáng chế còn đề xuất sản phẩm hàng hóa mà được tạo ra từ gen chuyển MON 87427 của cây ngô và bao gồm phân tử axit nucleic có trình tự nucleotit được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong các SEQ ID NO: 1-10, trong đó sự phát hiện trình tự nucleotit trong mẫu có nguồn gốc từ sản phẩm hàng hóa cho thấy rằng sản phẩm hàng hóa được tạo ra từ gen chuyển MON 87427 của cây ngô. Sáng chế còn đề xuất sản phẩm hàng hóa được chọn từ nhóm gồm có hạt toàn phần hoặc đã được chế biến, thức ăn động vật, dầu, bột xay thô, bột, sản phẩm dạng vảy, cám, sinh khối và các sản phẩm nhiên liệu. Ngoài ra, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất sản phẩm hàng hóa bằng cách thu cây ngô hoặc bộ phận của cây ngô bao gồm gen chuyển MON 87427 của cây ngô và sản xuất sản phẩm hàng hóa ngô từ cây ngô hoặc bộ phận của cây ngô.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp phòng trừ cỏ dại trên cánh đồng, trong đó bao gồm bước trồng cây chứa sự kiện MON 87427 trên cánh đồng và sử dụng liều thuốc diệt cỏ glyphosat hữu hiệu để phòng trừ cỏ dại mà không làm tổn thương cây chứa sự kiện MON 87427. Ngoài ra, sáng chế đề xuất phương pháp phòng trừ cỏ dại trên cánh đồng, trong đó liều thuốc diệt cỏ glyphosat hữu hiệu là nằm trong khoảng từ 45,36 g (0,1 lb) đến khoảng 1,814 kg (4 lb) trên 4047 m² (1 ac) (0,1 pound đến 4 pound trên một mẫu Anh).

Ngoài ra, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra cây ngô chịu được thuốc diệt cỏ glyphosat bằng cách lai hữu tính cây ngô chuyển gen chứa sự kiện MON 87427 bao gồm phân tử axit nucleic bao gồm trình tự nucleoit được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1-10 với cây ngô thứ hai, bằng cách đó tạo ra hạt, thu

gom hạt được tạo ra, cho hạt sinh trưởng để tạo ra nhiều cây thế hệ con, xử lý cây thế hệ con với glyphosat, và chọn cây thế hệ con chịu được glyphosat. Ngoài ra, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra cây ngô chịu được thuốc diệt cỏ glyphosat bằng cách thụ phấn cho cây ngô chuyển gen chứa sự kiện MON 87427 bao gồm phân tử axit nucleic bao gồm trình tự nucleoit được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1-10, bằng cách đó tạo ra hạt, thu gom hạt được tạo ra, cho hạt sinh trưởng để tạo ra nhiều cây thế hệ con, xử lý cây thế hệ con với glyphosat, và chọn cây thế hệ con chịu được glyphosat.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất hạt ngô lai bằng cách gieo hạt ngô chứa gen chuyển MON 87427 trong khu vực, để hạt sinh trưởng thành cây ngô, xử lý cây bằng liều thuốc diệt cỏ glyphosat hữu hiệu trước khi tạo thành phần hoa để làm cho cây bất dục đực mà không gây tổn thương cây, thụ phấn cho cây với phần hoa từ cây bố mẹ thứ hai, và thu hoạch hạt từ cây, trong đó hạt là hạt ngô lai được tạo ra bằng cách lai các cây ngô chuyển gen chứa sự kiện MON 87427 với cây bố mẹ thứ hai. Ngoài ra, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra hạt ngô lai, trong đó liều thuốc diệt cỏ glyphosat hữu hiệu là nằm trong khoảng từ 45,36 g (0,1 lb) đến khoảng 1,814 kg (4 lb) trên 4047 m² (1 ac) (0,1 pound đến 4 pound trên một mẫu Anh). Sáng chế còn đề xuất phương pháp sản xuất hạt ngô lai, bao gồm thêm bước gieo hạt từ cây bố mẹ thứ hai trong khu vực và để hạt sinh trưởng thành cây ngô. Sáng chế còn đề xuất phương pháp tạo ra hạt ngô lai, trong đó cây bố mẹ thứ hai chịu được glyphosat.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp dự đoán thời gian dự tính phát triển còi của cây ngô bằng cách chọn thời kỳ phát triển theo thang đo sự phát triển tương đối, trong đó xác định giai đoạn trưởng thành đến giai đoạn phát triển còi mong muốn. Sáng chế còn đề xuất phương pháp dự đoán thời gian dự tính của sự phát triển còi của cây ngô, trong đó giai đoạn phát triển còi mong muốn là giai đoạn phát triển còi tối ưu cho phép lai giống sinh sản, gây bất dục còi, bẻ còi, và/hoặc cung cấp sự xử lý điều hòa sự phát triển cho cây ngô. Sáng chế còn đề xuất phương pháp dự đoán thời gian dự tính phát triển còi của cây ngô, trong đó giai đoạn phát triển hoa cụ thể được sử dụng để xây dựng thang đo sự phát triển tương đối là có khoảng 50% số cây trong quần thể cây ngô rụng phấn và trong đó giai đoạn phát triển đã nêu là nằm trong khoảng từ 0,62 đến 0,75 trên thang đo sự phát triển tương đối. Sáng chế còn đề xuất phương pháp dự đoán

thời gian dự tính phát triển còi của cây ngô, bao gồm thêm cung cấp sự xử lý điều hòa phát triển cho cây ngô ở giai đoạn phát triển còi mong muốn.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp sản xuất hạt ngô giống lai bằng cách gieo hạt ngô cho cây bố mẹ thứ nhất trong khu vực, cho hạt ngô sinh trưởng thành cây bố mẹ thứ nhất, xác định thời gian dự tính phát triển còi cho cây bố mẹ thứ nhất bằng cách chọn thời kỳ cây phát triển đến giai đoạn phát triển còi mong muốn theo thang đo sự phát triển tương đối, xác định thời gian dự kiến trở còi để kịp thời cung cấp sự xử lý điều hòa phát triển cho cây bố mẹ thứ nhất, bằng cách đó ngăn cản sự tự thụ phấn của cây bố mẹ thứ nhất, cung cấp sự xử lý điều hòa phát triển cho cây bố mẹ thứ nhất, thụ phấn cây bố mẹ thứ nhất với phần hoa từ cây bố mẹ thứ hai, và thu hoạch hạt từ cây bố mẹ thứ nhất, trong đó hạt là hạt ngô lai được tạo ra bằng cách lai cây bố mẹ thứ nhất với cây bố mẹ thứ hai. Sáng chế còn đề xuất hạt ngô lai được sản xuất bằng cách sử dụng phương pháp theo sáng chế. Sáng chế còn đề xuất phương pháp sản xuất hạt ngô giống lai, trong đó có bước xử lý điều hòa phát triển là glyphosat và cây bố mẹ thứ nhất có khả năng chịu glyphosat chọn lọc mô. Sáng chế còn đề xuất phương pháp sản xuất hạt ngô lai, trong đó cây bố mẹ thứ nhất là cây ngô chuyển gen chứa sự kiện MON 87427. Sáng chế còn đề xuất phương pháp tạo ra hạt ngô lai, trong đó cây bố mẹ thứ hai chịu glyphosat.

Các khía cạnh đã đề cập ở trên và các khía cạnh khác của sáng chế sẽ trở nên rõ ràng hơn nhờ sự mô tả chi tiết sau đây.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 minh họa cấu trúc của sự kiện MON 87427 của cây ngô chuyển gen. Trong hình vẽ này, [A1], [A2], và [A3] lần lượt tương ứng với vị trí liên quan trong trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, và SEQ ID NO: 5, mà nối ADN hệ gen cây ngô thuộc vùng kẹp sườn (flanking) đầu 5' của đoạn chèn gen chuyển và phần 5' của ADN đoạn chèn gen chuyển; [B1], [B2], và [B3] tương ứng với vị trí liên quan được đề cập lần lượt trong trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, và SEQ ID NO: 6, mà nối ADN hệ gen cây ngô thuộc vùng kẹp sườn (flanking) đầu 3' của đoạn chèn gen chuyển và phần 3' của ADN đoạn chèn gen chuyển; [B1], [B2], và [B3] tương ứng với vị trí liên quan trong SEQ ID NO: 7, mà bao gồm ADN hệ gen cây ngô nằm kẹp sườn đầu 5' của đoạn chèn gen chuyển và một phần của đầu 5' của đoạn chèn

gen chuyển; [D], tương ứng với vị trí liên quan trong SEQ ID NO: 8, mà bao gồm ADN hệ gen cây ngô nằm kẹp sườn đầu 3' của đoạn chèn gen chuyển và một phần của đầu 3' của đoạn chèn gen chuyển; [E], tương ứng với vị trí liên quan trong SEQ ID NO: 9 và các yếu tố khác nhau trong đoạn chèn gen chuyển; và [F] mô tả trình tự tiếp giáp của MON 87427 được mô tả trong SEQ ID NO: 10 và bao gồm SEQ ID NO: 1-9.

Fig. 2 thể hiện năng suất hạt của các cây lai chứa sự kiện MON 87427 khi được lai với cây ngô chứa sự kiện NK603 và được phun glyphosat hai lần trên một mùa với tỷ lệ 1,02 kg (2,25 lb) trên 4047 m² (1 ac) mỗi lần phun.

Fig.3 minh họa các giai đoạn phát triển cò trong việc xây dựng thang đo sự phát triển tương đối. Kích cỡ gần đúng được trình bày giữa các dấu ngoặc đơn. Trong hình vẽ này, Vg là mô phân sinh ở giai đoạn sinh dưỡng; T0 là điểm thay đổi đột ngột từ sinh dưỡng sang sinh sản; T1 là điểm sinh trưởng sinh sản nhìn thấy được (0,9 mm); T2 là mầm nhánh bên nhìn thấy được (1,8 mm); T3 là mầm bông con nhìn thấy được (4,1 mm); T4 là trục tâm và sự kéo dài trục ra hướng bên (12,9 mm); T5 là sự bắt đầu biệt hóa bao phấn (41,0 mm); T6 là sự bắt đầu biệt hóa phần (175 mm); và T7 là sự tiết bao phấn và sự rụng phần (285,0 mm).

Fig.4 minh họa sự thay đổi kích cỡ của cò giữa ba kiểu gen của ngô ở hai giai đoạn phát triển (V8 và V10).

Fig.5 minh họa sự tương quan giữa các yêu cầu GDU cho giai đoạn T5 và các yêu cầu cho P50% và cụ thể hơn cho thấy đường hồi quy được tạo ra sử dụng sự tương quan giữa yêu cầu GDU cho T5 và cho P50%. Mỗi chấm biểu diễn một dòng nội phối khác nhau, được lấy trung bình qua các vị trí.

Fig.6 minh họa ví dụ cách mà thang đo sự phát triển tương đối bộc lộ cửa sổ tối ưu về độ hiệu quả của hóa chất để tạo ra sự bất dục cò của cây ngô khi được đo bằng khả năng tung bao phấn (nguy cơ AE (%)) mà xảy ra ở các điểm 0,62 và 0,75 trên thang đo sự phát triển tương đối, trong đó đã đạt đến 62% – 75% yêu cầu GDU tổng thể đạt đến P50 và trong đó nguy cơ AE được giảm thiểu qua các dòng nội phối và các nhóm trưởng thành. Mỗi điểm dữ liệu biểu diễn các giá trị trung bình cho mỗi khoảnh đất, hoặc hai hàng có tổng cộng 32 cây. N=620

Fig.7 minh họa các giai đoạn T đóng vai trò là hàm của GDU (A) và thang đo sự phát triển tương đối (B). Mỗi đường hồi quy biểu diễn một dòng nội phối khác nhau.

Fig. 8 minh họa phần trăm của khả năng tung bao phấn (trục y) được đo ở các giai đoạn phát triển râu khác nhau (trục x) cho các khối MON 87427 và CMS.

Fig.9 minh họa độ mức độ đồng nhất về mặt di truyền của hạt và mức độ đồng nhất về tính trạng của hạt lai được tạo ra bởi MON 87427 bằng Roundup® Hybridization System (RHS) và bằng hệ thống CMS ở mức đáng kể 95%. Các đường màu đen trên biểu đồ lần lượt biểu diễn các tiêu chuẩn chất lượng mong muốn về mức độ đồng nhất về mặt di truyền và mức độ đồng nhất về tính trạng của hạt.

Mô tả vắn tắt các trình tự

SEQ ID NO: 1 là trình tự gồm hai mươi nucleotit thể hiện miền tiếp hợp 5' giữa ADN hệ gen cây ngô và cấu trúc biểu hiện gen chuyển được tích hợp.

SEQ ID NO: 2 là trình tự gồm hai mươi nucleotit thể hiện miền tiếp hợp 3' giữa ADN hệ gen cây ngô và cấu trúc biểu hiện gen chuyển được tích hợp.

SEQ ID NO: 3 là trình tự gồm sáu mươi nucleotit thể hiện miền tiếp hợp 5' giữa ADN hệ gen cây ngô và cấu trúc biểu hiện gen chuyển được tích hợp.

SEQ ID NO: 4 là trình tự gồm sáu mươi nucleotit thể hiện miền tiếp hợp 3' giữa ADN hệ gen cây ngô và cấu trúc biểu hiện gen chuyển được tích hợp.

SEQ ID NO: 5 là trình tự gồm một trăm nucleotit thể hiện miền tiếp hợp 5' giữa ADN hệ gen cây ngô và cấu trúc biểu hiện gen chuyển được tích hợp.

SEQ ID NO: 6 là trình tự gồm một trăm nucleotit thể hiện miền tiếp hợp 3' giữa ADN hệ gen cây ngô và cấu trúc biểu hiện gen chuyển được tích hợp.

SEQ ID NO: 7 là trình tự 5' kẹp sườn ADN được chèn của sự kiện MON 87427 cho đến và bao gồm miền chứa đoạn chèn ADN của gen chuyển.

SEQ ID NO: 8 là trình tự 3' kẹp sườn ADN được chèn của sự kiện MON 87427 cho đến và bao gồm miền chứa đoạn chèn ADN của gen chuyển.

SEQ ID NO: 9 là trình tự được tích hợp hoàn toàn vào ADN hệ gen cây ngô và chứa cấu trúc biểu hiện ADN.

SEQ ID NO: 10 là trình tự nucleotit biểu diễn đoạn tiếp giáp của trình tự 5' kẹp sườn ADN được chèn của sự kiện MON 87427 (SEQ ID NO: 7), trình tự được tích hợp hoàn toàn vào ADN hệ gen cây ngô và chứa cấu trúc biểu hiện ADN (SEQ ID NO: 9), và trình tự 3' kẹp sườn ADN được chèn của sự kiện MON 87427 (SEQ ID NO: 8) và bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1-6.

SEQ ID NO: 11 là đoạn môi thử nghiệm đặc hiệu gen chuyển Event-Primer-1 SQ20052 được sử dụng để nhận biết MON 87427. Sản phẩm khuếch đại (amplicon) PCR được tạo ra từ thử nghiệm TAQMAN® (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) bằng cách sử dụng kết hợp các đoạn môi có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 11 và SEQ ID NO: 12 là kết quả dương tính đối với sự có mặt của sự kiện MON 87427.

SEQ ID NO: 12 là đoạn môi thử nghiệm đặc hiệu gen chuyển Event-Primer-1 SQ20052 được sử dụng để nhận biết MON 87427.

SEQ ID NO: 13 là mẫu dò thử nghiệm đặc hiệu gen chuyển Event 6-FAM Probe PB10016 được sử dụng để nhận biết MON 87427. Mẫu dò này là oligonucleotit tổng hợp được gắn nhãn 6FAMTM. Sự phát tín hiệu huỳnh quang trong phản ứng khuếch đại bằng cách sử dụng các đoạn môi có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 11-12 kết hợp với mẫu dò được gắn nhãn 6FAMTM để xác định sự kiện MON 87427 trong thử nghiệm TAQMAN®.

SEQ ID NO: 14 là đoạn môi thử nghiệm đặc hiệu gen chuyển Internal Control Primer-1 SQ1241.

SEQ ID NO: 15 là đoạn môi thử nghiệm đặc hiệu gen chuyển Internal Control Primer-1 SQ1242.

SEQ ID NO: 16 là mẫu dò thử nghiệm đặc hiệu gen chuyển Internal Control VIC Probe PB0084.

SEQ ID NO: 17 là đoạn môi thử nghiệm đặc hiệu sự kiện Event Primer-1 SQ20052 được sử dụng để nhận biết MON 87427. Sản phẩm khuếch đại (amplicon) PCR được tạo ra từ thử nghiệm TAQMAN® (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) bằng cách sử dụng kết hợp các đoạn môi có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 17 và SEQ ID NO: 18 cho kết quả dương tính đối với sự kiện MON 87427.

SEQ ID NO: 18 là đoạn mồi thử nghiệm đặc hiệu sự kiện Event Primer-1 SQ12886 được sử dụng để nhận biết MON 87427.

SEQ ID NO: 19 là mẫu dò thử nghiệm đặc hiệu gen chuyển Event 6-FAM Probe PB4352 được sử dụng để nhận biết MON 87427.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các định nghĩa và phương pháp được mô tả bên dưới được đưa ra nhằm để hiểu rõ bản chất của sáng chế và hướng dẫn người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này thực hiện sáng chế. Trừ khi được chú thích khác, các thuật ngữ được hiểu theo cách sử dụng thông thường bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật liên quan.

Theo sáng chế, thuật ngữ "ngô" có nghĩa là *Zea mays* và bao gồm tất cả các giống cây mà có thể được nhân giống với ngô, bao gồm các loại ngô kiểu đại cũng như các cây ngô thuộc loài *Zea* mà cho phép nhân giống giữa các loài.

"Glyphosat" chỉ N-phosphonometylglyxin, là thuốc diệt cỏ mà ức chế enolpyruvylshikimat 3-phosphat synthaza (EPSPS). Glyphosat ngăn cản sự tổng hợp amino axit thơm bằng cách ức chế EPSPS. Glyphosat có bán trên thị trường với nhãn hiệu thuốc diệt cỏ Roundup® (Monsanto Company, St. Louis, Missouri).

Sáng chế đề xuất sự kiện gen chuyển MON 87427 của cây ngô (còn được gọi là MON 87427). Theo sáng chế, thuật ngữ "sự kiện" chỉ sản phẩm được tạo ra bởi sự tác động chèn phân tử axit nucleic chuyển gen vào hệ gen của cây, tức là, bằng cách tác động biến nạp thực vật để tạo ra cây chuyển gen. "Sự kiện" do đó được tạo ra bằng các tác động của con người bao gồm: (i) biến nạp tế bào cây trong phòng thí nghiệm với phân tử axit nucleic mà bao gồm gen chuyển quan tâm, tức là, chèn cấu trúc hoặc phân tử axit nucleic vào hệ gen của tế bào cây, (ii) tái tạo quần thể của cây chuyển gen tạo ra từ việc chèn phân tử axit nucleic vào trong hệ gen của cây, và (iii) chọn cây cụ thể mà đặc trưng bởi đoạn chèn phân tử axit nucleic vào vị trí cụ thể trong hệ gen của cây. Do đó, sự kiện này có thể được mô tả duy nhất và đặc biệt bằng trình tự axit nucleic biểu diễn ít nhất một phần của phân tử ADN liên kết mà đã được tạo ra trong sự kiện bởi sự chèn của phân tử axit nucleic vào vị trí cụ thể trong hệ gen của cây và bao gồm một phần của ADN hệ gen của chính cây, mà kẹp sườn và được ghép tự nhiên với

phân tử ADN được chèn, và phân tử axit nucleic được chèn. Sự kiện là tái tổ hợp, được tạo ra bởi các tác động của con người, và không có trong các cây không chuyển gen.

Do đó, thuật ngữ "sự kiện" chỉ cây được biến nạp ban đầu (thể biến nạp) bao gồm phân tử axit nucleic được chèn vào vị trí đặc biệt trong hệ gen của cây. Thuật ngữ "sự kiện" cũng chỉ tất cả các thế hệ con được bắt nguồn từ thể biến nạp mà bao gồm phân tử axit nucleic được chèn vào vị trí cụ thể trong hệ gen của cây. Thế hệ con đã nêu do đó là cây biến đổi gen và chứa sự kiện. Thế hệ con có thể được tạo ra bằng phương pháp bất kỳ bao gồm tự thụ phấn, lai với cây khác mà chứa gen chuyển giống nhau hoặc khác nhau, và/hoặc lai với cây không chuyển gen, như cây từ giống khác. Ngay cả sau nhiều thế hệ, trong cây bất kỳ được gọi là cây thế hệ con MON 87427, ADN được chèn và ADN kẹp sườn từ cây được biến nạp ban đầu sẽ có mặt và dễ nhận biết.

Thuật ngữ "sự kiện" cũng chỉ phân tử ADN tiếp giáp được tạo ra trong thể biến nạp gốc (bao gồm ADN được chèn và ADN hệ gen cây ngô kẹp sườn liền kề với từng bên của ADN được chèn) hoặc bất kỳ phân tử ADN bao gồm trình tự axit nucleic đó. Phân tử ADN tiếp giáp được tạo ra bằng tác động chèn phân tử axit nucleic chuyển gen vào hệ gen của cây, tức là, bằng tác động biến nạp, và là đặc thù và duy nhất đối với sự kiện cụ thể. Sự sắp xếp của ADN được chèn trong sự kiện 87427 trong mối liên hệ với ADN hệ gen của cây ngô phụ cận là đặc thù và duy nhất cho MON 87427. Phân tử ADN này cũng là phần tích hợp của nhiễm sắc thể ngô chứa sự kiện MON 87427 mà bao gồm sự kiện 87427 và như vậy ổn định trong cây và có thể được di truyền bởi thế hệ con bất kỳ của cây.

Các cây chuyển gen chứa sự kiện MON 87427 của cây ngô thể hiện khả năng chịu glyphosat chọn lọc mô được thị trường chấp nhận. Trong MON 87427, các mô sinh dưỡng của ngô và các giao tử cái của ngô có khả năng chịu glyphosat, nhưng các giao tử đực chính của ngô tối ưu cho sự phát triển phần ngô không có khả năng chịu glyphosat. Các cây chứa sự kiện MON 87427 được xử lý bằng glyphosat do đó có thể được sử dụng làm cây mẹ để sản xuất hạt lai.

Theo sáng chế, thuật ngữ "tái tổ hợp" chỉ ADN và/hoặc protein và/hoặc sinh vật không có trong tự nhiên mà bình thường sẽ không tìm thấy được ở trong tự nhiên và được tạo ra bởi sự can thiệp của con người, tức là, bởi thao tác của con người. Sự can

thiệp của con người có thể tạo ra phân tử ADN và/hoặc cây trồng hoặc hạt. Theo sáng chế, “phân tử ADN tái tổ hợp” là phân tử ADN bao gồm sự kết hợp của các phân tử ADN mà thường không tồn tại cùng nhau và là kết quả của sự can thiệp của con người, ví dụ, phân tử ADN tạo thành bằng sự kết hợp của ít nhất hai phân tử ADN khác loại với nhau, và/hoặc phân tử ADN được tổng hợp nhân tạo và có trình tự nucleotit có nguồn gốc từ trình tự nucleotit thường xuất hiện trong tự nhiên, và/hoặc phân tử ADN bao gồm phân tử axit nucleic được đưa vào ADN hệ gen của tế bào chủ và ADN kẹp sườn được kết hợp của hệ gen của tế bào chủ. Ví dụ về phân tử ADN tái tổ hợp là phân tử ADN bao gồm ít nhất một trình tự được chọn từ các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1-10. Theo sáng chế, “cây tái tổ hợp” là cây thường không xuất hiện trong tự nhiên, mà là kết quả của sự can thiệp của con người, và chứa gen chuyển và/hoặc phân tử ADN khác loại được đưa vào trong hệ gen của nó. Kết quả của sự can thiệp biến đổi của con người tạo ra cây tái tổ hợp khác biệt rõ rệt với cây kiểu dại liên quan. Ví dụ về cây tái tổ hợp là cây ngô chuyển gen chứa sự kiện MON 87427.

Theo sáng chế, thuật ngữ “gen chuyển” chỉ phân tử axit nucleic được con người đưa vào hệ gen của sinh vật và là kết quả của sự can thiệp của con người. Gen chuyển đó có thể khác loại với tế bào chủ. Thuật ngữ “chuyển gen” bao gồm cả gen chuyển, ví dụ, “cây chuyển gen” chỉ cây chứa gen chuyển tức là, phân tử axit nucleic được con người đưa vào hệ gen của sinh vật, và là kết quả của sự can thiệp của con người. Theo sáng chế, thuật ngữ “khác loại” chỉ phân tử thứ nhất thường không tìm thấy được trong sự kết hợp với phân tử thứ hai trong tự nhiên. Ví dụ, phân tử có thể có nguồn gốc từ loài thứ nhất và được chèn vào trong hệ gen của loài thứ hai. Phân tử này do đó sẽ là phân tử khác loại, tức là, khác loại với sinh vật và được con người đưa vào hệ gen của sinh vật.

Theo sáng chế, thuật ngữ “khảm” chỉ phân tử ADN đơn được tạo ra bằng cách dung hợp phân tử ADN thứ nhất với phân tử ADN thứ hai, trong đó phân tử ADN thứ nhất hoặc phân tử ADN thứ hai này thường không được tìm thấy trong cấu trúc đó, có nghĩa là, được dung hợp với nhau. Do đó, phân tử ADN khảm là phân tử ADN mới và thường không xuất hiện trong tự nhiên. Ví dụ về phân tử ADN khảm là phân tử ADN bao gồm ít nhất một trình tự được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1-10.

Sáng chế đề xuất phân tử ADN và các trình tự nucleotit tương ứng của các phân tử này. Theo sáng chế, thuật ngữ “ADN”, “phân tử ADN”, “phân tử axit nucleic” chỉ phân tử ADN sợi kép của hệ gen hoặc có nguồn gốc tổng hợp, có nghĩa là, polyme của các bazơ deoxyribonucleotit hoặc của phân tử polynucleotit, theo hướng từ đầu 5’ (hướng ngược) đến đầu 3’ (hướng xuôi). Theo sáng chế, thuật ngữ “trình tự ADN”, “trình tự nucleotit” chỉ trình tự nucleotit của phân tử ADN. Danh pháp được sử dụng trong sáng chế là danh pháp được quy định tại Mục 37 của Bộ Luật Hoa Kỳ về các quy định Liên bang §1.822 và được nêu trong các bảng trong tiêu chuẩn WIPO ST.25 (1998), Phụ lục 2, các Bảng 1 và 3. Theo sáng chế và như được sử dụng trong bản mô tả, các trình tự nucleotit theo sáng chế là các trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 1-10 và các đoạn của chúng, được đưa ra bằng cách tham chiếu đến chỉ một sợi trong số hai sợi trình tự nucleotit bổ sung, nhưng theo ngụ ý, các trình tự bổ sung (có nghĩa là, các trình tự của sợi bổ sung), trong lĩnh vực kỹ thuật còn được gọi là các trình tự bổ sung ngược, cũng nằm trong phạm vi của sáng chế và rõ ràng thuộc phạm vi đối tượng được yêu cầu bảo hộ. Do đó, theo sáng chế, khi tham chiếu đến các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1-10 và các đoạn của nó bao gồm và chỉ trình tự của sợi bổ sung và các đoạn của nó.

Theo sáng chế, thuật ngữ "đoạn" chỉ một phần của hoặc một bộ phận nhỏ hơn không đầy đủ của một tổng thể. Ví dụ, các đoạn của trình tự nêu trong SEQ ID NO: 10 sẽ bao gồm các trình tự mà tối thiểu là khoảng 10 nucleotit, ít nhất khoảng 20 nucleotit, hoặc ít nhất khoảng 50 nucleotit của trình tự nêu trong SEQ ID NO: 10.

Trình tự nucleotit tương ứng với trình tự nucleotit đầy đủ của ADN chuyển gen được chèn và các đoạn cơ bản của ADN hệ gen của cây ngô nằm kẹp sườn từng đầu của ADN chuyển gen được chèn theo sáng chế là trình tự nêu trong SEQ ID NO: 10. Phần phụ của đoạn này là ADN chuyển gen được chèn (còn được gọi là đoạn chèn gen chuyển hoặc AND được chèn) được đề cập là trình tự nêu trong SEQ ID NO: 9. Trình tự nucleotit của ADN hệ gen của cây ngô được liên kết tự nhiên bởi cầu nối liên kết phosphodiester với và do đó nằm kẹp sườn phía đầu 5' của ADN chuyển gen được chèn, và chứa 10 nucleotit của ADN gen chuyển được chèn vào, được trình bày trong trình tự nêu trong SEQ ID NO: 7. Trình tự nucleotit của ADN hệ gen của cây ngô được liên kết tự nhiên bởi cầu nối liên kết phosphodiester với và do đó nằm kẹp sườn phía đầu 3'

của ADN chuyển gen được chèn, và chứa 10 nucleotit của ADN gen chuyển được chèn vào, có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 8.

MON 87427 bao gồm thêm hai vùng được gọi là vị trí tiếp hợp. "Vị trí tiếp hợp" là vị trí mà một đầu của ADN chuyển gen được chèn đã được chèn vào và được nối với ADN hệ gen. Nhịp tiếp hợp, tức là, kéo dài ngang, một phần của ADN chuyển gen được chèn và ADN của hệ gen kẹp sườn liền kề và như vậy bao gồm điểm nối của hai đoạn này đóng vai trò là một phân tử tiếp giáp. Một vị trí tiếp hợp là ở đầu 5' của ADN chuyển gen được chèn và một là ở đầu 3' của ADN chuyển gen được chèn, theo sáng chế được đề cập lần lượt là vị trí tiếp hợp 5' và 3'. "Trình tự tiếp hợp" hoặc "vùng tiếp hợp" chỉ trình tự ADN và/hoặc phân tử ADN tương ứng tại vị trí tiếp hợp. Các trình tự tiếp hợp của MON 87427 có thể được thiết kế bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này bằng cách sử dụng trình tự nêu trong SEQ ID NO: 10. Các ví dụ về trình tự tiếp hợp của MON 87427 được cung cấp là các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1-6. SEQ ID NO: 1 là trình tự bao gồm 20 nucleotit tạo thành vị trí tiếp hợp giữa ADN hệ gen cây ngô và đầu 5' của ADN gen chuyển được chèn vào; SEQ ID NO: 3 là trình tự nucleotit 60 tạo thành vị trí tiếp hợp giữa ADN hệ gen cây ngô và đầu 5' của ADN gen chuyển được chèn vào; SEQ ID NO: 5 là trình tự gồm 100 nucleotit tạo thành vị trí tiếp hợp giữa ADN hệ gen cây ngô và đầu 5' của ADN gen chuyển được chèn vào. SEQ ID NO: 2 là trình tự gồm 20 nucleotit tạo thành vị trí tiếp hợp giữa ADN hệ gen cây ngô và đầu 3' của ADN gen chuyển được chèn vào; SEQ ID NO: 4 là trình tự gồm 60 nucleotit tạo thành vị trí tiếp hợp giữa ADN hệ gen cây ngô và đầu 3' của ADN gen chuyển được chèn vào; SEQ ID NO: 6 là trình tự gồm 60 nucleotit tạo thành vị trí tiếp hợp giữa ADN hệ gen cây ngô và đầu 3' của ADN được chèn. Fig. 1 minh họa sự sắp xếp vật lý của các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1-10 theo chiều từ 5' đến 3'. Đoạn của ADN bất kỳ có nguồn gốc từ MON 87427 chuyển gen mà bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1-6 đều thuộc phạm vi của sáng chế. Do đó, sáng chế đề xuất phân tử ADN chứa ít nhất một trình tự nucleotit như được nêu trong SEQ ID NO: 1-6.

Các trình tự tiếp hợp của sự kiện MON 87427 có mặt đóng vai trò là một phần của hệ gen trong cây, hạt, hoặc tế bào chứa sự kiện MON 87427 chuyển gen của cây ngô. Việc nhận biết một hoặc nhiều trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ

ID NO: 1-6 trong mẫu có thu được từ cây ngô, hạt hoặc bộ phận của cây ngô cho thấy rằng đã thu được ADN từ MON 87427 và là chỉ thị sự xuất hiện của ADN từ MON 87427 trong mẫu.

Sáng chế đề xuất các phân tử ADN, ví dụ mà có thể được sử dụng làm đoạn mồi hoặc mẫu dò để xác định sự có mặt của ADN có nguồn gốc từ sự kiện MON 87427 của cây ngô trong mẫu. Các đoạn mồi hoặc mẫu dò đó đặc hiệu đối với trình tự axit nucleic đích và như vậy là hữu ích để nhận biết các trình tự axit nucleic MON 87427 bằng các phương pháp của sáng chế được mô tả trong bản mô tả.

"Đoạn mồi" thường là phân tử axit nucleic được thiết kế để sử dụng trong các phương pháp ủ hoặc lai đặc hiệu bao gồm sự khuếch đại bằng nhiệt. Cặp đoạn mồi có thể được sử dụng với ADN khuôn, chẳng hạn như mẫu của ADN hệ gen của cây ngô, trong khuếch đại nhiệt, chẳng hạn như phản ứng chuỗi polymeraza (PCR), để tạo ra sản phẩm khuếch đại (amplicon), trong đó sản phẩm khuếch đại được tạo ra từ phản ứng đó sẽ có trình tự ADN tương ứng với trình tự của ADN khuôn được đặt giữa hai vị trí tại đó các đoạn mồi được lai với khuôn. Theo sáng chế, "sản phẩm khuếch đại" là các đoạn ADN được tổng hợp bằng cách sử dụng các kỹ thuật khuếch đại. Các sản phẩm khuếch đại theo sáng chế bao gồm một hoặc nhiều trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1-10, hoặc các đoạn của nó. Đoạn mồi thường được thiết kế để lai với sợi ADN đích bổ sung để tạo thành đoạn lai giữa đoạn mồi và sợi ADN đích, và sự có mặt của đoạn mồi là điểm nhận ra bởi polymeraza để kéo dài của đoạn mồi (có nghĩa là, sự trùng hợp của các nucleotit bổ sung thành phân tử nucleotit dài) bằng cách sử dụng khuôn là sợi ADN đích. Cặp đoạn mồi, theo sáng chế, chỉ việc sử dụng hai đoạn mồi liên kết với các sợi ngược của đoạn nucleotit xoắn kép để khuếch đại tuyến tính đoạn nucleotit giữa các vị trí đích để liên kết bằng các thành phần riêng biệt của cặp đoạn mồi. Các ví dụ về trình tự đoạn mồi được đề cập là các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 11-12, SEQ ID NO: 14-15 và SEQ ID NO: 17-18. Cặp đoạn mồi có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 14-15 và cặp đoạn mồi có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 17-18, mỗi trình tự có phân tử ADN thứ nhất và phân tử ADN thứ hai (mà khác với phân tử ADN thứ nhất) ở chỗ cả hai phân tử, mỗi phân tử có chiều dài các nucleotit liên kế đủ để tạo thành chức năng của đoạn mồi ADN mà, khi được sử dụng đồng thời trong phản ứng

khuếch đại ADN với khuôn ADN có nguồn gốc từ MON 87427, sẽ tạo ra sản phẩm khuếch đại để xác định sự có mặt của ADN từ MON 87427 trong mẫu.

"Mẫu dò" là phân tử axit nucleic mà bổ sung cho sợi axit nucleic đích để sử dụng trong các phương pháp ủ hoặc lai. Các mẫu dò theo sáng chế không chỉ bao gồm axit deoxyribonucleic hoặc axit ribonucleic mà còn bao gồm các polyamit và các vật chất mẫu dò khác mà liên kết một cách đặc hiệu với trình tự ADN đích và việc sự phát hiện sự liên kết đó có thể hữu ích để xác định, phân biệt và xác định, hoặc xác nhận sự có mặt của trình tự ADN đích trong mẫu cụ thể. Mẫu dò có thể được gắn với nhãn để có thể phát hiện được bằng phương pháp thông thường hoặc bởi phân tử chỉ thị, ví dụ, chất đồng vị phóng xạ, phôi tử, chất phát quang hóa học, hoặc enzym. Ví dụ về các trình tự hữu ích làm mẫu dò để phát hiện MON 87427 là các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1-2, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 16 và SEQ ID NO: 19.

Phương pháp thiết kế và sử dụng đoạn mồi và mẫu dò là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và đã được mô tả, ví dụ, bởi, Joseph Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001) and *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley-Blackwell. các phân tử ADN bao gồm các đoạn có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1-10 và hữu ích làm các đoạn mồi và mẫu dò để phát hiện MON 87427 và có thể dễ dàng được thiết kế bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật tương ứng về sử dụng mẫu dò trong các phương pháp lai phát hiện, ví dụ, phương pháp thẩm tách Southern.

Các phân tử ADN và các trình tự nucleotit tương ứng được cung cấp theo sáng chế là hữu ích cho, một vài trong số các lợi ích đó, là việc nhận biết MON 87427, chọn các giống cây hoặc các cây lai bao gồm MON 87427, phát hiện sự có mặt của ADN có nguồn gốc từ MON 87427 chuyển gen trong mẫu, và kiểm tra sự có mặt và/hoặc sự vắng mặt của MON 87427 hoặc các phần cây có nguồn gốc từ MON 87427.

Sáng chế đề xuất cây ngô, thể hệ con, hạt, tế bào của cây, bộ phận của cây, và các sản phẩm hàng hóa. Các cây, thể hệ con, hạt, tế bào cây, các bộ phận của cây, và các sản phẩm hàng hóa chứa lượng nucleotit có thể phát hiện được trong sáng chế, có nghĩa là, chẳng hạn như phân tử axit nucleic bao gồm ít nhất một trình tự được đề cập trong các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1-10. Các cây, thể hệ con, hạt, tế bào cây các bộ phận của cây trong sáng chế có thể cũng chứa một hoặc nhiều gen chuyển bổ sung.

Gen chuyển đó có thể là bất kỳ trình tự nucleotit mã hóa protein hoặc phân tử RNA ban cho tính trạng mong muốn bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở khả năng kháng sâu bọ tăng, hiệu quả sử dụng nước tăng, tính năng hiệu suất tăng, khả năng chống hạn hán tăng, chất lượng hạt tăng, chất lượng dinh dưỡng được cải thiện, và/hoặc khả năng chịu thuốc diệt cỏ tăng, trong đó tính trạng mong muốn này được so với cây ngô thiếu gen chuyển bổ sung đó.

Sáng chế đề xuất cây ngô, thể hệ con, hạt, tế bào cây, và các bộ phận của cây, và lá có nguồn gốc từ gen chuyển MON 87427 của cây ngô. Mẫu hạt đại diện chứa sự kiện MON 87427 đã được nộp lưu theo Hiệp ước Budapest cho mục đích cho phép sáng chế. Cơ quan nhận nộp lưu là Bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật Hoa Kỳ (ATCC) có địa chỉ tại 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia USA, Zip Code 20110. Kho ATCC đã được chỉ định dưới số truy cập PTA-7899 đối với hạt chứa sự kiện MON 87427.

Sáng chế đề xuất vi sinh vật chứa phân tử ADN có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1-10 trong hệ gen của nó. Ví dụ về vi sinh vật đã nói là tế bào cây chuyển gen. Các vi sinh vật, chẳng hạn như tế bào cây trong sáng chế, hữu ích trong nhiều ứng dụng công nghiệp, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở: (i) sử dụng làm công cụ nghiên cứu cho khảo cứu khoa học hoặc nghiên cứu công nghiệp; (ii) sử dụng trong nuôi cấy để sản xuất các sản phẩm cacbonhydrat, lipid, axit nucleic, hoặc protein ngoại sinh hoặc tái tổ hợp hoặc các phân tử nhỏ mà có thể được sử dụng cho nghiên cứu khoa học hoặc các sản phẩm công nghiệp tiếp theo; và (iii) sử dụng với kỹ thuật nuôi cấy mô thực vật hiện đại để sản xuất cây hoặc các môi trường nuôi cấy mô cây chuyển gen mà sau đó có thể được sử dụng cho nghiên cứu hoặc sản xuất nông nghiệp. Sản xuất và sử dụng các vi sinh vật chẳng hạn như tế bào cây chuyển gen sử dụng kỹ thuật vi sinh hiện đại và sự can thiệp của con người để sản xuất vi sinh vật đơn nhất, được tạo ra bởi con người. Trong quy trình này, ADN tái tổ hợp được chèn vào trong hệ gen của tế bào cây để tạo ra tế bào cây chuyển gen mà riêng biệt và duy nhất từ các tế bào cây xuất hiện trong tự nhiên. Tế bào cây chuyển gen này sau đó có thể được nuôi cấy nhiều như các tế bào vi khuẩn và nấm men sử dụng kỹ thuật vi sinh hiện đại và có thể tồn tại trong trạng thái đơn bào không biệt hóa. Thành phần di truyền của tế bào và kiểu hình của cây mới là hiệu quả kỹ thuật được tạo ra bởi sự tích hợp của ADN khác

loài vào trong hệ gen của tế bào. Khía cạnh khác của sáng chế là phương pháp sử dụng vi sinh vật trong sáng chế. Phương pháp sử dụng các vi sinh vật của sáng chế, chẳng hạn như tế bào cây chuyển gen, bao gồm (i) phương pháp sản xuất tế bào chuyển gen bằng cách tích hợp ADN tái tổ hợp vào trong hệ gen của tế bào và sau đó sử dụng tế bào này để tạo ra các tế bào bổ sung chứa ADN khác loại; (ii) phương pháp nuôi cấy tế bào chứa ADN tái tổ hợp sử dụng các kỹ thuật vi sinh hiện đại; (iii) phương pháp sản xuất và tinh chế các sản phẩm cacbonhydrat, lipid, axit nucleic, hoặc protein từ các tế bào được nuôi cấy; và (iv) phương pháp sử dụng kỹ thuật nuôi cấy mô hiện đại với tế bào cây chuyển gen để sản xuất cây chuyển gen hoặc các canh trường nuôi cấy mô của cây chuyển gen.

Cây theo sáng chế có thể truyền sự kiện ADN, bao gồm đoạn chèn gen chuyển, cho thế hệ con. Theo sáng chế, "thế hệ con" bao gồm cây, hạt, tế bào cây, và/hoặc bộ phận của cây bất kỳ mà có thể tái sinh miễn là chứa sự kiện ADN có nguồn gốc từ cây và/hoặc phần tử axit nucleic ban đầu có ít nhất một trong các trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 1-10. Cây, thế hệ con và hạt có thể là đồng hợp tử hoặc dị hợp tử với gen chuyển. Thế hệ con có thể được sinh trưởng từ hạt được tạo ra bởi cây chứa sự kiện MON 87427 và/hoặc từ hạt được tạo ra bởi cây được thụ phấn với phần hoa từ cây MON 87427. Cây theo sáng chế có thể được sản xuất bằng cách tự thụ phấn hoặc thụ phấn chéo và/hoặc có thể được sử dụng trong các phương pháp tự thụ phấn hoặc thụ phấn chéo. Do đó, trong một phương án, cây MON 87427 có thể được thụ phấn chéo bởi cây ngô khác nhau để tạo ra con cháu lai. Các phương pháp nhân giống hữu ích với các cây ngô MON 87427 là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Sáng chế đề xuất bộ phận của cây có nguồn gốc từ MON 87427. Theo sáng chế, "bộ phận của cây" chỉ bộ phận bất kỳ của cây chứa vật liệu có nguồn gốc từ cây MON 87427. Các bộ phận của cây bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phần hoa, nõn, quả, hoa, rễ hoặc mô của thân, sợi và lá. Các bộ phận của cây có thể phát triển và tồn tại độc lập, không thể phát triển và tồn tại độc lập, có thể tái sinh và/hoặc không thể tái sinh.

Sáng chế còn đề xuất sản phẩm hàng hóa mà được tạo ra từ gen chuyển MON 87427 của cây ngô và bao gồm phân tử axit nucleic có trình tự nucleotit được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1-10. Theo sáng chế, "sản phẩm

hàng hóa" chỉ chế phẩm hoặc sản phẩm bất kỳ chứa vật liệu có nguồn gốc từ cây, hạt, tế bào thực vật, hoặc bộ phận của cây ngô chứa sự kiện MON 87427. Các sản phẩm hàng hóa có thể là thể sống hoặc ở dạng thể không sống. Các sản phẩm hàng hóa không thể tồn tại và phát triển độc lập bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, hạt và hạt không thể tồn tại và phát triển độc lập, hạt đã được chế biến, mô của cây được bảo quản lạnh, và mô của cây đã được chế biến; hạt và các bộ phận của cây đã được chế biến cho thức ăn động vật để tiêu thụ bởi động vật trên cạn và/hoặc động vật thủy sinh, dầu, bột xay thô, bột, sản phẩm dạng vảy, cám, sợi, sữa, pho mát, giấy, kem, rượu vang, và thực phẩm bất kỳ để tiêu thụ bởi con người; và sinh khối và các sản phẩm nhiên liệu. Các sản phẩm hàng hóa là thể sống bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, hạt và tế bào thực vật. Do đó, gen chuyển MON 87427 của cây ngô có thể được sử dụng để tạo ra sản phẩm hàng hóa bất kỳ thường thu được từ ngô. Sản phẩm hàng hóa có nguồn gốc từ MON 87427 có thể chứa ít nhất lượng ADN đặc trưng và đơn nhất có thể phát hiện được tương ứng với MON 87427, và cụ thể là có thể chứa lượng phân tử axit nucleic có thể phát hiện được có ít nhất một trong các trình tự trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1-10. Sự phát hiện ra một hoặc nhiều trình tự này trong mẫu của sản phẩm hàng hóa có nguồn gốc từ, được tạo ra từ, chứa, hoặc bao gồm cây ngô, hạt ngô, tế bào cây ngô, hoặc bộ phận của cây ngô thể tính kết luận và xác định sự có mặt của vật liệu sinh học có nguồn gốc từ sự kiện MON87427 ở ngô trong sản phẩm hàng hóa đã nêu, và sự phát hiện của phân tử axit nucleic đã nêu này có thể được sử dụng để xác định hàm lượng và/hoặc nguồn của sản phẩm hàng hóa đó. Phương pháp phát hiện chuẩn bất kỳ cho các phân tử nucleotit có thể được sử dụng, bao gồm các phương pháp phát hiện được bộc lộ theo sáng chế.

Cây, thế hệ con, hạt, tế bào thực vật, các bộ phận của cây và các sản phẩm hàng hóa theo sáng chế do đó hữu ích cho sự sinh trưởng của cây cho mục đích tạo ra hạt và/hoặc các bộ phận của cây chứa MON 87427 cho các mục đích nông nghiệp, tạo ra thế hệ con chứa MON 87427 cho các mục đích nhân giống và nghiên cứu cây, sử dụng các kỹ thuật vi sinh cho các ứng dụng công nghiệp và nghiên cứu và bán cho người tiêu dùng, trong số các lợi ích khác.

Sáng chế đề xuất phương pháp phòng trừ cỏ dại sử dụng thuốc diệt cỏ glyphosat và MON 87427. Phương pháp phòng trừ cỏ dại trên cánh đồng được đề xuất và

phương pháp này bao gồm các bước: trồng cây giống hoặc cây lai chứa MON 87427 trên cánh đồng và sử dụng liều thuốc diệt cỏ glyphosat hữu hiệu vào cánh đồng cho mục đích phòng trừ cỏ dại trên cánh đồng mà không làm tổn hại đến cây chứa MON 87427. Việc sử dụng thuốc diệt cỏ glyphosat này có thể thực hiện trước khi cỏ mọc, có nghĩa là, tại thời điểm bất kỳ sau khi hạt MON 87427 được gieo và trước khi cây MON 87427 mọc, hoặc sau khi mọc, có nghĩa là, tại thời điểm bất kỳ sau khi cây MON 87427 mọc. Liều glyphosat hữu hiệu có tác dụng diệt cỏ để sử dụng trên cánh đồng gồm có phạm vi từ khoảng 0,0454 kg glyphosat trên hecta đến nhiều nhất là khoảng 1,816 kg glyphosat trên hecta trong một mùa sinh trưởng. Có thể sử dụng glyphosat nhiều lần trong một mùa sinh trưởng, ví dụ, hai lần sử dụng (chẳng hạn như sử dụng trước khi gieo và sử dụng sau khi mọc hoặc sử dụng trước khi mọc và sử dụng sau khi mọc) hoặc ba lần sử dụng (chẳng hạn như sử dụng trước khi gieo, sử dụng trước khi mọc, và sử dụng sau khi mọc).

Phương pháp tạo ra gen chuyển MON 87427 của cây ngô chịu thuốc diệt cỏ được đề xuất. Cây thế hệ con được tạo ra bằng các phương pháp này có thể là cây giống hoặc cây lai; có thể được sinh trưởng từ các hạt được tạo ra bởi cây và/hoặc hạt chứa MON 87427 được tạo ra bởi cây được thụ phấn với phấn hoa từ cây MON 87427; và có thể là đồng hợp tử hoặc dị hợp tử đối với gen chuyển. Thế hệ con sau đó có thể được tự thụ phấn hoặc thụ phấn chéo.

Cây ngô chịu được việc sử dụng thuốc diệt cỏ glyphosat có thể được tạo ra bằng cách lai giống hữu tính cây MON 87427 bao gồm phân tử axit nucleic bao gồm ít nhất một trong các trình tự được thuộc các trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 1-10 với cây ngô khác và bằng cách đó tạo ra hạt, hạt sau đó được thu gom và được trồng để phát triển thành cây thế hệ con. Thế hệ con lại này sau đó có thể được xử lý với thuốc diệt cỏ glyphosat và chọn lọc thế hệ con mà có khả năng chịu thuốc diệt cỏ glyphosat. Ngoài ra, các cây thế hệ con này có thể được phân tích bằng cách sử dụng các phương pháp xác định để chọn các cây thế hệ con chứa ADN MON 87427.

Trong thực hành các phương pháp trong sáng chế, bước lai giống hữu tính cây này với cây khác, tức là, sự thụ phấn chéo có thể được thực hiện hoặc được làm dễ dàng bởi sự can thiệp của con người, ví dụ: thao tác thu gom phấn của con người từ cây này và cho phấn này tiếp xúc với vòi nhụy hoặc núm nhụy của cây thứ hai và sau

đó tùy ý ngăn cản sự thụ phấn khác của cây đã được thụ phấn; thao tác của con người và/hoặc các tác động loại bỏ (ví dụ, bằng cách bẻ cờ), tiêu diệt (ví dụ, bằng cách sử dụng các hóa chất), hoặc bọc nhị hoa hoặc bao phấn của cây để mà từ đó ngăn cản sự tự thụ phấn tự nhiên và sự thụ phấn chéo sẽ phải diễn ra để sự sinh sản xảy ra, bằng cách con người đưa côn trùng thụ phấn vào vị trí cho "sự thụ phấn trực tiếp" (ví dụ, bằng cách đưa các tổ ong trong vườn cây ăn quả hoặc các cánh đồng hoặc bằng cách bao phủ cây với côn trùng thụ phấn); bằng thao tác mở hoặc loại bỏ của con người đối với các bộ phận của hoa để cho phép thay thế hoặc tiếp xúc phấn hoa từ bên ngoài lên vòi nhụy hoặc núm nhụy (ví dụ, ở cây ngô mà việc trở cờ tự nhiên làm cản trở hoặc ngăn cản sự thụ phấn chéo, khiến cho chúng bắt buộc phải thụ phấn một cách tự nhiên mà không có sự can thiệp của con người); bằng cách thay thế có chọn lọc các cây (ví dụ, trồng cây một cách có chủ ý ở khoảng cách thụ phấn gần); và/hoặc bằng cách sử dụng hóa chất để kích thích nở hoa hoặc để tăng khả năng thu nhận (của núm nhụy đối với phấn hoa).

Trong thực hành các phương pháp trong sáng chế, bước thụ phấn dựa trên giới tính cây ngô bằng cách tự thụ, tức là, tự nó, có thể được thực hiện hoặc được làm dễ dàng bởi sự can thiệp của con người, ví dụ: thao tác thu gom phấn của cây và cho phấn này tiếp xúc với vòi nhụy hoặc núm nhụy của chính cây đó và sau đó tùy ý ngăn cản sự thụ phấn chéo của cây đã được thụ phấn; bằng thao tác của con người và/hoặc các tác động ngắt bỏ (ví dụ, bằng cách bẻ cờ của cây ngô), tiêu diệt (bằng cách sử dụng các tác nhân hóa học), hoặc che nhị hoa hoặc bao phấn của cây nhằm ngăn cản sự tự thụ phấn tự nhiên xảy ra và thực hiện thao tác thụ phấn thủ công nhằm để sự thụ phấn diễn ra; con người đưa côn trùng thụ phấn vào vị trí cho "sự thụ phấn trực tiếp" (ví dụ, bằng lưới bảo vệ riêng cây với các côn trùng thụ phấn); bằng sự thao tác của con người lên các phần sinh sản của cây để cho phép tăng cường sự tự thụ phấn; bằng cách thay thế có chọn lọc cây (ví dụ, cố ý gieo các cây khác sau khi thụ phấn gần); và/hoặc bằng cách sử dụng hóa chất kìm hãm sự nở hoa hoặc để thúc đẩy sự tiếp nhận (của núm nhụy cho phấn).

Sáng chế đề xuất cây và phương pháp hữu ích trong sự sản xuất hạt ngô lai.

Cây ngô đã tách các phần hoa đực và cái. Cờ là cấu trúc đực và chồi nách là cấu trúc hoa cái của cây. Giai đoạn nở hoa của cây ngô bao gồm rụng phấn và làm nhẵn.

Phần ngô có thể thụ phấn cùng một cây (tự thụ phấn) hoặc cây khác (thụ phấn chéo). Nếu các cấu trúc đực của cây không bị ngắt bỏ trước khi rụng phấn, thì ở một mức độ nào đó, cây ngô sẽ tự thụ phấn. Để tạo ra hạt lai, các cấu trúc cái của cây ngô thứ nhất cần được thụ phấn chéo với phần hoa từ cây ngô thứ hai. Do đó, để sản xuất hạt lai hiệu quả thì yêu cầu phần hoa của cây không được phép tự thụ phấn cho cây đó. Các phương pháp tăng năng suất sản xuất hạt ngô lai theo trong sáng chế bao gồm cho hạt sinh trưởng trong diện tích hoặc cây bao gồm MON 87427 và một hoặc nhiều cây ngô khác. Các cây chứa sự kiện MON 87427 sau đó được xử lý với glyphosat trước khi hình thành phần hoa, bằng cách đó làm cho các cây chứa sự kiện MON 87427 bất thụ đực và không có khả năng tự thụ phấn. Các cây chứa sự kiện MON 87427 sau đó được thụ phấn bằng phần hoa từ (các) cây ngô khác bằng cách sử dụng phương pháp bất kỳ được mô tả trong sáng chế. (Các) cây ngô khác có hoặc không có khả năng chịu glyphosat. Hạt ngô sau đó được thu hoạch từ các cây chứa sự kiện MON 87427, trong đó hạt được thu hoạch từ các cây MON 87427 được xử lý có năng suất cao hơn hạt ngô lai (tức là, phần trăm của hạt lai được thu hoạch cao hơn hoặc độ thuần của hạt lai cao hơn) hạt ngô được thu hoạch từ các cây ngô chứa sự kiện MON 87427 không được xử lý hoặc từ (các) cây ngô khác trong cùng điều kiện. Hạt ngô được thu hoạch từ các cây chứa sự kiện MON 87427 không xử lý sẽ có phần trăm hạt không lai cao hơn (tức là, hạt dòng nội phối được sản xuất bằng cách tự thụ phấn) và do đó năng suất của hạt ngô lai thấp hơn.

Các cây và các phương pháp theo sáng chế có thể còn được sử dụng cho các mục đích nhân giống ngô với các phương pháp được biết trong kỹ thuật bao gồm sử dụng các phương pháp được mô tả trong US 7,314,970, mà được đưa vào bản mô tả làm tài liệu tham khảo, và US 20090165166, được đưa vào bản mô tả làm tài liệu tham khảo.

Cây, thế hệ con và hạt thu được từ các phương pháp theo sáng chế và được tạo ra bằng cách sử dụng các phương pháp theo sáng chế sẽ khác với các cây ngô khác. Ví dụ, các cây MON 87427, thế hệ con, và hạt theo sáng chế là chuyển gen và tái tổ hợp và như vậy được tạo ra bằng sự can thiệp của con người và chứa lượng có thể phát hiện được của phân tử axit nucleic có ít nhất một trong các trình tự được cung cấp trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1-10.

Các phương pháp theo sáng chế do đó hữu ích cho, trong số các lợi ích đó, phòng trừ cỏ dại trên cánh đồng trong khi cây đang sinh trưởng để sản xuất hạt và/hoặc các bộ phận của cây chứa MON 87427 cho các mục đích nông nghiệp hoặc nghiên cứu, chọn thể hệ con chứa MON 87427 cho các mục đích nhân giống nhân giống cây hoặc nghiên cứu, và tạo ra các cây thể hệ con và hạt chứa MON 87427.

Cây, thể hệ con, hạt, tế bào thực vật, các bộ phận của cây và sản phẩm hàng hóa theo sáng chế có thể được đánh giá về thành phần ADN, biểu hiện gen, và/hoặc biểu hiện protein. Sự đánh giá đó có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các phương pháp tiêu chuẩn như PCR, thẩm tách Northern, thẩm tách Southern, thẩm tách Western, miễn dịch-kết tủa và ELISA hoặc bằng cách sử dụng các phương pháp phát hiện và/hoặc các kit phát hiện được đề xuất trong sáng chế.

Phương pháp phát hiện sự có mặt của các vật liệu đặc trưng cho MON 87427 trong mẫu được đề xuất. Có thể phát hiện sự có mặt của phân tử axit nucleic trong sáng chế bằng cách sử dụng các mẫu dò và đoạn môi trong sáng chế với phương pháp bất kỳ để phát hiện axit nucleic được sử dụng trong lĩnh vực kỹ thuật như phản ứng chuỗi polymeraza (PCR) hoặc lai ADN. Một phương pháp đề xuất cho mẫu ADN tiếp xúc với cặp mẫu dò là có khả năng sản xuất sản phẩm khuếch đại từ sự kiện ADN MON 87427, thực hiện phản ứng khuếch đại và bằng cách đó tạo ra sản phẩm khuếch đại ADN bao gồm ít nhất một trong các trình tự nucleotit được nêu trong SEQ ID NO: 1-10, và sau đó phát hiện sự có mặt hoặc không có mặt của phân tử sản phẩm khuếch đại và tùy ý xác nhận trong trình tự của amplicon trình tự bao gồm ít nhất một trong các trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 1-10. Sự có mặt của sản phẩm khuếch đại đã nêu xác định và/hoặc xác định sự có mặt của ADN đặc trưng cho MON 87427 và do đó kiểm tra và xác định sự có mặt của vật liệu sinh học MON 87427 trong mẫu. Phương pháp khác đề xuất cho mẫu ADN tiếp xúc với mẫu dò ADN, đưa mẫu dò và mẫu ADN vào điều kiện lai nghiêm ngặt, và sau đó phát hiện phép lai giữa mẫu dò và mẫu ADN đích. Phát hiện ra phép lai là xác định được sự có mặt của của ADN đặc trưng cho MON 87427 trong mẫu ADN. Sự khuếch đại axit nucleic, phép lai axit nucleic và giải trình tự ADN có thể thực hiện được bằng phương pháp bất kỳ được biết trong lĩnh vực kỹ thuật. Một kỹ thuật ví dụ hữu ích để thực hiện sáng chế là TAQMAN (PE Applied Biosystems, Foster City, CA).

Trình tự của đoạn chèn ADN khác loại, các trình tự tiếp hợp, hoặc các trình tự kẹp sườn từ sự kiện cây ngô MON 87427 (với các mẫu hạt tiêu biểu được nộp lưu tại ATCC PTA-7899) có thể được xác nhận (và được hiệu chỉnh nếu cần thiết) bằng cách khuếch đại các trình tự đó từ sự kiện có sử dụng các đoạn môi có nguồn gốc từ các trình tự được cung cấp trong sáng chế theo sự trình tự hóa ADN chuẩn của sản phẩm khuếch đại hoặc của ADN được tách dòng.

Kit phát hiện ADN đã được đề xuất. Những thay đổi về kit phát hiện đã nêu cũng có thể được phát triển bằng cách sử dụng các chế phẩm và phương pháp được bộc lộ trong sáng chế và các phương pháp phát hiện ADN đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật. Kit phát hiện ADN là hữu ích để nhận biết ADN của ADN MON 87427 trong mẫu và cũng có thể được áp dụng đối với các phương pháp nhân giống cây ngô chứa ADN MON 87427. Kit có thể chứa các đoạn môi hoặc mẫu dò ADN mà tương tự hoặc bổ sung cho các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1-10, hoặc các đoạn của nó.

Kit và phương pháp phát hiện theo sáng chế do đó hữu ích cho việc nhận biết MON 87427, chọn các giống cây hoặc các cây lai bao gồm MON 87427, phát hiện sự có mặt của ADN có nguồn gốc từ MON 87427 chuyển gen trong mẫu, và kiểm tra sự có mặt và/hoặc sự vắng mặt của MON 87427 hoặc các phần cây có nguồn gốc từ MON 87427, trong số các lợi ích khác.

Sáng chế đề xuất thang đo sự phát triển tương đối hữu ích cho việc kiểm tra và/hoặc xác định sự phát triển sinh sản ở cây ngô. Thang đo sự phát triển tương đối mới này phân tích những khác biệt trong sự trưởng thành phát triển và sinh sản qua các giống ngô khác nhau và dòng nội phối bằng cách cung cấp thang thời gian thể hiện các giai đoạn phát triển còi của cây ngô trong mối quan hệ với sự nở hoa. Thang đo sự phát triển tương đối làm giảm sự khác biệt được quan sát thấy trong sự phát triển còi và sự sinh trưởng của còi qua các kiểu gen. Sự phát triển còi của cây ngô trong các giai đoạn khác nhau của sự trưởng thành được minh họa trong Fig.3.

Sự phát triển của cây ngô thường được xác định bằng thang đo các giai đoạn phát triển dựa trên các điều kiện sinh dưỡng, thường được biết là các giai đoạn V. Các giai đoạn này được xác định theo lá trên cùng mà tại đó nhìn được các vành lá. VE tương ứng với giai đoạn mọc, V1 tương ứng với lá thứ nhất, V2 tương ứng với lá thứ hai, V3 tương ứng với lá thứ ba, V(n) tương ứng với lá thứ n. VT xảy ra khi nhánh cuối cùng

của cò xuất hiện, nhưng trước khi tơ xuất hiện. Trên cánh đồng ngô, mỗi giai đoạn V cụ thể được xác định chỉ khi có từ 50% trở lên số cây ngô trên cánh đồng đang ở hoặc ở sau giai đoạn đó. Tuy nhiên, việc sử dụng thang đo sinh dưỡng để xác định độ trưởng thành sinh sản có thể phức tạp do thực tế là sự phát triển sinh dưỡng lại không liên quan mật thiết đến sự thuần thực giới tính qua tất cả các kiểu gen. Ngoài ra, không phải tất cả các dòng nội phối sẽ phân biệt được với cùng số lá, những người kiểm tra cánh đồng không phải lúc nào cũng có đánh giá thích hợp, và những chiếc lá đầu tiên để phân biệt có thể trở nên già khá sớm trong mùa nên nếu không được đánh dấu lá thích hợp trong các giai đoạn sớm thì sẽ khó nhận biết chính xác được các giai đoạn về sau.

Công cụ phổ biến khác để dự đoán và ước tính các giai đoạn sinh trưởng và phát triển của cây ngô là đơn vị đo mức độ sinh trưởng (GDU). Yếu tố trong sự sinh trưởng và phát triển của ngô là nhiệt. Nhiệt thường được đo ở một thời điểm và được biểu diễn bằng nhiệt độ, nhưng nó có thể còn được đo theo khoảng thời gian và được biểu diễn là các đơn vị nhiệt. Các đơn vị nhiệt này thường được gọi là GDU. GDU có thể được xác định là sự chênh lệch giữa nhiệt độ hàng ngày trung bình và nhiệt độ chuẩn được chọn đưa vào các giới hạn nhất định. GDU được tính theo phương trình sau:

$$\text{Đơn vị mức độ sinh trưởng} = \{ (H + L) / 2 \} - B$$

trong đó H là nhiệt độ cao hàng ngày (nhưng không quá 30°C), L là nhiệt độ thấp hàng ngày (nhưng không dưới 10°C), và B là chuẩn 10°C. Do sự sinh trưởng của ngô là nhỏ khi nhiệt độ cao hơn 30°C hoặc thấp hơn 10°C, các giới hạn được thiết lập bên trên các nhiệt độ cao và thấp hàng ngày được sử dụng trong công thức. Việc loại bỏ giá trị thấp hơn hàng ngày cũng ngăn việc tính ra giá trị âm. Do đó, nếu nhiệt độ cao hàng ngày vượt quá 30°C, nhiệt độ cao hàng ngày được sử dụng trong công thức GDU sẽ được thiết lập ở 30°C. Ngược lại, nếu nhiệt độ thấp hàng ngày tụt xuống dưới 10°C, nhiệt độ thấp hàng ngày được sử dụng trong công thức GDU sẽ được thiết lập ở 10°C. Nếu nhiệt độ cao hàng ngày không vượt quá 10°C, thì không có GDU được ghi cho ngày đó. GDU tối đa mà cây có thể tích lũy trong ngày là 36, tối thiểu là không. Tốc độ trưởng thành của cây ngô được nhận biết bằng tổng các giá trị GDU hàng ngày sau khoảng thời gian lý thuyết. Khoảng thời gian mà các nhà sản xuất hạt ngô sử dụng là từ điểm gieo hạt đến khi thuần thực về mặt sinh lý hoặc điểm mà tại đó hạt gần như

được điền đầy. Phần lớn tại Hoa Kỳ, GDU được ghi và được lưu giữ cho hầu hết các khu vực địa lý và có sẵn từ USDA Crop Reporting Service hoặc State Extension Services. Ngoài ra, dụng cụ nhằm thu thông tin GDU tại vị trí cụ thể cũng được mô tả trong US 6,967,656, được đưa vào bản mô tả làm tài liệu tham khảo. Như với các giai đoạn V, các phép đo GDU có thể thay đổi đáng kể so với giai đoạn phát triển cờ qua các kiểu gen và không phải là dự đoán tin cậy về sự phát triển cờ.

Theo sáng chế, "thang đo sự phát triển tương đối" được định nghĩa là thang đo được tạo ra bằng cách chia GDU tại giai đoạn phát triển cờ theo GDU mà cho là cần thiết để đạt đến giai đoạn rụng phần cụ thể. Sau đó, từ thông tin này, xây dựng đường hồi quy cho mỗi kiểu gen hoặc giống nội phối. Thang đo phát triển tương đối có thể được xây dựng bằng cách sử dụng các phương pháp được mô tả và trên cơ sở mối quan hệ giữa các yêu cầu GDU cần thiết để đạt tới giai đoạn phát triển hoa ngô nhất định liên quan đến giai đoạn phát triển cờ đã cho. Như vậy, thang đo sự phát triển tương đối là hữu ích cho việc dự đoán sự phát triển cờ ở ngô qua các kiểu gen khác nhau và các giống nội phối và có thể được sử dụng làm phương án thay thế cho sử dụng các giai đoạn V hoặc DGU trong các phương pháp nhân giống và nông nghiệp.

Theo sáng chế, "giai đoạn phát triển hoa" được xác định theo mức độ mà quần thể cây đang rụng phần, được gọi là giai đoạn P. Giai đoạn phát triển hoa được biểu diễn là Px, trong đó P có nghĩa là "phần hoa" và "x" chỉ ra phần trăm của số cây trong quần thể đang rụng phần. Thang đo sự phát triển tương đối trong sáng chế được dựa trên sự hồi quy bằng cách lấy GDU ở giai đoạn phát triển cờ đã cho chia cho số GDU cần thiết để đạt đến giai đoạn rụng phần. Điều này được biểu diễn như sau:

$$\text{Thang đo sự phát triển tương đối} = (\text{GDU trên Tn} / \text{GDU trên Px})$$

trong đó "GDU đến Tn" là lượng của GDU (đơn vị độ sinh trưởng) cần thiết để đạt đến giai đoạn phát triển cờ nhất định trong đó n có thể nằm trong khoảng từ 0 đến 7, và trong đó "GDU đến Px" là lượng của GDU cần để đạt đến giai đoạn phát triển hoa hoặc giai đoạn P trong đó x có thể nằm trong khoảng từ 0 đến 100 (ví dụ về điều này là P50 được định nghĩa là 50% số cây trên cánh đồng đã bắt đầu rụng phần).

Sự hồi quy có thể trên cơ sở mối quan hệ tương quan giữa bất kỳ giai đoạn phát triển cờ và giai đoạn phát triển hoa hoặc các yêu cầu GDU giai đoạn P. Mối quan hệ tương quan đã nêu được biểu diễn bằng cách lấy GDU cần thiết để đạt đến giai đoạn

phát triển còi cụ thể chia cho GDU cần thiết để đạt đến giai đoạn phát triển hoa cụ thể hoặc giai đoạn P. Trong một phương án trong sáng chế, giai đoạn phát triển hoa hoặc giai đoạn P cho sự hồi quy là P50, trong đó 50% quần thể cây ngô là đang rụng phấn. Trong phương án khác, giai đoạn phát triển của hoa hoặc giai đoạn P của sự rụng phấn để tính toán sự hồi quy có thể nằm trong khoảng từ 1% đến 100%, bao gồm khoảng 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, và 99%. Giai đoạn phát triển còi cho sự hồi quy có thể nằm trong khoảng từ T0 đến T7, như T0, T1, T2, T3, T4, T5, T6 và T7. Bất kể giai đoạn phát triển còi và giai đoạn phát triển hoa được chọn để tạo ra sự hồi quy, thang đo sự phát triển tương đối có thể được xây dựng bằng cách vẽ các mối quan hệ của GDU cần thiết để đạt đến một giai đoạn rụng phấn cụ thể so với lượng GDU cần thiết để đạt đến giai đoạn phát triển còi đã cho. Khía cạnh này được minh họa trong Fig.5.

Theo sáng chế, thuật ngữ "xác định" chỉ hoạt động đo lường, ước định, đánh giá, ước tính, kiểm tra và/hoặc dự đoán. Ví dụ, "xác định sự phát triển còi" theo sáng chế bao gồm đo giai đoạn phát triển còi hiện tại, kiểm tra sự tiến triển của sự phát triển còi, và/hoặc dự đoán sự xảy ra giai đoạn phát triển còi trong tương lai.

Do đó, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra thang đo sự phát triển tương đối bao gồm đo các đơn vị độ sinh trưởng được yêu cầu cho quần thể cây ngô đến khi trưởng thành đến giai đoạn phát triển còi cụ thể; đo các đơn vị độ sinh trưởng được yêu cầu cho quần thể cây ngô đã nêu đến khi trưởng thành đến giai đoạn phát triển hoa cụ thể; và tạo ra đường hồi quy bằng cách lấy đơn vị độ sinh trưởng được đo đã nêu được yêu cầu cho quần thể cây ngô đã nêu đến khi trưởng thành đến giai đoạn phát triển còi cụ thể đã nêu bằng các đơn vị độ sinh trưởng được đo đã nêu được yêu cầu cho quần thể cây ngô đã nêu đến khi trưởng thành đến giai đoạn phát triển hoa cụ thể đã nêu. Bước đo có thể được lặp lại cho ít nhất hai quần thể cây ngô. Bước đo có thể được lặp lại cho nhiều giai đoạn phát triển còi của cây ngô và/hoặc nhiều giai đoạn phát triển của hoa. Giai đoạn phát triển của hoa cụ thể có thể là rụng phấn trong khoảng 50% quần thể cây ngô.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp xác định khoảng tối ưu trong thang đo đối với sự phát triển tương đối cho chế độ xử lý được liên kết với sự phát triển cò, do đó cho phép người xác định thời gian dự tính tối ưu của chế độ xử lý trong đó giai đoạn phát triển là nhân tố quan trọng. Ví dụ về điều này là áp dụng chương trình xử lý bằng một loại hóa chất phổ biến để có hiệu quả gây ra sự bất dục cò của cây ngô tối đa thông qua các kiểu di truyền bố mẹ ngược trong sự sản xuất hạt ngô lai, không quan tâm đến kiểu gen hay nhóm trường thành.

Theo sáng chế, thuật ngữ "hạt lai" là hạt được tạo ra bởi hai cây thụ phấn chéo. Các cây được sinh trưởng từ hạt lai có thể có các đặc tính nông học được cải thiện, như năng suất cao hơn, độ đồng đều lớn hơn, và/hoặc có sức đề kháng với bệnh. Hạt lai không được lai thực sự, có nghĩa là, hạt được tạo ra bằng cách tự thụ phấn với cây lai (cây được sinh trưởng từ hạt lai) không cho kết quả đáng tin cậy là thu được thế hệ cây lai tiếp theo là giống hệt nhau. Do đó, hạt lai mới phải được tạo ra từ các dòng cây bố mẹ cho mỗi lần gieo. Do hầu hết các cây trồng có cả các bộ phận đực và cái, hạt lai có thể chỉ được tạo ra bằng cách ngăn cản sự tự thụ phấn của bố mẹ cái và cho phép hoặc tạo điều kiện thụ phấn với hoa mong muốn. Có nhiều phương pháp để ngăn cản sự tự thụ phấn của bố mẹ cái, một phương pháp tự thụ phấn được ngăn cản là cơ chế loại bỏ phần hoa tạo ra bộ phận trước khi rụng phấn. Việc sản xuất hạt ngô lai thương mại (ngô, *Zea mays*) thường bao gồm bước gieo các dòng bố mẹ đực và cái mong muốn, thường trong các hàng hoặc khối riêng biệt trên cánh đồng được tách biệt, xử lý cây bố mẹ cái để ngăn cản phấn rụng, đảm bảo rằng cây cái chỉ được thụ phấn bởi bố mẹ đực được thiết kế, và thu hoạch hạt lai từ chỉ bố mẹ cái. Hạt lai có thể là kết quả của phép lai đơn (ví dụ, lai thể hệ thứ nhất giữa hai dòng dòng nội phối), lai đơn biến đổi (ví dụ, lai thể hệ thứ nhất giữa hai dòng nội phối, dòng này hoặc dòng khác có thể được biến đổi nhẹ bằng cách sử dụng phép lai họ hàng gần), lai đôi (ví dụ, lai thể hệ thứ nhất giữa hai cây lai đơn), lai ba (ví dụ, lai thể hệ thứ nhất giữa lai đơn và dòng dòng nội phối), lai cao sản (ví dụ, lai thể hệ thứ nhất giữa dòng nội phối và giống được thụ phấn mở, hoặc lai thể hệ thứ nhất giữa lai đơn và giống được thụ phấn mở), hoặc giống được thụ phấn mở (ví dụ, quần thể cây được chọn từ tiêu chuẩn mà có thể cho thấy sự biến đổi nhưng có các đặc tính mà giống có thể được phân biệt với các giống khác).

Trong sự tạo ra hạt lai, sự tạo ra phần hoa và/hoặc rụng phần có thể được ngăn cản ở cây bố mẹ cái nhằm để sự thụ phấn của bố mẹ cái với chỉ bố mẹ đực được thiết kế diễn ra thuận lợi và nhờ đó tạo ra hạt lai. Sự ngăn cản đã nêu có thể đạt được bằng phương pháp bất kỳ hoặc công cụ được người hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này biết, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, bẻ cờ thủ công, bẻ cờ cơ học, sử dụng công cụ di truyền soát sự thụ phấn, và/hoặc sử dụng hóa chất. Phương pháp bất kỳ đã nêu có thể được kết hợp hoặc được sử dụng riêng biệt. Sự bẻ cờ có thể được thực hiện thủ công và thường được thực hiện bằng thao tác ngắt bỏ cờ ra khỏi cây ngô, thường bằng cách bẻ gấp cờ xuống. Sự bẻ cờ cơ học hay bằng máy thường sử dụng máy bẻ cờ được gọi là "máy cắt" mà di chuyển qua các hàng ngô và cắt bỏ phần trên cùng của cây. Máy "kéo" sau đó di chuyển qua các hàng ngô vài ngày sau đó và kéo cờ ra khỏi cây bằng cách chụp cờ giữa hai trục cán di chuyển ở tốc độ cao. Dụng cụ bẻ cờ cơ học hữu ích trong thực hành các phương pháp trong sáng chế bao gồm các dụng cụ được lắp đặt trên các máy cù ly cao. Máy cắt có thể là dao quay hoặc lưỡi dao mà vận hành ở các mặt phẳng khác nhau từ ngang đến dọc, có thể điều chỉnh chiều cao thích hợp, để cắt hoặc xé phần trên cùng của cây ngô bao gồm cờ. Máy kéo có thể có hai bánh hoặc trục cán, có thể điều chỉnh chiều cao thích hợp, quay theo các chiều ngược nhau và kẹp cờ và các lá phía trên, kéo chúng lên theo cách khác với thao tác bẻ cờ thủ công. Các máy kéo và máy cắt có thể được sử dụng riêng biệt hoặc cùng nhau và/hoặc kết hợp với các phương pháp bẻ cờ khác. Cửa sổ thời gian để bẻ cờ thường gần như tối ưu và khó quản lý khoảng thời gian trong sự sản xuất hạt ngô lai. Trong lĩnh vực kỹ thuật, các hóa chất và/hoặc phương pháp di truyền cũng được sử dụng để ngăn cản sự tạo thành phần hoa hoặc sự rụng phần đáng kể có thể diễn ra.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp xác định thời gian dự tính phát triển cờ của cây ngô bằng cách chọn khoảng trên thang đo sự phát triển tương đối, trong đó khoảng chỉ ra sự trưởng thành đến giai đoạn phát triển cờ mong muốn. Giai đoạn phát triển cờ mong muốn là từ giai đoạn T0 đến T7, ví dụ, giai đoạn T5. Các giai đoạn phát triển cờ quan tâm đặc biệt là giai đoạn phát triển cờ tối ưu cho phép lai sinh sản, giai đoạn phát triển cờ tối ưu cho sự bắt dục cờ hoặc sự bẻ cờ, và/hoặc giai đoạn tối ưu cho sự cung cấp xử lý điều hòa phát triển cho cây ngô. Trong xây dựng và sử dụng thang đo sự phát triển tương đối, giai đoạn phát triển hoa cụ thể được sử dụng để xây dựng thang đo sự phát triển tương đối có thể ở vào lúc khoảng 50 phần trăm quần thể ngô rụng

phần. Khoảng ví dụ trên thang đo sự phát triển tương đối hữu ích với phương pháp trong sáng chế là nằm trong khoảng từ 0,62 đến 0,75 trên thang đo sự phát triển tương đối.

Các xác định thời gian dự tính của sự phát triển cò có thể hữu ích cho các phương pháp nông nghiệp bao gồm các lập kế hoạch và/hoặc tiêu chuẩn hóa mà đặc trưng cho sự phát triển cây. Các ví dụ bao gồm: phương pháp yêu cầu sử dụng hóa chất đúng lúc, chẳng hạn như sử dụng thuốc diệt cỏ, thuốc diệt nấm, phân bón, và/hoặc chất điều hòa sinh trưởng qua các dòng nội phối với sự trưởng thành tương phản; phương pháp yêu cầu kiểm tra, dự đoán, và/hoặc điều chỉnh sự phát triển cò, như kiểm tra các dòng nội phối dự cho sự phát triển cò sớm, mà có thể dẫn đến sự rụng phần giảm, và cung cấp sự xử lý thích hợp nhằm để tác động đến sự phát triển cò; phương pháp yêu cầu sử dụng hormon và/hoặc chất điều hòa sinh trưởng đúng lúc để sửa chữa sự mất cân bằng và/hoặc tạo ra kết quả nông nghiệp mong muốn; và/hoặc phương pháp bất kỳ yêu cầu cấp sự xử lý điều hòa phát triển cho cây ngô ở giai đoạn phát triển cò mong muốn. Sáng chế có thể được sử dụng trong lĩnh vực lập kế hoạch và/hoặc công việc nghiên cứu, như để dự đoán các yêu cầu công việc liên quan đến sự bẻ cò hoặc sự phát triển của cây; để đoán trước các yêu cầu liên quan đến sự phát triển cò; để xác định tác động của ứng suất lên sự phát triển cò; và/hoặc để sử dụng trong sàng lọc và đánh giá những đặc điểm và/hoặc các dòng nội phối hoặc các cây lai bằng cách áp đặt ứng suất ở (các) giai đoạn phát triển cụ thể được xác định bằng cách dự đoán sự phát triển cò.

Sáng chế đề xuất phương pháp hữu ích cho việc xác định khi sự xử lý điều hòa phát triển có hiệu quả tối ưu sử dụng thang đo sự phát triển tương đối. Theo sáng chế, thuật ngữ "xử lý điều hòa phát triển" chỉ việc cung cấp ít nhất một phương pháp xử lý vật lý và/hoặc hóa chất mà tác động lên sự phát triển của cây. Sự phát triển của cây bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, sự phát triển của hoa, sự phát triển của rễ, sự phát triển của lá, sự phát triển của thân, sự phát triển cò, sự phát triển sinh sản, sự phát triển giao tử, sự phát triển phấn hoa, sự phát triển hạt, và/hoặc sự phát triển của bộ phận bất kỳ. Việc xử lý điều hòa phát triển có thể làm cho sự phát triển kết thúc, chậm phát triển, bị ngăn cản, bị cản trở, hoặc được tăng cường. Xử lý điều hòa phát triển có thể là xử lý vật lý, như bẻ cò, đốt (sử dụng lửa đốt một hoặc nhiều phần đỉnh của cây

đục như một cách cản trở sự trưởng thành), và/hoặc cọ, xát, chuốt, rạch, cắt, đục, siêu âm, tuốt, làm vỡ, ngắt bỏ, nghiền, tĩa, và/hoặc che bất kỳ bộ phận của cây. Xử lý điều hòa phát triển có thể là hóa chất như các hợp chất tự nhiên hoặc các hợp chất tổng hợp. Các hóa chất mà có thể hữu ích là sự xử lý điều hòa phát triển bao gồm các chất điều hòa sinh trưởng thực vật, các chất ức chế điều hòa sự phát triển thực vật, các hormon thực vật, các chất ức chế hormon thực vật, các chất kích thích sinh trưởng thực vật, các chất làm chậm sự sinh trưởng cây, thuốc diệt nấm, thuốc diệt côn trùng, chất làm rụng lá, chất ức chế etylen, các chất giải phóng etylen, chất điều hòa sinh trưởng, morphactin và chất diệt giao tử. Sự xử lý vật lý, ví dụ, được sử dụng trong các phương pháp theo sáng chế là bẻ cờ và/hoặc đốt. Hóa chất ví dụ để sử dụng trong các phương pháp trong sáng chế là thuốc diệt cỏ glyphosat. Sự xử lý điều hòa phát triển có thể được sử dụng cho cây ngô ở giai đoạn bất kỳ, ví dụ, khi giai đoạn phát triển cờ tương ứng với khoảng từ 0,62 đến 0,75 trên thang đo sự phát triển tương đối, mà bao gồm giai đoạn phát triển cờ T5. Khả năng nhận biết khoảng thời gian hiệu quả tối ưu cho việc áp dụng xử lý điều hòa phát triển cờ sử dụng thang đo sự phát triển tương đối được cung cấp là một khía cạnh của sáng chế. Nhiều sự xử lý điều hòa phát triển cờ bao gồm các hóa chất có khả năng ngăn cản sự phát triển của phần hoa và ngăn cản sự rụng phần, được biết trong lĩnh vực kỹ thuật và sẽ hữu ích trong thực hành các phương pháp trong sáng chế.

Sáng chế có thể được sử dụng để tạo ra hạt lai sử dụng các phương pháp trong sáng chế. Sáng chế đề xuất các phương pháp bằng cách cho cây ngô bố mẹ thứ nhất được lai với cây ngô bố mẹ thứ hai, trong đó sự sản xuất phần hoa của cây ngô bố mẹ thứ nhất được ức chế bằng cách áp dụng sự xử lý điều hòa phát triển. Các phương pháp trong sáng chế có thể được sử dụng để xác định giai đoạn phát triển và/hoặc thời gian cần tiến hành xử lý điều hòa phát triển để có hiệu quả tối ưu. Đặc biệt, sáng chế có thể sử dụng các phương pháp được đề xuất trong US 6,762,344 và US 2009/0165166. Theo một phương án, sáng chế là hạt lai được tạo ra bằng cách sử dụng các phương pháp trong sáng chế, bao gồm các cây và các bộ phận của cây được sinh trưởng từ hạt lai và các sản phẩm hàng hóa được tạo ra từ cây này.

Sáng chế đề xuất phương pháp sử dụng cây ngô chuyển gen chứa sự kiện MON 87427 để sản xuất hạt lai, trong đó glyphosat được sử dụng để xử lý điều hòa sự phát

triển cò trong các cây MON 87427 để ngăn cản sự tạo thành phấn hoa. Điều này được căn cứ vào khả năng ngăn cản sự rụng phấn trong các dòng bố mẹ cái bao gồm MON 87427 bằng cách sử dụng đúng lúc glyphosat, do đó ngăn cản sự tự thụ phấn xảy ra. Nếu glyphosat được áp dụng quá sớm so với sự phát triển cò, các khối sinh sản được không thể phát triển đủ cho sự xử lý hiệu quả hoàn toàn. Nếu áp dụng quá trễ liên so với sự phát triển cò, bao phấn phun ra có thể đã đang trên đường đi, và sự xử lý glyphosat có thể không thể ngăn cản sự phát triển phấn hoa. Vì vậy, thời gian dự tính áp dụng glyphosat liên quan đến sự phát triển cò ứng dụng là quan trọng trong việc đảm bảo hiệu quả lớn nhất và do đó tạo ra hạt lai có độ thuần lớn nhất. Trong một phương án, thời gian dự tính tối ưu của áp dụng glyphosat đối với phương pháp này có thể được nhận biết bằng cách xác định thời gian dự tính phát triển cò của cây MON 87427 sử dụng thang đo sự phát triển tương đối và chọn khoảng trên thang đo sự phát triển tương đối mà chỉ ra sự trưởng thành đến giai đoạn phát triển cò mong muốn. Việc xác định thời gian dự tính phát triển cò của cây ngô này sau đó được sử dụng để nhận biết thời gian dự tính cấp glyphosat với vai trò là sự xử lý điều hòa phát triển cho cây MON 87427, bằng cách đó ngăn cản sự tự thụ phấn và nâng cao sự sản xuất hạt lai. Phương pháp trong sáng chế bộc lộ rằng sự phát triển cò trong khoảng từ 0,62 đến 0,75 trên thang đo sự phát triển tương đối, hoặc T5, là phạm vi tối ưu cho việc áp dụng glyphosat cho cây MON 87427 để ngăn cản sự tạo thành phấn. Do đó, trong hệ thống lai giống Roundup®, đối với bất kỳ dòng cái bố mẹ đã cho của nhóm trưởng thành đã cho, thời gian tối ưu sẽ được dự đoán bằng cách nhân GDUs cần thiết để đạt được P50 cho dòng cái bố mẹ đó với bất kỳ giá trị trong khoảng vi đó. Khi kết quả sự tính toán đó bằng với GDU's của mùa sinh trưởng đó, thời gian áp dụng glyphosat tối ưu đã được thấy rõ. Các thang đo sự phát triển tương đối có thể được tạo ra sử dụng các dấu làm chuẩn cho sự rụng phấn, và các dấu làm chuẩn cho thang đo T khác sẽ có lợi ích tương tự mà không vượt ra khỏi phạm vi của sáng chế.

Khía cạnh khác nữa của sáng chế đề xuất phương pháp hữu ích trong việc xác định giai đoạn phát triển cò trong đó phép lai sinh sản là tối ưu. Tương tự với cách mà các sai khác trong sự phát triển qua các kiểu gen loại trừ sự dự đoán đáng tin cậy về các xử lý điều hòa tối ưu trên cơ sở các giai đoạn V hoặc riêng GDU's, thời gian dự tính tự thụ phấn có thể cũng được giúp ích bởi thang đo sự phát triển tương đối. Nghiên cứu đơn giản sử dụng thang đo sự phát triển tương đối có thể bộc lộ sự thụ

phân chéo là tối ưu trong khoảng nhất định trên thang đo đó. Mặt khác, khi biết DGU's được yêu cầu cho P50 của kiểu gen được cho, có thể sẽ xác định được thời điểm mà khoảng được đạt tới mà không dựa vào các dấu làm chuẩn sinh dưỡng không đáng tin cậy, hoặc thực hiện các đánh giá vật lý tiêu thụ thời gian của sự phát triển cò. Có thể sẽ chỉ rõ rằng giai đoạn phát triển này không dựa vào các dấu làm chuẩn dinh dưỡng không đáng tin cậy, hoặc thực hiện các đánh giá thực thể tiêu thụ thời gian của sự phát triển cò. Các mô tả về phương pháp nhân giống mà thường được sử dụng cho các tính trạng và các cây trồng khác nhau có thể được phát hiện ra trong một trong nhiều tài liệu tham khảo (Allard, "Principles of Plant Breeding," John Wiley & Sons, NY, U. of CA, Davis, CA, 50-98, 1960; Simmonds, "Principles of crop improvement," Longman, Inc., NY, 369-399, 1979; Sneep and Hendriksen, "Plant breeding perspectives," Wageningen (ed), Center for Agricultural Publishing and Documentation, 1979; Fehr, In: Soybeans: Improvement, Production and Uses, 2nd Edition, Monograph., 16:249, 1987; Fehr, "Principles of variety development," Theory and Technique, (Vol 1) và Crop Species Soybean (Vol 2), Iowa State Univ., Macmillan Pub. Co., NY, 360-376, 1987).

Trong thực hành các phương pháp trong sáng chế, một hoặc hai cây ngô bố mẹ có thể bao gồm một hoặc nhiều tính trạng mong muốn được quan tâm trong nông học. Ví dụ, cây ngô bố mẹ MON 87427 có thể được sử dụng để sản xuất hạt lai nhằm nhân giống với cây ngô bố mẹ thứ hai, mà bao gồm ít nhất một gen và/hoặc tính trạng quan tâm. Trong phương án này, thang đo sự phát triển tương đối có thể được sử dụng để kiểm tra và/hoặc xác định giai đoạn phát triển sinh sản của cây ngô bố mẹ MON 87427 để chọn thời gian chính xác cho việc xử lý cây ngô bố mẹ MON 87427 với glyphosat trước khi hình thành phần hoa, bằng cách đó ngăn cản sự tự thụ phấn. Cây chứa sự kiện MON 87427 sau đó sẽ được thụ phấn bởi cây ngô bố mẹ thứ hai và hạt ngô lai sẽ được thu hoạch từ các cây chứa sự kiện MON 87427, trong đó hạt được thu hoạch từ các cây MON 87427 được xử lý có năng suất hạt ngô lai cao hơn (tức là, phần trăm hạt lai được thu hoạch cao hơn hoặc độ thuần của hạt lai cao hơn) so với hạt ngô được thu hoạch từ các cây chứa sự kiện MON 87427 không được xử lý hoặc được xử lý vào thời điểm không chính xác hoặc từ (các) cây ngô khác trong các điều kiện tương tự.

Các tính trạng và các gen quan tâm trong nông học cũng được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, ví dụ, tính trạng và gen cho sức đề kháng đối với thuốc diệt cỏ, sự bất dục đực, tăng năng suất, đề kháng với virus, đề kháng với giun tròn, đề kháng với bệnh do vi khuẩn, tăng sự sinh trưởng và phát triển của cây, tăng sản lượng tinh bột, sản lượng (các) dầu biến tính và/hoặc cao, hàm lượng (các) axit béo biến tính, sản lượng protein cao, quả nhanh chín, tăng dinh dưỡng cho động vật và/hoặc con người, các biopolyme, ứng suất môi trường, các peptit được phẩm và các peptit có thể tiết, cải thiện tính trạng chế biến, cải thiện khả năng tiêu hóa, raffinosa thấp, sản lượng enzym công nghiệp, sản lượng hạt lai, sản lượng sợi, và/hoặc sản lượng nhiên liệu sinh học. Ví dụ về cây có một hoặc nhiều tính trạng mong muốn là các cây được đăng ký với Cục kiểm dịch động thực vật-Bộ nông nghiệp Hoa Kỳ (APHIS) về khả năng chịu thuốc diệt cỏ (ví dụ, các sự kiện ngô MON 88017, NK603, DAS-68416-4, HCEM485, DP-098140-6, DP-356043-5, MIR604, 59122, TC-6275, Line 1507, MON 802, T14, và/hoặc T25), phòng trừ sâu bọ (ví dụ, các sự kiện ngô MON 863, MON 809, MON 810, MON 89034, MON 88017, MON 802, MIR-162, TC-6275, DBT418, B16, TC-1507, DAS 59122-7, MIR604, và/hoặc MON 80100), và/hoặc các tính trạng mong muốn khác (ví dụ, các sự kiện ngô LY038, MON 87460, và/hoặc 3272) (mô tả và danh mục đầy đủ các tính trạng đã nêu có ở trang web của chính phủ Hoa Kỳ http://www.aphis.usda.gov/brs/not_reg.html).

Trong thực hành các phương pháp trong sáng chế, dòng nội phối, giống, hoặc cây lai, hoặc kiểu gen khác có thể được sử dụng. Ví dụ, dòng nội phối elite là dòng cây ngô mà được tạo ra bằng cách nhân giống và chọn lọc về tính năng nông học vượt trội. Các kiểu gen có thể được biến nạp và/hoặc được sử dụng trong các phương pháp nhân giống bao gồm gen quan tâm trong nông học như khả năng chịu glyphosat và các sự kiện có thể được chọn để thích hợp làm bố mẹ cái hoặc đực trong hệ thống sản xuất hạt lai.

Các kiểu gen elite ở ngô để sử dụng trong thực hành sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, CI9805 (US 20030093826); LH321 (US 20030106086); HOI002 (US 20030154524); HOI001 (US 20030172416); 5750 (US 20030177541); G0502 (US 20030177543); G1102 (US 20030177544); HX879 (US 20040068771); 6803 (US 20040088767); 5020 (US 20040088768); G3001 (US 20040098768); LH268 (US

20040111770); LH311 (US 20040111771); LH306 (US 20040111772); LH351 (US 20040111773); LHE323 (US 20040111774); 402A (US 20040123352); 366C (US 20040139491); NP2315 (US 20040143866); PH0GC (US 20040194170); SE8505 (US 20050015834); D201 (US 20050028236); BE1146BMR (US 20050076402); PHCAM (US 20050114944); PHCK5 (US 20050114945); PHC77 (US 20050114951); PHCND (US 20050114952); PHCMV (US 20050114953); PHB00 (US 20050114955); PHCER (US 20050114956); PHCJP (US 20050120437); PHADA (US 20050120439); PHB8V (US 20050120443); 6XN442 (US 20050125864); 4XP811 (US 20050125865); PHCCW (US 20050125866); MN7224 (US 20050132433); BE9514 (US 20050132449); PHCA5 (US 20050138697); PHCPR (US 20050144687); PHAR1 (US 20050144688); PHACV (US 20050144689); PHEHG (US 20050144690); NP2391 (US 20050160487); PH8WD (US 20050172367); D501 (US 20050177894); D601 (US 20050177896); D603 (US 20050177904); PHCEG (US 20050223443); W16090 (US 20050273876); M10138 (US 20050273877); N61060 (US 20050273878); NP2460 (US 20060048243); BS112 (US 20060070146); PHDWA (US 20060107393); PH8JV (US 20060107394); PHEWW (US 20060107398); PHEDR (US 20060107399); PHE67 (US 20060107400); PHE72 (US 20060107408); PHF1J (US 20060107410); PHE35 (US 20060107412); PHEHR (US 20060107415); PHDPP (US 20060107416); PHEHC (US 20060107418); PHANF (US 20060107419); PHC78 (US 20060107420); PH8T0 (US 20060107421); PHDRW (US 20060107422); PHEGV (US 20060107423); PHEBA (US 20060107426); PHENE (US 20060112463); PHEJW (US 20060112464); PHAPT (US 20060112465); PHCND (US 20060130188); PHCEG (US 20060130189); PHADA (US 20060130190); PHEED (US 20060143744); PHHB (US 5,633,427); LH262 (US 5,633,428); LH227 (US 5,633,429); LH226 (US 5,639,941); LH235 (US 5,639,942); LH234 (US 5,639,943); PHDP0 (US 5,639,946); PH06N (US 5,675,066); LH177 (US 5,684,227); PH24E (US 5,689,034); PHP38 (US 5,708,189); ASG06 (US 5,714,671); CG00685 (US 5,723,721); PHND1 (US 5,723,722); PH44A (US 5,723,723); ZS01591 (US 5,723,724); ZS01101 (US 5,723,725); ZS01452 (US 5,723,726); ZS01429 (US 5,723,727); ZS01819 (US 5,723,728); ZS01250 (US 5,723,729); ZS01595 (US 5,723,730); CG3ND97 (US 5,728,923); NP938(934) (US 5,728,924); PHNG2 (US 5,731,491); CG5NA58 (US 5,731,502); NP948 (US 5,731,503); LH236 (US

5,731,504); CG00766 (US 5,731,506); PHOAA (US 5,750,829); PH15A (US 5,750,830); PH25A (US 5,750,831); PH44G (US 5,750,832); PH0CD (US 6,084,160); ASG25 (US 6,084,161); 86ISI15 (US 6,084,162); BE4547 (US 6,084,163); PH21T (US 6,091,007); 01DHD16 (US 6,096,952); PH224 (US 6,096,953); ASG26 (US 6,103,958); ASG28 (US 6,103,959); PH0V0 (US 6,107,550); 90LCL6 (US 6,111,171); 22DHD11 (US 6,111,172); ASG17 (US 6,114,606); AR5253bm3 (US 6,114,609); ASG27 (US 6,114,610); WDHQ2 (US 6,114,611); PH3GR (US 6,114,613); PH1NF (US 6,118,051); PH0JG (US 6,118,053); PH189 (US 6,118,054); PH12J (US 6,118,055); PH1EM (US 6,118,056); 90DJD28 (US 6,121,519); PH12C (US 6,121,520); PH55C (US 6,121,522); PH3EV (US 6,121,523); ZS4199 (US 6,121,525); PH2V7 (US 6,124,529); PH4TF (US 6,124,530); PH3KP (US 6,124,531); PH2MW (US 6,124,532); PH2N0 (US 6,124,533); PH1K2 (US 6,124,534); PH226 (US 6,124,535); PH2VJ (US 6,127,609); PH1M8 (US 6,127,610); WQCD10 (US 6,130,369); PH1B8 (US 6,130,370); 17DHD5 (US 6,133,512); PH0WD (US 6,133,513); PH3GK (US 6,133,514); PH2VK (US 6,137,036); PH1MD (US 6,137,037); SM4603 (US 6,137,038); PH04G (US 6,140,562); NP2151 (US 6,140,563); PH5DR (US 6,727,413); LH254 (US 6,730,833); PH5WB (US 6,730,834); PH7CH (US 6,730,835); PH54M (US 6,730,836); PH726 (US 6,730,837); PH48V (US 6,734,348); PH3PV (US 6,737,566); PH77V (US 6,740,795); PH7JB (US 6,740,796); NP2316 (US 6,740,797); PH70R (US 6,740,798); RAA1 (US 6,747,194); VMM1 (US 6,747,195); PH3RC (US 6,747,196); MNI1 (US 6,753,465); 5750 (US 6,756,527); PH6KW (US 6,756,528); PH951 (US 6,756,530); PH6ME (US 6,759,578); NP2171 (US 6,759,579); PH87H (US 6,759,580); PH26N (US 6,765,132); RII1 (US 6,765,133); PH9AH (US 6,770,802); PH51H (US 6,774,289); PH94T (US 6,774,290); PH7AB (US 6,777,599); PH5FW (US 6,781,042); PH75K (US 6,781,043); KW7606 (US 6,784,348); PH8CW (US 6,784,349); PH8PG (US 6,784,350); RBO1 (US 6,797,869); 9SM990 (US 6,803,509); PH5TG (US 6,806,408); I501150 (US 6,806,409); I390186 (US 6,806,410); PH6JM (US 6,809,240); KW4636 (US 6,809,243); I363128 (US 6,809,244); LH246 (US 6,812,386); 2JK221 (US 6,812,387); PHN46 (US 5,567,861); ZS0223 (US 5,569,813); phajo (US 5,569,816); PHJJ3 (US 5,569,817); phap8 (US 5,569,818); PHPP8 (US 5,569,819); ZS1284 (US 5,569,820); PHT11 (US 5,569,821); phte4 (US 5,569,822); ZS0114 (US 5,569,826);

7054 (US 5,576,473); ZS0560 (US 5,585,533); ZS0853 (US 5,585,534); ZS1791 (US 5,585,539); ZS1513 (US 5,585,541); ZS1679 (US 5,589,606); ZS1022 (US 5,602,314); ZS1202 (US 5,602,315); ZS1783 (US 5,602,316); PHDG1 (US 5,602,318); PHKV1 (US 5,608,138); PHO5F (US 5,608,139); PH38B (US 5,608,140); PH42B (US 5,618,987); PHDD6 (US 5,625,129); ZS0541 (US 5,625,131); PH08B (US 5,625,132); PHOC7 (US 5,625,133); LH233 (US 5,625,135); ASG05 (US 5,723,731); LH281 (US 5,723,739); PHBF0 (US 5,728,919); CG5NA01 (US 5,728,922); AR5651bm3 (US 5,977,458); LH266 (US 5,977,459); LH303 (US 5,977,460); LH301 (US 5,981,855); 4SQ601 (US 5,986,182); PH1TB (US 5,986,184); PH24D (US 5,986,185); LH229 (US 5,986,186); LH277 (US 5,986,187); PH1CN (US 5,990,393); LH261 (US 5,990,394); W1498A (US 5,990,395); WQDS2 (US 5,994,631); NL085B (US 5,998,710); PH09E (US 5,998,711); LH284 (US 6,015,944); PH1B5 (US 6,020,543); PH1CA (US 6,025,547); 7OLDL5 (US 6,031,160); GM9215 (US 6,031,161); 90LDI1 (US 6,031,162); 90LDC2 (US 6,034,304); 90QDD1 (US 6,034,305); R398D (US 6,034,306); RDBQ2 (US 6,037,531); HX621 (US 6,040,506); HX622 (US 6,040,507); 01HG12 (US 6,040,508); HX740 (US 6,043,416); 79314N1 (US 6,043,417); 17INI20 (US 6,043,418); 17DHD7 (US 6,046,387); 83INI8 (US 6,046,388); 83InI14 (US 6,046,389); 01INL1 (US 6,046,390); LH286 (US 6,049,030); ASG29 (US 6,054,640); ASG07 (US 6,060,649); QH111 (US 6,069,303); 09DSQ1 (US 6,072,108); JCRNR113 (US 6,072,109); NP2029 (US 6,072,110); ASG09 (US 6,077,996); PHOWE (US 6,077,997); 86AQV2 (US 6,077,999); PH1GG (US 6,080,919); RPK7346 (US 6,506,965); NP2044BT (US 6,573,438); PH8W4 (US 6,600,095); M42618 (US 6,617,500); MV7100 (US 6,624,345); 3JP286 (US 6,627,800); BE4207 (US 6,632,986); CI9805 (US 6,632,987); JCR503 (US 6,635,808); NR401 (US 6,635,809); 4VP500 (US 6,635,810); 7SH385 (US 6,642,440); KW4773 (US 6,642,441); NP2073 (US 6,646,187); PSA104 (US 6,646,188); 5XH755 (US 6,653,536); 1445-008-1 (US 6,653,537); NP2015 (US 6,657,109); 7SH383 (US 6,660,916); LH310 (US 6,664,451); I880S (US 6,670,531); RR728-18 (US 6,677,509); LH320 (US 6,683,234); 11084BM (US 6,686,519); W60028 (US 6,686,520); PH1GD (US 6,693,231); LH295 (US 6,693,232); PH1BC (US 6,700,041); PH4V6 (US 6,706,954); NP2276 (US 6,706,955); NP2222 (US 6,710,233); Ph0R8 (US 6,717,036); PH581 (US 6,717,037); PH6WR (US 6,717,038);

PH5HK (US 6,717,039); PH5W4 (US 6,717,040); PH0KT (US 6,720,486); PH4GP (US 6,720,487); PHJ8R (US 6,723,900); NP2052 (US 6,723,901); PH7CP (US 6,723,902); PH6WG (US 6,723,903); PH54H (US 6,727,412); 4P33339 (US 5,489,744); PHKM5 (US 5,491,286); LH225 (US 5,491,293); LH185 (US 5,491,294); LH176 (US 5,491,296); PHW06 (US 5,495,065); LH252 (US 5,495,067); LH231 (US 5,495,068); PHTE4 (US 5,495,069); PHP38 (US 5,506,367); PHN82 (US 5,506,368); PHTD5 (US 5,527,986); 899 (US 5,530,181); PHAP1 (US 5,530,184); PHKW3 (US 5,534,661); CG00653 (US 5,536,900); PHRD6 (US 5,541,352); PHK46 (US 5,543,575); PHBG4 (US 5,545,809); LH189 (US 5,545,811); PHNJ2 (US 5,545,812); PHRF5 (US 5,545,813); PHFR8 (US 5,545,814); PHN18 (US 5,557,034); PHTP9 (US 5,557,038); PH54B (US 5,563,320); PHGF5 (US 5,563,321); PHAG6 (US 5,563,322); PHAP9 (US 5,563,323); PHBE2 (US 5,563,325); ZS0510 (US 5,563,327); PHAAO (US 5,602,317); LH273 (US 5,880,348); 7571 (US 5,880,349); LH237 (US 5,880,350); PH0B4 (US 5,889,188); FEBS (US 5,902,922); 8F286 (US 5,905,191); 3AZA1 (US 5,910,625); 91DFA-5 (US 5,910,635); ASG20 (US 5,910,636); ZS03940 (US 5,912,420); 91ISI6 (US 5,912,421); MF1113B (US 5,914,452); PH03D (US 5,917,125); PHDN7 (US 5,917,134); 01DIB2 (US 5,920,003); 82DHB1 (US 5,922,935); 8M222 (US 5,922,936); PHMJ2 (US 5,929,313); SBB1 (US 5,932,787); 86ISI3 (US 5,932,788); ZS01231 (US 5,936,144); 87DIA4 (US 5,936,145); 79310J2 (US 5,936,146); PH1GC (US 5,936,148); 01DHD10 (US 5,939,606); PH2CB (US 5,939,607); PH080 (US 5,939,608); PH14T (US 5,942,670); PH185 (US 5,942,671); PH19V (US 5,948,957); ZS09247 (US 5,952,551); CRAUGSH2W-89 (US 5,952,552); 91DHA1 (US 5,962,770); LH300 (US 5,965,798); 91ISI4 (US 5,965,799); 79103A1 (US 5,969,212); ASG22 (US 5,969,220); 82IUH1 (US 5,969,221); (US 5,969,222); LH302 (US 5,973,238); LH265 (US 5,973,239); PHFW4 (US 5,977,451); 01IBH10 (US 5,977,452); 91CSI-1 (US 5,977,453); WKBC5 (US 5,977,455); PH1M7 (US 5,977,456); R327H (US 6,399,860); FR2108 (US 6,407,320); FR3383 (US 6,410,830); IT302 (US 6,414,227); FR3303 (US 6,414,228); 9034 (US 6,420,634); G1500 (US 6,420,635); FR3311 (US 6,420,636); I389972 (US 6,420,637); PH77C (US 6,423,888); IT201 (US 6,426,451); G3000 (US 6,426,453); 94INK1B (US 6,429,363); PH3HH (US 6,433,259); 6TR512 (US 6,433,260); 89AHD12 (US 6,433,261); I889291 (US 6,433,262); 2070BT (US 6,437,223); 3323 (US 6,437,224); G1900 (US

6,441,279); 16IUL6 (US 6,441,280); 7RN401 (US 6,444,881); UBB3 (US 6,444,882); 6077 (US 6,444,883); I014738 (US 6,444,884); TDC1 (US 6,452,074); GF6151 (US 6,452,075); 7180 (US 6,452,076); WQDS7 (US 6,455,764); X532Y (US 6,459,021); I465837 (US 6,459,022); 1784S (US 6,469,232); LH176Bt810 (US 6,469,233); 6RC172 (US 6,469,234); 3327 (US 6,469,235); 7SH382 (US 6,476,298); I181664 (US 6,476,299); NP2010 (US 6,483,014); FR3361 (US 6,483,015); 1778S (US 6,486,386); I362697 (US 6,492,581); RPK7250 (US 6,506,964) và 6RT321 (US 6,911,588).

Theo sáng chế, thuật ngữ "bao gồm" có nghĩa là "bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở".

Phần ví dụ thực hiện sáng chế sau đây được đưa ra minh họa các ví dụ về các phương án thực hiện được ưu tiên cụ thể của sáng chế. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ hiểu rằng các kỹ thuật được bộc lộ trong các ví dụ, theo cách tiếp cận bởi các tác giả, có thể xác định được rõ chức năng trong thực hiện sáng chế, và do đó có thể được xem là các ví dụ cấu thành của các mô thức được ưu tiên cho thực hiện sáng chế. Tuy nhiên, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này theo góc độ của bộc lộ này sẽ thấy được rằng những sửa đổi có thể được tạo ra thông qua các phương án cụ thể đã được bộc lộ mà vẫn thu được kết quả giống hoặc tương tự mà không vượt quá phạm vi và ý tưởng của sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Biến nạp cây ngô và chọn sự kiện MON 87427

Cây ngô MON 87427 đã được tạo ra bằng cách biến nạp cây ngô qua trung gian *Agrobacterium*. Các tế bào cây ngô được biến nạp và được tái sinh thành các cây ngô nguyên vẹn và các cây ngô riêng lẻ được chọn từ quần thể cây mà cho thấy có tính toàn vẹn của cấu trúc biểu hiện gen chuyển và có khả năng đề kháng với glyphosat. Từ quần thể này, cây ngô chuyển gen chứa sự kiện MON 87427 đã được chọn và được xác định đặc tính.

Cây ngô chuyển gen chịu glyphosat MON 87427 đã được phát triển thông qua việc biến nạp phôi ngô chưa trưởng thành qua trung gian *Agrobacterium* sử dụng vectơ biến nạp pMON58401. Đoạn chèn gen chuyển và cấu trúc biểu hiện của MON 87427 bao gồm trình tự khởi đầu và trình tự dẫn từ virus gây bệnh khảm trên cây cải

bông (CaMV) 35S chứa vùng tăng cường kép (P-e35S); được liên kết hoạt động với đoạn ADN dẫn có nguồn gốc từ intron đầu tiên của gen 70 của protein sốc nhiệt ở ngô (I-HSP70); được liên kết hoạt động với phân tử ADN mã hóa peptit vận chuyển lục lạp ở đầu tận cùng N từ gen *shkG* từ *Arabidopsis thaliana* EPSPS (Ts-CTP2); được liên kết hoạt động với phân tử ADN có nguồn gốc từ gen *aroA* từ chủng *Agrobacterium* sp. CP4 và mã hóa protein CP4 EPSPS; được liên kết hoạt động với phân tử ADN 3' UTR có nguồn gốc từ gen nopal synthase (T-NOS) từ *Agrobacterium tumefaciens*.

Các tế bào cây ngô có thể được biến nạp bằng nhiều phương pháp. Ví dụ, phương pháp sau có thể được sử dụng để tạo ra cây ngô chuyển gen bao gồm cấu trúc biểu hiện thực vật trong sáng chế. Giống nuôi cấy lỏng của *Agrobacterium tumefaciens* chứa cấu trúc biểu hiện thực vật được khởi đầu từ giống gốc trong glycerol hoặc từ đĩa được cấy vạch mới và được nuôi qua đêm ở 26°C-28°C trong điều kiện lắc (gần 150 vòng trên phút) đến giữa pha sinh trưởng lũy tiến (midlog) trong môi trường LB lỏng, pH = 7,0, chứa 50 mg/l (miligam trên lít) kanamycin, và 50 mg/l streptomycin hoặc 50 mg/l spectinomycin, và 25 mg/l chloramphenicol với 200 μ M acetosyringon (AS). Các tế bào *Agrobacterium* được tạo huyền phù lại trong môi trường nuôi cấy (CM4C lỏng, như được mô tả trong bảng 8 trong US 6,573,361) và mật độ tế bào được điều chỉnh để mà các tế bào đã được tạo huyền phù lại có mật độ quang là 1 khi được đo trong quang phổ kế ở chiều dài bước sóng là 660 nm (*tức là*, OD₆₆₀). Phôi ngô chưa trưởng thành mới được phân lập được nuôi cấy với *Agrobacterium* và được nuôi đồng thời trong 2 đến 3 ngày trong điều kiện tối ở 23°C. Sau đó, phôi được chuyển vào môi trường trễ (N6 1-100-12; như được mô tả trong bảng 1 trong US 5,424,412) được bổ sung bằng 500 mg/l Carbenicillin (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) and 20 μ M AgNO₃) và được ủ ở 28 °C trong 4 đến 5 ngày. Tất cả các giống nuôi cấy sau đó được giữ ở nhiệt độ này.

Phôi được chuyển vào môi trường chọn lọc thứ nhất (N61-0-12, như được mô tả trong bảng 1 trong US 5,424,412), được bổ sung 500 mg/l Carbenicillin và 0,5 mM glyphosat. Hai tuần sau đó, các mô còn sống được chuyển vào môi trường chọn lọc thứ hai (N61-0-12) được bổ sung 500mg/l Carbenicillin và glyphosat 0,1 mM. Các mô sẹo còn sống được nuôi cấy thứ cấp 2 tuần một lần trên tổng số khoảng 3 lần nuôi cấy thứ cấp trên glyphosat 1,0 mM. Khi các mô chịu glyphosat được nhận diện, mô được

gộp lại để tái sinh. Để tái sinh, các mô sẹo được chuyển vào môi trường tái sinh (MSOD, như được mô tả trong bảng 1 trong US 5,424,412) được bổ sung axit abscisic 0,1 μ M (ABA; Sigma-Aldrich, St Louis, MO) và ủ trong hai tuần. Mô sẹo tái sinh được chuyển vào môi trường có hàm lượng sucroza cao và được ủ trong hai tuần. Các cây non được chuyển vào môi trường MSOD (không chứa ABA) trong bình nuôi cấy và được ủ trong hai tuần. Các cây đã mọc rễ có các đặc điểm kiểu hình bình thường được chọn và được chuyển vào đất trồng để sinh trưởng và đánh giá thêm. Các cây RO đã được tạo ra thông qua sự biến nạp trên đây được chuyển vào đất trồng để sinh trưởng và sau đó được tự thụ phấn để tạo ra hạt R1. Các cây đã được chọn bằng cách kết hợp các kỹ thuật phân tích, bao gồm phân tích TaqMan, PCR và phun thuốc diệt cỏ.

Sự kiện MON 87427 được chọn từ 45 sự kiện chuyển gen riêng biệt trên cơ sở các phân tích trong nhiều năm chứng tỏ các đặc điểm phân tử và kiểu hình vượt trội của sự kiện và sự kết hợp kiểu gen đơn bội mong muốn của nó (Cr 9, 60 cM). Quy trình chọn lọc sự kiện MON 87427 bắt đầu với các cây ngô được biến nạp đại diện cho các sự kiện 45 R0. Chúng được phun thuốc diệt cỏ glyphosat (4,536 kg/hecta tại V7) và sau đó đánh giá khả năng chống chịu trong giai đoạn sinh dưỡng và sự bắt dục sau khi phun glyphosat. Trong 45 sự kiện ban đầu, 35 sự kiện R0 đã thể hiện khả năng chịu glyphosat trong giai đoạn sinh dưỡng và bắt dục được khi được phun với glyphosat ở nồng độ và thời gian dự tính thử nghiệm. Các cây chứa một trong 35 sự kiện R0 này sau đó được đưa vào giai đoạn cao hơn là xác định đặc tính thêm bằng cách phân tích phân tử. Sử dụng phân tích Tagman ® PCR và phân tích thẩm tách Southern, 35 sự kiện được xác định đặc tính phân tử. Trong 35 sự kiện được phân tích, 29 sự kiện được chọn để đưa vào giai đoạn cao hơn và thử nghiệm trên cánh đồng. 29 sự kiện R1 sau đó được phân tích trong các thử nghiệm trên cánh đồng về độ hiệu quả và năng suất. Ngoài ra, việc xác định đặc tính phân tử bổ sung, bao gồm xác định đặc tính kiểu gen và biểu hiện protein, được thực hiện. Dữ liệu được phân tích và từ phân tích toàn diện cây R1 và các kết quả thử nghiệm trên cánh đồng, ba sự kiện chính được chọn và được đưa vào giai đoạn cao hơn là thử nghiệm trên cánh đồng R2. Tiếp theo phân tích và thử nghiệm 3 sự kiện chính dẫn đến việc chọn sự kiện MON 87427.

Việc sàng lọc thêm trên cánh đồng bao gồm xử lý sự kiện MON 87427 với glyphosat ở liều 2,268 kg/hecta (Roundup Ultra®, Monsanto Co., St. Louis, MO) ở giai đoạn sinh trưởng sinh dưỡng 4 (V4) và giai đoạn sinh trưởng sinh dưỡng 10 (V10). Tổng số cây tiếp nhận và không tiếp nhận được xác định sau khi phun ở giai đoạn V4. Ngoài ra, các cây được xử lý được tính điểm về bệnh xanh lợt và dị tật ở ngày thứ 10 đến 14 sau khi xử lý (DAT) sau khi phun ở cả hai giai đoạn V4 và V10. Các đánh giá khả năng bắt dục ở cờ vào lúc nở hoa cũng được tính điểm cho các cây được phun ở giai đoạn V4 và V10.

Ví dụ 2: Xác định đặc tính các trình tự ADN MON 87427

ADN được chèn vào hệ gen cây ngô MON 87427 và trình tự hệ gen kẹp sườn được xác định đặc tính bằng cách phân tích phân tử chi tiết. Các phép phân tích này bao gồm: giải trình tự ADN đoạn chèn gen chuyển và ADN hệ gen kẹp sườn đoạn chèn gen chuyển, xác định số đoạn chèn gen chuyển (số vị trí tích hợp trong hệ gen cây ngô), xác định số bản sao (số bản sao của ADN gen chuyển trong một ổ gen (locus)), phân tích tính nguyên vẹn của cấu trúc gen được chèn và phân tích đoạn chèn kẹp sườn AND hệ gen và mối liên hệ của việc chèn với các vùng kiểu gen đơn bội trong hệ gen cây ngô.

Các trình tự kẹp sườn đoạn chèn gen ADN gen chuyển ở MON 87427 đã được xác định bằng các kỹ thuật PCR. ADN hệ gen của cây đã được phân lập từ dòng chuyển gen từ mô được nuôi trong các điều kiện nhà kính chuẩn. Mô cây được kết hợp với nitor lỏng và nghiền thành bột mịn bằng cối và chày. ADN được chiết sử dụng kit chiết tách ADN hệ gen Nucleon™ PhytoPure™ (RPN8511, Amersham, Piscataway, NJ) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sau bước kết tủa cuối cùng, ADN được huyền phù hóa lại trong 0,5 ml TE (Tris-HCl 10mM có pH =8,0, EDTA 1mM). Phương pháp này có thể được thay đổi bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này để chiết tách ADN từ mô bất kỳ của cây ngô, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, hạt. Một phần của ADN được phân giải bằng enzym endonucleaza giới hạn được chọn dựa trên phép phân tích giới hạn ADN gen chuyển. Sau khi các đoạn giới hạn tự lai ghép, PCR được tiến hành bằng cách sử dụng các đoạn mồi được thiết kế từ trình tự ADN gen chuyển mà khuếch đại các trình tự kéo dài từ đầu 5' và đầu 3' của ADN gen chuyển. Các sản phẩm PCR đã được tách ra bằng điện di gel agaroza và tinh

chế sử dụng kit tinh chế gel QIAGEN (Qiagen, Valencia, CA). Các sản phẩm ADN tiếp theo đã được giải trình tự trực tiếp bằng cách sử dụng các phương thức giải trình tự ADN chuẩn. Trình tự kẹp sườn 5' mà kéo dài đến trình tự bờ phải (RB) của ADN gen chuyển có cấu trúc biểu hiện được nêu trong SEQ ID NO: 7. Trình tự kẹp sườn 3' mà kéo dài đến trình tự bờ trái (LB) của ADN gen chuyển có cấu trúc biểu hiện được nêu trong SEQ ID NO: 8. Trình tự được tích hợp đầy đủ vào ADN hệ gen cây ngô và chứa cấu trúc biểu hiện ADN được nêu trong SEQ ID NO: 9.

Các trình tự phân tử ADN phân lập được so sánh với trình tự ADN gen chuyển để nhận biết trình tự kẹp sườn và đoạn ADN gen chuyển được phân lập đồng thời. Xác nhận sự có mặt của cấu trúc biểu hiện thu được bằng PCR với các đoạn mồi được thiết kế dựa trên dữ liệu trình tự kẹp sườn được nội suy và trình tự ADN gen chuyển đã biết. Trình tự kiểu đại tương ứng với vùng mà trong đó ADN gen chuyển đã được tích hợp trong dòng biến nạp được phân lập bằng cách sử dụng các đoạn mồi được thiết kế từ các trình tự kẹp sườn trong MON 87427. Các phản ứng PCR đã được thực hiện bằng cách sử dụng hệ thống khuếch đại Elongase® (Invitrogen, Carlsbad, CA). Các trình tự ADN kẹp sườn trong MON 87427 và các trình tự kiểu đại LH198 đã được phân tích theo các cơ sở dữ liệu nucleotit và protein. Thông tin này đã được sử dụng để nghiên cứu mối quan hệ giữa gen chuyển với hệ gen của cây và để tìm kiếm tính nguyên vẹn trong vị trí chèn.

Ví dụ 3: Các phương pháp hữu ích để nhận biết ADN MON 87427 trong mẫu

Ví dụ này mô tả các phương pháp hữu ích để nhận biết AND sự kiện MON 87427 trong mẫu. (Các) trình tự kẹp sườn của sự kiện, trình tự hệ gen cây ngô kiểu đại, và trình tự gen chuyển được sử dụng để thiết kế các đoạn mồi và các mẫu dò để sử dụng trong các phương pháp đã nêu. (Các) đoạn mồi và (các) mẫu dò nội chứng có thể hoặc không được bao gồm trong thử nghiệm.

Phương pháp khuếch đại nhiệt TAQMAN® điểm cuối để nhận biết sự kiện MON 87427 (thử nghiệm cụ thể cho sự kiện) và/hoặc gen tổng hợp CP4-EPSPS (a.k.a. CP4-Zm) (thử nghiệm cụ thể cho gen chuyển) của sự kiện MON 87427 trong mẫu được mô tả. (Các) trình tự kẹp sườn của sự kiện, trình tự hệ gen cây ngô kiểu đại, và trình tự gen chuyển đã được sử dụng để thiết kế các đoạn mồi và các mẫu dò để sử dụng trong các thử nghiệm này (bảng 1). Các đoạn mồi ADN đặc hiệu sự kiện được sử dụng trong thử

nghiệm là các đoạn mồi SQ12763 (SEQ ID NO: 17) và SQ12886 (SEQ ID NO: 18) với mẫu dò PB4352 gắn nhãn 6-FAMTM (SEQ ID NO: 19). Các đoạn mồi ADN đặc hiệu sự kiện được sử dụng trong thử nghiệm là các đoạn mồi SQ20052 (SEQ ID NO: 11) và SQ20053 (SEQ ID NO: 12) với mẫu dò PB10016 gắn nhãn 6-FAMTM (SEQ ID NO: 13). 6-FAMTM là sản phẩm thuốc nhuộm huỳnh quang của Applied Biosystems (Foster City, CA) được gắn với mẫu dò ADN. Các đối chứng cho phân tích này bao gồm đối chứng dương từ cây ngô chứa ADN từ sự kiện MON 87427, đối chứng âm từ cây ngô không chuyển gen và đối chứng âm không chứa ADN khuôn.

Ngoài ra, đối chứng tùy ý cho phản ứng PCR bao gồm các đoạn mồi đối chứng cục bộ và mẫu dò đối chứng nội, đặc hiệu cho gen sao chép đơn trong hệ gen cây ngô. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật tương ứng sẽ biết cách thiết kế đoạn mồi đặc hiệu cho gen sao chép đơn trong hệ gen cây ngô. Các đoạn mồi ADN được sử dụng trong thử nghiệm đặc hiệu gen chuyển làm các đối chứng nội là các đoạn mồi SQ1241 (SEQ ID NO: 14) và SQ1242 (SEQ ID NO: 15) với mẫu dò PB0084 nhãn VIC TAMRA (SEQ ID NO: 16). Đối với thử nghiệm đặc hiệu cho sự kiện, các mẫu dò và đoạn mồi đối chứng nội có thể được sử dụng với các bước tùy ý 5-6 sau. Đối với thử nghiệm đặc hiệu cho sự kiện, không có đối chứng nội được sử dụng.

Bảng 1: Các đoạn mồi và các mẫu dò

Đoạn mồi-mẫu dò CP4Zm	Tên	SEQ ID NO	Trình tự
Mô tả			
Đoạn mồi gen chuyển-1	SQ20052	11	GGCAACCGCTCGCAAAT
Đoạn mồi gen chuyển-2	SQ20053	12	ATCGCCCGGAATCCTGA
Mẫu dò nhãn 6-FAM TM gen chuyển	PB10016	13	6FAM-TTCCGGCCTTTCGGGAA
Đối chứng nội bộ	SQ1241	14	GCCTGCCGCAGACCAA
Đối chứng nội bộ	SQ1242	15	CAATGCAGAGCTCAGCTTCATC
Mẫu dò VIC đối chứng nội bộ	PB0084	16	VIC-TCCAGTACGTGCAGTCCCTCC TCCCT-TAMRA
Đoạn mồi -Mẫu dò MON 87427			
Mô tả	Tên		Trình tự
Đoạn mồi sự kiện-1	SQ12763	17	CGGAAACGGTCGGGTCA

Đoạn mồi sự kiện-2	SQ12886	18	CTCCATATTGACCATCATACTCATTGC
Mẫu dò nhãn 6-FAM™ sự kiện	PB4352	19	6FAM-AATGTAGAAAATCGGGACAAT-MGBNFQ

Các ví dụ về điều kiện hữu ích với phương pháp Endpoint TAQMAN® là như sau:

Bước 1: nước có điện trở 18 mΩ được điều chỉnh đến thể tích cuối là 10 µl.

Bước 2: 5,0 µl của Universal Master Mix 2X (dNTP, enzym, chất đệm) đến nồng độ cuối là 1X.

Bước 3: 0,5 µl hỗn hợp đoạn mồi bao gồm Event Primer-1 (SEQ ID NO: 17) và Event Primer-2 (SEQ ID NO: 18) (được huyền phù hóa trong nước có điện trở 18 mΩ đến nồng độ 20 uM cho mỗi đoạn mồi) đến nồng độ cuối là 1,0 µM (ví dụ, trong ống ly tâm siêu nhỏ, các thành phần sau được bổ sung để đạt đến 500 µl ở nồng độ cuối là 20uM: 100 µl Event Primer-1 (SEQ ID NO: 17) ở nồng độ là 100 µM; 100 µl Event Primer-2 (SEQ ID NO: 18) ở nồng độ 100 µM; 300 µl nước có điện trở 18 mΩ).

Bước 4: 0,2 µl mẫu dò MGB nhãn 6-FAM™ Probe (SEQ ID NO: 19) (được huyền phù hóa lại trong nước có điện trở 18 mΩ đến nồng độ 10 µM) đến nồng độ cuối cùng là 0,2 µM.

Bước 5 (tùy ý): 0,5 µl hỗn hợp đoạn mồi đối chứng nội Primer-1 và đoạn mồi đối chứng nội Primer-2 (được huyền phù hóa lại trong nước có điện trở 18 mΩ đến nồng độ là 20 µM cho mỗi đoạn mồi) đến nồng độ cuối là 1,0 µM.

Bước 6 (tùy ý): 0,2 µl mẫu dò VIC™ đối chứng cục bộ đến nồng độ cuối cùng là 0,2 µM (được huyền phù hóa lại trong nước có điện trở 18 mΩ đến nồng độ 10 µM)

Bước 7: 3,0 µl ADN đã chiết tách (có khuôn) cho mỗi mẫu với mỗi mẫu có một trong số các thành phần sau đây bao gồm 1. Các mẫu lá cần được phân tích; 2. Đối chứng âm (ADN không chuyển gen); 3. Đối chứng nước âm (không có khuôn); 4. ADN MON 87427 đối chứng dương.

Bước 8: Điều kiện máy luân nhiệt như sau: Một chu kỳ tại 50°C trong 2 phút; một chu kỳ tại 95°C trong 10 phút; mười chu kỳ tại 95°C trong 15 giây sau đó tại 64°C trong 1 phút với -1°C/vòng; ba mươi chu kỳ tại 95°C trong 15 giây sau đó tại 54°C trong 1 phút; chu kỳ cuối cùng tại 10°C.

Các thử nghiệm này được tối ưu hóa để sử dụng với hệ thống PCR 9700 Applied Biosystems GeneAmp® (chạy tại tốc độ lớn nhất) hoặc máy luân nhiệt MJ Research ADN Engine PTC-225. Các phương pháp khác và thiết bị khác được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật tương ứng biết mà tạo ra sản phẩm khuếch đại để nhận biết ADN MON 87427 là thuộc khả năng kỹ thuật.

SEQ ID NO: 11 và SEQ ID NO: 12 hoặc SEQ ID NO: 17 và SEQ ID NO: 18, là mỗi ví dụ về cặp phân tử ADN (cặp đoạn môi) gồm phân tử ADN thứ nhất và phân tử ADN thứ hai khác với phân tử ADN thứ nhất, trong đó các phân tử ADN thứ nhất và thứ hai, mỗi phân tử bao gồm phân tử axit nucleic có trình tự nucleotit có chiều dài vừa đủ gồm các nucleotit liên kề có trình tự SEQ ID NO: 10 có chức năng như các đoạn môi ADN khi được sử dụng đồng thời trong phản ứng khuếch đại với ADN có nguồn gốc từ sự kiện MON 87427 để tạo ra amplicon xác định ADN MON 87427 trong mẫu. Các đoạn môi này có thể được sử dụng trong phản ứng chuỗi polymeraza khác (PCR) trên cơ sở các phương pháp phát hiện sự kiện.

Ví dụ 4: Sử dụng sự kiện MON 87427 để sản xuất hạt lai

Ví dụ sau mô tả một cách sử dụng MON 87427 nhằm mục đích nhân giống ngô bao gồm việc sử dụng các phương pháp được mô tả trong US 20090165166 và/hoặc trong US 7,314,970.

Trong quá trình sản xuất hạt lai, các cây ngô chứa MON 87427 được trồng trong khu vực như cánh đồng mở. (Các) cây ngô bố mẹ khác có thể có hoặc không có trong cùng khu vực. Để phòng trừ cỏ dại trong thời gian dự tính sản xuất hạt và trong các cánh đồng thương mại, glyphosat có thể được sử dụng cho các cây ngô bao gồm MON 87427 ở các giai đoạn sinh dưỡng như theo chỉ dẫn trên các nhãn sản phẩm nông dụng Roundup®, ở cùng các tỷ lệ được sử dụng trong các sự kiện ngô NK603 và MON 88017 theo nhãn Roundup Ready®. Để sản xuất hạt lai, hai lần sử dụng glyphosat bắt đầu chỉ trước khi và/hoặc trong các giai đoạn phát triển cờ (gần các giai đoạn sinh trưởng sinh dưỡng của ngô nằm trong phạm vi từ V8 đến V13) được sử dụng cho các cây MON 87427 để tạo ra kiểu gen bất dục đực thông qua khả năng chịu glyphosat có chọn lọc mô. Trong hệ thống sản xuất hạt ngô lai, các cây MON 87427 được sử dụng glyphosat ở các thời gian dự tính phát triển cờ sẽ bất dục đực và do đó có thể được thụ phấn dễ dàng bằng các cây (đực) nhận phấn hoa khác, dẫn đến hạt ngô lai có thể phát

triển được mang gen chịu glyphosat chọn lọc mô. Các cây cho phần có thể hoặc không thể có trong cùng khu vực. Sự thụ phấn có thể được tác động bằng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, bao gồm bằng cách bố trí gần cây khác hoặc thụ phấn thủ công. Chỉ các ứng dụng glyphosat được định thời gian cụ thể bắt đầu chỉ trước khi và/hoặc trong các giai đoạn phát triển cò (gần các giai đoạn sinh trưởng sinh dưỡng của ngô nằm trong khoảng từ V8 đến V13) sẽ tạo ra kiểu hình bất dục dục thông qua khả năng chịu glyphosat chọn lọc mô ở MON 87427. Glyphosat là thuốc diệt cỏ toàn thân mà dễ được di chuyển thông qua libe trong cây. Khi glyphosat có trong libe, nó di chuyển tới khu vực có hoạt động mô phân sinh cao, sự phân bố chìm theo nguồn điển hình. Sự phát triển phần ở cây ngô diễn ra gần bốn tuần thì hoàn thành. Các giai đoạn sinh trưởng sớm của cò bắt đầu ở gần giai đoạn sinh trưởng sinh dưỡng của ngô V9, do đó các áp dụng dụng glyphosat được thực hiện ở gần giai đoạn này và thời điểm cho phép sự chuyển vị tối đa của glyphosat vào các giao tử dục. Các lần sử dụng glyphosat được thực hiện trong các giai đoạn sinh dưỡng sớm, thích hợp với thời gian dự tính sử dụng được quy định trong nhãn sản phẩm nông nghiệp Roundup® hiện nay nhằm mục đích phòng trừ cỏ dại, mà không ảnh hưởng đến sự sản xuất phần của MON 87427 do các giao tử dục nhạy cảm không phát triển mạnh tại thời điểm đó. Các điều kiện xử lý glyphosat có thể được thay đổi bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật khi sử dụng thuốc diệt cỏ và thuộc phạm vi của sáng chế.

MON 87427 khi được lai với cây ngô chứa sự kiện glyphosat khác như cây ngô chứa sự kiện NK603 (US 6,825,400) để tạo ra hạt lai cho thấy không có sự giảm năng suất so với năng suất từ cây lai NK603 thông thường (xem Fig.2). Cánh đồng ngô lai đã được xử lý với glyphosat ở hai lần phun liên kế với tỷ lệ 1,02 kg (2,25 lb) trên 4047 m² (1 ac), mỗi lần để phòng trừ cỏ dại và không nhận thấy có sự khác nhau về sự tổn thương hoặc sự bất dục dục giữa các cây lai chứa sự kiện MON 87427 khác nhau và cây lai NK603. Điều này minh họa rằng các cây lai F1 từ các cây lai chứa sự kiện MON 87427 hoàn toàn chịu được glyphosat khi được sử dụng để phòng trừ cỏ dại.

Ví dụ 5: Đo các giai đoạn phát triển cò

Các giai đoạn phát triển cò được minh họa trong Fig.3, với kích cỡ theo khoảng milimet được đặt trong ngoặc đơn. Trong Fig., Vg là mô phân sinh ở giai đoạn sinh

duỡng; T0 là sự thay đổi đột ngột từ sinh duỡng sang sinh sản; T1 là điểm sinh trưởng sinh sản nhìn thấy được (0,9 mm); T2 là mầm nhánh bên nhìn thấy được (1,8 mm); T3 là mầm bông con nhìn thấy được (4,1 mm); T4 là trục tâm và sự kéo dài trục ra hướng bên (12,9 mm); T5 là sự bắt đầu biệt hóa bao phấn (41,0 mm); T6 là sự bắt đầu biệt hóa phấn (175 mm); và T7 là sự tiết bao phấn và sự rụng phấn (285,0 mm). Giai đoạn phát triển cò của cây đã cho đã được đo bằng cách nghiên cứu cò ở các giai đoạn trưởng thành khác nhau. Sử dụng dao mổ và kẹp mảnh theo phạm vi giải phẫu, mô phân sinh cò đã được giải phẫu từ các lá đang phát triển. Mô phân sinh sau đó đã được cắt ở đáy của nó bằng dao mổ và được đánh giá theo các giai đoạn phát triển cò (được trình bày trong Fig.3) bằng cách quan sát qua kính hiển vi.

Ví dụ 6: Giai đoạn phát triển sinh duỡng (giai đoạn V) tương ứng với giai đoạn phát triển cò

Ví dụ này chứng minh rằng trọng lượng khô của cò, chiều dài cò, và giai đoạn phát triển cò thay đổi đáng kể qua các kiểu gen khi được đo tương ứng với các giai đoạn sinh duỡng của cây và sự sinh trưởng sinh duỡng của cây.

Mười kiểu gen đã được gieo: các dòng dòng nội phối LH198, LH287, O1DKD2, 19HGZI, 17IDI6 và các cây lai DKC 44-46, DKC 47-10, DKC 52-40, DKC 58-80, DKC 63-81. Các cây lai đã được chọn để đại diện cho các di truyền mà sẽ biểu diễn mô hình phát triển khác nhau. Nghiên cứu đã được thực hiện ở Farmer City (IL), Kearney (NE), và Williamsburg (IA). Mười kiểu gen được trồng trên một đồn điền hình nón và được tỉa thưa đến mật độ cố định cuối đạt 95.000 cây trên một hecta. Chiều dài mảnh đất nhỏ là 4,05 mét với các lối chiếm 0,61 mét chia thành bốn hàng để đảm bảo tất cả các cây đều được xử lý và giảm các tác dụng ra vùng biên. Dữ liệu được thu thập ghi lại các quan sát về cả sự phát triển sinh duỡng của cây và sự phát triển cò tương ứng với các giai đoạn phát triển cò.

Những khác nhau có tính phân biệt trong sự phát triển cò đã được quan sát thấy giữa các kiểu gen ở các giai đoạn sinh duỡng giống hệt nhau tương ứng (các giai đoạn V). Ví dụ, sự khác biệt kích cỡ cò giữa các kiểu gen được thấy rõ ở mỗi giai đoạn V. Chiều dài cò trung bình ở giai đoạn V8 là 7 mm đối với LH198, 40,2 mm đối với LH287, và 47,8 mm đối với DKC44-46 (Fig.4). Phạm vi kích cỡ chiều dài cò này ở giai đoạn V8 tương ứng với sự khác biệt lên tới 7 lần giữa các kiểu gen. Ở giai đoạn

V10, chiều dài cò trung bình cho ba kiểu gen này là 70,1 mm, 148,2 mm, và 277,3 mm, tương ứng (Fig.4). Điều này dẫn đến phạm vi khác biệt gần 4 lần giữa các kiểu gen. Sự biến đổi di truyền trong sự phát triển cò tương ứng với giai đoạn V cũng là hiển nhiên khi nghiên cứu sự tích lũy trọng lượng khô của cò.

Trong nghiên cứu khác, bảy mươi hai dòng nội phối đã được sử dụng chiếm phạm vi trường thành rộng. Các dòng nội phối này đã được nhóm thành 6 nhóm trường thành để đơn giản hóa quy trình mô xẻ (bảng 2). Các dòng nội phối không tính trạng đã được chọn để tránh sự phức tạp khi thực hiện mô xẻ cò trên các cánh đồng được điều hòa. Thử nghiệm này phản ánh dữ liệu được thu thập ở bốn vị trí khác nhau trên cánh đồng: Williamsburg (IA), Waterman (IL), Farmer city (IL) và Constantine (MI). Bốn hàng qua các mảnh đất nhỏ dài 6,09 mét đã được sinh trưởng. Quần thể đích cuối cùng có 38,000 cây trên một héc ta. Tổng số cố định cuối cùng đã được ghi dữ liệu ở giai đoạn V3. Các lá thứ năm và lá thứ mười của ba cây tiêu biểu trên một mảnh đất nhỏ đã được đánh dấu để giữ dấu của các giai đoạn V; tất cả các lá đã được đếm bao gồm các lá bao mầm. Ba cây tiêu biểu từ mỗi nhóm đã được lấy mẫu ở thời điểm hoa phát triển đến 60, 70 và 80% đơn vị phát triển trung bình (được xác định là khi gần một nửa số cò trong nhóm đó đã rụng phần, được biểu diễn là P50) và các mô xẻ cò đã được thực hiện như được mô tả trước đó.

Bảng 2

Nhóm trường thành	Nhóm 1	Nhóm 2	Nhóm 3	Nhóm 4	Nhóm 5	Nhóm 6
GDU trung bình trên P50%	1200	1280	1330	1370	1420	1460
Sự mô xẻ thứ nhất	720	768	798	822	852	876
Sự mô xẻ thứ hai	840	896	931	959	994	1022
Sự mô xẻ thứ ba	960	1024	1064	1096	1136	1168

Các cây đã được chọn từ các hàng giữa để tránh các cây ở bên ngoài rìa. Ở thời điểm lấy mẫu thứ nhất, các cây ở giai đoạn phát triển thích hợp đã được đánh dấu để được sử dụng cho lần lấy mẫu thứ hai và thứ ba. Ngày mỗi mô xẻ đồng thời với giai đoạn V ở các thời điểm lấy mẫu đã được ghi dữ liệu. Giai đoạn phát triển cò đã được nhận biết theo thang đo sự phát triển tương đối như được mô tả ở trên. Các mảnh đất nhỏ tiếp tục được kiểm tra thông qua sự nở hoa và ngày P50 được đăng ký. Giai đoạn

sinh dưỡng được thay đổi qua các dòng nội phối tương ứng với các giai đoạn phát triển cò. Ví dụ, giai đoạn V ở T5 (bắt đầu biệt hóa bao phấn) nằm trong khoảng là lớn hơn 6,5 lá qua các dòng nội phối, từ 7 đến 14 lá. Có gần 64% của trung bình tổng cộng là 10,3 lá đạt đến giai đoạn này.

Ví dụ 7: GDU trung bình tương ứng với các giai đoạn phát triển cò và hoa

Ví dụ này chứng minh rằng GDU trung bình cần thiết để đạt đến giai đoạn phát triển cò đã cho hoặc giai đoạn hoa có thể thay đổi đáng kể qua các kiểu gen và do đó, GDU đó không phải là dự đoán đáng tin cậy của sự phát triển cò. Dữ liệu đã được sử dụng từ các mảnh đất nhỏ trên cánh đồng và các cây dòng nội phối được mô tả ở trên. Các nhiệt độ hàng giờ từ khi gieo đến sự nở hoa đã được kiểm tra sử dụng các trạm đo thời tiết Onset và dữ liệu được sử dụng để tính GDU tích lũy hàng ngày theo phương pháp truyền thống (tức là, lấy trung bình các nhiệt độ lớn nhất và nhỏ nhất hàng ngày). Dữ liệu từ sự mổ xẻ mẫu chỉ ra giai đoạn phát triển được thí điểm được vẽ biểu đồ cho các yêu cầu GDU. Các dòng nội phối có số lượng lá khác nhau thường được mong đợi có yêu cầu GDU lớn hơn nhằm để đạt đến giai đoạn phát triển cò cụ thể. Tuy nhiên, sự thay đổi được quan sát thấy trong các giai đoạn V đến T5 được thảo luận ở trên không giải thích tất cả sự biến đổi được quan sát thấy trong GDU đến T5. Điều này có thể nhận định rằng phyllochron, được định nghĩa là thời điểm giữa sự dài ra của các lá kế tiếp, có thể thay đổi giữa các dòng nội phối. Các kết quả của nghiên cứu này đã cho thấy rằng GDU để đạt được giai đoạn T5 được giới hạn khoảng là lớn hơn 400 đơn vị nhiệt hoặc đơn vị độ sinh trưởng qua các dòng nội phối, khoảng 40% trung bình tổng cộng.

Mối quan hệ bền vững giữa các yêu cầu GDU đến P50 và giai đoạn phát triển cò đã cho thông qua các giống được dòng nội phối đã được quan sát thấy. Sử dụng dữ liệu từ các mảnh đất nhỏ trên cánh đồng và các cây dòng nội phối, các yêu cầu GDU trung bình đến P50 đã được ghi qua các dòng nội phối và được so sánh tại các giai đoạn phát triển cò đã cho. Các yêu cầu GDU đến P50 được thay đổi từ 1283 đến 1645 đơn vị, từ dòng nội phối trưởng thành ngắn nhất đến dài nhất; sự sai khác lớn hơn 360 GDU một chút. Các sai khác đã được phát hiện ra tương ứng với sai khác về yêu cầu GDU trung bình đến giai đoạn T5 trong các dòng nội phối (Fig.5).

Ví dụ 8: Xây dựng thang đo sự phát triển tương đối

Ví dụ này chứng minh sự xây dựng thang đo chuẩn cho việc kiểm tra và/hoặc dự đoán sự phát triển còi. Thang đo sự phát triển tương đối này đã chuẩn hóa thành công các giai đoạn phát triển tương đối của còi của cây ngô qua các dòng nội phối.

Mối quan hệ bền vững đã cho giữa các yêu cầu GDU để đạt P50 ở giai đoạn phát triển còi đã cho qua các giống nội phối như được mô tả ở trên, thang đo sự phát triển tương đối đã được phát triển. Mối quan hệ này được tính toán bằng cách biểu diễn sự phát triển còi của mỗi kiểu gen tương ứng với thời điểm nóng mà sự rụng phần diễn ra như sau:

$$\text{Thang đo sự phát triển tương đối} = (\text{GDU trên Tn} / \text{GDU trên Px})$$

Dữ liệu đã được sử dụng từ các mảnh đất nhỏ trên cánh đồng và các cây dòng nội phối được mô tả ở trên. Giá trị GDU ở giai đoạn phát triển còi đã cho (GDU trên Tn) chia cho số GDUs đã biết cần thiết để đạt đến giai đoạn rụng phần (GDU trên Px), mà trong trường hợp này là P50 cho kiểu gen nhất định. Điều này đã điều chỉnh sự sai khác về giai đoạn phát triển còi thông qua các kiểu gen. Ví dụ, các yêu cầu GDU để đạt T5 là khá thích hợp trên thang đo sự phát triển tương đối trong tất cả các dòng nội phối và chỉ nằm trong khoảng từ 69 đến 75% cần thiết cho P50. Sự biến đổi trong các đường hồi quy của các yêu cầu GDU của các kiểu gen khác nhau tương ứng với giai đoạn phát triển còi so với các đường hồi quy thích hợp hơn của cùng các kiểu gen đó sử dụng thang đo T tiêu chuẩn đã được sử dụng để đánh giá sự chuẩn hóa của thang đo, không tính đến nhóm trưởng thành (Fig.7).

Ví dụ 9: Dự đoán thời gian dự tính tối ưu cho sự xử lý điều hòa sự phát triển

Ví dụ này chứng minh việc sử dụng thang đo sự phát triển tương đối để xác định thời gian dự tính tối ưu cho chế độ phun hóa chất nhằm để đạt được sự bắt dục của phần ngô hoàn toàn. Trong ví dụ này, hóa chất là thuốc diệt cỏ glyphosat Roundup® được sử dụng trong sự kết hợp với các cây ngô MON 87427 trong Roundup® Hybridization System (RHS). Thời gian phun tối ưu đã có tương ứng với giai đoạn phát triển còi thực sự và sự bắt dục của còi của cây ngô hoàn toàn đã đạt được với chỉ liều đơn Roundup® hữu hiệu.

Ba mươi hạt gốc dòng nội phối chứa sự kiện MON 87427 đã được chọn để nghiên cứu và được phân nhóm thành hai nhóm trưởng thành. Các dòng nội phối được gieo trong hai mươi hàng chân, với ba luống chân. Khoảng cách hàng là 0,762 cm giữa các cây. Các hàng đã được gieo để mà có bốn hàng cây "thử nghiệm" cái tiếp đó là hai hàng cây thụ phấn đực. sự kiện chuyển gen đã được lựa chọn cho nghiên cứu này có khả năng chịu đựng và dung nạp giao tử cái chịu glyphosat nhưng không dung nạp giao tử đực (ví, khả năng chịu thuốc diệt cỏ glyphosat mô chọn lọc). Các cây đực thụ phấn cũng là giống đực có khả năng chịu glyphosat, trong khi đó các cây cái nhạy cảm với cây đực khi được xử lý với glyphosat. Dòng sự xử lý phun và phân thành hai nhóm con trên cơ sở sự trưởng thành của dòng nội phối. Ngay trước khi phun, ba cây tiêu biểu từ mỗi ô thử nghiệm đã được chọn và được cắt trên cánh đồng. Chiều dài cò, giai đoạn phát triển cò, ngày, và GDU khi phun đã được ghi lại. Các xử lý phun (SS1) bằng Roundup PowerMAX™ với thể tích nước là 42,56 lít/hecta đã được sử dụng một lần cho mỗi nhóm trưởng thành tương ứng của xử lý sử dụng bình phun khoảng cách cao. Các xử lý phun vô trùng đã được áp dụng trong khoảng từ 50% đến 80% của GDU được yêu cầu để đạt được P50 (được lấy giá trị trung bình trong nhóm trưởng thành) như được trình bày trong bảng 3, trong đó WC = “phòng trừ cỏ dại”; Trt 1 SS1 = 50% GDU đến P50; Trt 2 SS1 = 57,5% GDU đến P50; Trt 3 SS1 = 65% GDU đến P50; Trt 4 SS1 = 72,5% GDU đến P50; Trt 5 SS1 = 80% GDU đến P50.

Bảng 3

Phun WC= 1,16 kg/hecta (0,75#ae/ac) phun SS1 = 2,34 kg/hecta (1,25#ae/ac)								
Fahrenheit GDU (FGDU)		V3	650	750	850	950	1050	1150
Trt 1	Độ trưởng thành 1	WC	SS1					
	Độ trưởng thành 2	WC		SS1				
Trt 2	Độ trưởng thành 1	WC		SS1				
	Độ trưởng thành 2	WC			SS1			
Trt 3	Độ trưởng thành 1	WC			SS1			
	Độ trưởng thành 2	WC				SS1		
Trt 4	Độ trưởng thành 1	WC				SS1		
	Độ trưởng thành 2	WC					SS1	
Trt 5	Độ trưởng thành 1	WC					SS1	
	Độ trưởng thành 2	WC						SS1

Sau tất cả các thử nghiệm phun, các đánh giá sự bất dục/hữu dục cỏ đã được thực hiện bằng cách đánh giá sự tung bao phần và sự rụng phần tương ứng với sự xuất hiện râu. Các đánh giá này đã được thực hiện khi mỗi mảnh đất nhỏ là ở các giai đoạn phát triển cụ thể: 10% số cây có râu (S10); 50% cây có râu (S50); 90% cây có râu (S90); 3 ngày sau ngày S90 (S90+3); và 6 ngày sau ngày S90 (S90+6). Các cây đã được quan sát về khả năng tung bao phần (AE) và sự bắt thụ được đo bằng chỉ số khả năng tung bao phần (nguy cơ AE) là giá trị trung bình trọng số kết hợp với tỷ lệ phần trăm các cây trong khoảnh đất cho thấy sự tung bao phần với cường độ của hiện tượng. Ví dụ, Light Partial (LP) là cỏ với 10% bao phần tung ra hoặc ít hơn. Medium Partial (MP) là cỏ với nhiều hơn 11% tung ra phần, lên tới 25% bao phần tung ra. Heavy Partial (HP) là cỏ có lớn hơn 25% bao phần tung ra. Như được trình bày trong Fig.6, thang đo sự phát triển tương đối bậc lộ của số tối ưu về độ hiệu quả của hóa chất đối với việc tạo ra sự vô sinh ở cỏ của cây ngô nằm trong khoảng từ 0,62 đến 0,75 trong đó nguy cơ AE được giảm thiểu qua các dòng nội phối và các nhóm trưởng thành. Nghiên cứu này xác nhận tính hiệu quả của thang đo sự phát triển tương đối như một công cụ để đưa ra các khuyến cáo về sự phun đối với việc thực hiện hệ thống lai giống Roundup® qua các dòng nội phối. Điều sẽ được sử dụng đặc biệt với MON 87427.

Ví dụ 10: Phương pháp sản xuất hạt lai có độ thuần hạt được cải thiện

Phương pháp sản xuất hạt lai và độ nguyên chất của hạt tạo ra được đo sử dụng hai mươi tư khối sản xuất thí điểm ở các vị trí trong Kearney, Nebraska; Williamsburg, Iowa; Waterman, Illinois; Farmer City, Illinois; và Constantine, Michigan. Bốn khối MON 87427 và hai khối vô sinh cỏ tế bào chất (CMS) đã được gieo ở mỗi vị trí. Các khối MON 87427 gồm có 01DKD2MON87427-MON89034 cái x 80IDM2MON88017 đực, và các khối CMS gồm có 01DKD2NK603B-CMS cái x 80IDM2MON88017 đực.

Mô hình gieo là tỷ lệ 4:1 cái so với đực trên các hàng 76,2 cm. Mỗi khối thử nghiệm là mười rãnh có chiều dài từ 20,25 mét đến 30,37 mét. Khối được bao quanh bởi 9,14 mét (12 hàng) cây đực ở hai bên cũng như ở trước và sau. Khối ít nhất là cách nguồn phấn hoa tiềm năng 60,95 mét và được cách nhau 13,71 mét. Nghiên cứu đã được gieo ở quần thể gồm 40,000 và 38,000 lần lượt cho vùng đất được tưới và không được tưới. Cả hai hàng đực và cái đã được gieo đồng thời. Các hàng đực đã được đốt ở

giai đoạn sinh trưởng V3 để đạt được sự sinh trưởng chậm và sự rụng phần chậm trên các cây đực bằng cách đốt thay thế các khu vực có chiều dài hàng là 6,09 mét. Các ngọn lửa bằng khí propan đã được lắp sau máy quay cánh quạt kéo và được đặt trên các hàng đực và được đan xen giữa lửa mạnh và lửa không mạnh với khoảng cách là 6,09 mét. Sâu bộ đã được sử dụng ở thời điểm gieo hạt để giảm thiểu sự biến đổi do áp lực côn trùng. Các hàng đực đã được phá sau khi thụ phấn. Tất cả các khối đã được phun với tỷ lệ 340,19 g (0,75 lb) trên 4047 m² (1 ac) của Roundup PowerMax™ xung quanh V3 cho các mục đích phòng trừ cỏ dại. Ngoài ra, các khối MON 87427 đã được phun với hai lần phun với tỷ lệ 340,19 g (0,75 lb) trên 4047 m² (1 ac) Roundup PowerMax™ được áp dụng ở 825 và 975 đơn vị mức độ sinh trưởng (GDU) từ khi gieo hạt. Thể tích phun đã được giữ không đổi ở 15 gallon trên mẫu Anh (GPA).

Sự bất dục cò đã được đánh giá bằng cách kiểm tra các cây mỗi ngày xuất hiện cò trong 6 ngày sau khi kết thúc sự mọc râu (P90 + 6 ngày). Nếu sự vỡ (rụng phần) xảy ra, các cây riêng lẻ đã được phân loại thêm thành ít rụng phần (LP; ít hơn 10 bao phần lộ ra), rụng phần trung bình (MP; 11 bao phần lên tới 25% diện tích bề mặt cò đùn bao phần), hoặc rụng phần nhiều (HP; lớn hơn 25% diện tích bề mặt cò đùn bao phần). Khả năng tung bao phần (nguy cơ AE) sau đó đã được tính theo công thức:

$$\text{Nguy cơ AE (\%)} = [(LP \times 0,25) + (MP \times 0,5) + (HP \times 1,0)] / \text{số cây đứng} \times 100$$

Sau khi trưởng thành về mặt sinh lý và khoảng 30 đến 35% hàm lượng ẩm trong nhân, mẫu kiểu hoa cúc 100 tai trên khối đã được thu hoạch thủ công, theo sơ đồ lấy mẫu đã xác định trước để biểu diễn tất cả các ô trong khối. Các mẫu đã được sấy khô và được cân để điều chỉnh năng suất cuối cùng. Bộ mẫu thứ nhất đã được xử lý thủ công và được gửi để phân tích định lượng (đánh giá sự mọc mầm lạnh và mọc mầm ẩm sử dụng lặp lại hai lần 100 hạt). Bộ mẫu thứ hai đã được gửi để phân tích độ thuần di truyền (phân tích đa hình đơn nucleotit (SNP)) và phân tích độ thuần tính trạng (ELISA dấu đặc trưng cho cây đực). Bộ mẫu thứ ba đã được sử dụng để đưa ra dữ liệu về sự phân phối cỡ hạt. Các khối sản xuất thí điểm đã được thu hoạch kết hợp và năng suất được điều chỉnh đến độ ẩm 15% để xác định thể tích theo mẫu Anh.

Nhìn chung, cả khối CMS và khối MON 87427 đều vượt quá các tiêu chuẩn bất dục cò của cây ngô và độ thuần của hạt. Khả năng tung bao phần là thấp hơn tiêu chuẩn tính năng mong muốn là 0,5% thậm chí sau 6 ngày 90% quần thể cây cái đã tiết

ra râu (Fig.8). Hầu như không có sự vỡ nào được ghi dữ liệu trên các khối ngô MON 87427, nhưng tốc độ vỡ ở các giai đoạn râu muộn được quan sát thấy trên các khối CMS cao hơn một chút. Cả cây ngô bố mẹ cái và đực cho CMS và MON 87427 đã được thử nghiệm về độ thuần di truyền và kết quả đã cho thấy độ thuần là 100%. Mức độ bất dục cò của cây ngô cao của các cây bố mẹ MON 87427 và CMS đã tạo ra mức độ thuần di truyền và mức độ thuần tính trạng cao trong hạt lai được tạo ra từ các thử nghiệm này (Fig.9). Không có sự khác biệt đáng kể về mặt thống kê đối với độ thuần tính trạng giữa MON 87427 và CMS, nhưng có sự khác biệt đáng kể về mặt thống kê (ở $p < 0,05$) được đo giữa MON 87427 và CMS. Mức độ thuần di truyền của hạt lai được sản xuất sử dụng MON 87427 và Roundup® Hybridization System (RHS) là 98,7%, cao hơn đáng kể so với mức độ thuần di truyền của hạt lai được sản xuất sử dụng CMS (98,0%). Điều này suy ra các cây bố mẹ MON 87427 cái tạo ra số cây tự thụ phấn ít hơn 0,2% và số cây thụ phấn chéo ít hơn 0,5% so với các cây bố mẹ hệ thống CMS chứng minh rằng việc sử dụng MON 87427 với Roundup® Hybridization System (RHS) có thể được sử dụng để cải thiện độ thuần của hạt ngô trong sự sản xuất hạt ngô lai.

Số lưu của mẫu tiêu biểu của hạt chứa sự kiện MON 87427 được bộc lộ ở trên và được nêu trong yêu cầu bảo hộ đã được tạo ra theo Hiệp ước Budapest với Bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật Hoa Kỳ (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, VA. 20110. Số truy cập ATCC của số lưu này là PTA-7899. Số lưu sẽ được giữ nguyên trong nguồn lưu trữ trong thời kỳ là 30 năm, hoặc 5 năm sau yêu cầu cuối cùng, hoặc trong thời gian có hiệu lực của sáng chế, tùy theo thời gian nào dài hơn, và sẽ được thay thế khi cần thiết trong suốt thời kỳ đó.

Từ sự minh họa và mô tả các nguyên lý của sáng chế, sáng chế sẽ rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình trong kỹ thuật, sáng chế có thể được sửa đổi theo sự sắp xếp và trình bày chi tiết mà không đi trệch khỏi các nguyên lý đó. Chúng tôi yêu cầu bảo hộ tất cả các sửa đổi đều thuộc phạm vi và ý tưởng của sáng chế.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phân tử ADN tái tổ hợp bao gồm trình tự nucleotit được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1-8, SEQ ID NO: 10 và các trình tự bổ sung đầy đủ của các trình tự này.
2. Phân tử ADN tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó phân tử ADN tái tổ hợp này được tạo thành bởi sự tiếp hợp của phân tử axit nucleic khác loại được chèn và ADN hệ gen của cây ngô, tế bào cây ngô hoặc hạt ngô.
3. Phân tử ADN tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó phân tử ADN này là từ cây ngô chuyển gen bao gồm sự kiện MON 87427, mẫu hạt đại diện bao gồm sự kiện này đã được nộp lưu với số ATCC PTA-7899.
4. Phân tử ADN tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó phân tử ADN này là sản phẩm khuếch đại (amplicon) để xác định sự có mặt của ADN từ sự kiện MON 87427 của cây ngô chuyển gen.
5. Phân tử ADN tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó phân tử ADN tái tổ hợp này nằm trong cây ngô, tế bào của cây, hạt, cây thế hệ con, bộ phận của cây hoặc sản phẩm hàng hóa.
6. Mẫu dò ADN bao gồm trình tự nucleotit có chiều dài vừa đủ bao gồm các nucleotit liền kề nêu trong SEQ ID NO: 10, hoặc trình tự bổ sung đầy đủ của nó, có chức năng là mẫu dò ADN mà lai với phân tử ADN bao gồm trình tự nucleotit được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1-8 và SEQ ID NO: 10 trong các điều kiện lai nghiêm ngặt và không lai với phân tử ADN không bao gồm trình tự nucleotit được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1-8 và SEQ ID NO: 10 trong các điều kiện lai nghiêm ngặt, và trong đó mẫu dò ADN này bao gồm trình tự nucleotit SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 2.
7. Cặp phân tử ADN bao gồm phân tử ADN thứ nhất và phân tử ADN thứ hai khác với phân tử ADN thứ nhất, trong đó mỗi phân tử ADN thứ nhất và thứ hai này bao gồm trình tự nucleotit có chiều dài vừa đủ bao gồm các nucleotit liền kề nêu trong SEQ ID NO: 10, hoặc trình tự bổ sung đầy đủ của nó, và trong đó phân tử ADN thứ nhất này có trong trình tự ADN đoạn chèn gen chuyển nêu trong SEQ ID NO: 10, và phân tử ADN thứ hai này có trong trình tự ADN hệ gen của cây ngô có trình tự nêu trong SEQ

ID NO: 10, có chức năng là các đoạn mồi ADN khi được sử dụng đồng thời trong phản ứng khuếch đại với ADN từ sự kiện MON 87427 để tạo ra sản phẩm khuếch đại (amplicon) để xác định ADN sự kiện MON 87427 của cây ngô chuyển gen trong mẫu, và trong đó sản phẩm khuếch đại (amplicon) này bao gồm các trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 2.

8. Phương pháp phát hiện sự có mặt của phân tử ADN từ cây ngô chuyển gen bao gồm sự kiện MON 87427 trong mẫu, phương pháp bao gồm các bước:

- a) cho mẫu này tiếp xúc với mẫu dò ADN theo điểm 6;
- b) đưa mẫu và mẫu dò ADN này vào các điều kiện lai nghiêm ngặt; và
- c) phát hiện phép lai của mẫu dò ADN này với phân tử ADN trong mẫu đã nêu, trong đó việc lai mẫu dò ADN này với phân tử ADN này chỉ ra sự có mặt của phân tử ADN từ cây ngô chuyển gen bao gồm sự kiện MON 87427 trong mẫu đã nêu.

9. Phương pháp phát hiện sự có mặt của phân tử ADN từ cây ngô chuyển gen bao gồm sự kiện MON 87427 trong mẫu, phương pháp bao gồm các bước:

- a) cho mẫu này tiếp xúc với cặp phân tử ADN theo điểm 7;
- b) thực hiện phản ứng khuếch đại đủ để tạo ra sản phẩm khuếch đại (amplicon) ADN bao gồm trình tự được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1-8 và SEQ ID NO: 10; và
- c) phát hiện sự có mặt của sản phẩm khuếch đại (amplicon) ADN này trong phản ứng, trong đó sự có mặt của amplicon ADN này trong phản ứng chỉ ra sự có mặt của phân tử ADN từ cây ngô chuyển gen bao gồm sự kiện MON 87427 trong mẫu đã nêu.

10. Kit ADN bao gồm:

- a) cặp phân tử ADN bao gồm phân tử ADN thứ nhất và phân tử ADN thứ hai khác với phân tử ADN thứ nhất, trong đó mỗi phân tử ADN thứ nhất và thứ hai này bao gồm trình tự nucleotit có chiều dài vừa đủ bao gồm các nucleotit liền kề nêu trong SEQ ID NO: 10, hoặc trình tự bổ sung đầy đủ của nó, và trong đó phân tử ADN thứ nhất này có trong trình tự ADN đoạn chèn gen chuyển nêu trong SEQ ID NO: 10, và phân tử ADN thứ hai này có trong trình tự ADN hệ gen của cây ngô có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 10, có chức năng làm các đoạn mồi ADN khi được sử dụng đồng thời trong

phản ứng khuếch đại với ADN từ sự kiện MON 87427 để tạo ra sản phẩm khuếch đại (amplicon) để xác định ADN sự kiện MON 87427 của cây ngô chuyển gen trong mẫu, và trong đó sản phẩm khuếch đại (amplicon) này bao gồm các trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 2; hoặc

b) ít nhất một mẫu dò ADN xác định sự kiện MON 87427, trong đó mẫu dò ADN bao gồm trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 2.

11. Cây ngô tái tổ hợp, hạt, tế bào, hoặc bộ phận của cây này bao gồm trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 1 và SEQ ID NO: 2 và phân tử axit nucleic mã hóa CP4-EPSPS.

12. Cây ngô tái tổ hợp, hạt, tế bào, hoặc bộ phận của cây này theo điểm 11, trong đó cây, hạt, tế bào, hoặc bộ phận của cây này có khả năng chịu được việc xử lý bằng thuốc diệt cỏ glyphosat chọn lọc mô.

13. Cây ngô tái tổ hợp, hạt, tế bào, hoặc bộ phận của cây này theo điểm 11, trong đó hệ gen của nó tạo ra sản phẩm khuếch đại (amplicon) bao gồm phân tử ADN được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1-8 và SEQ ID NO: 10 khi được thử nghiệm trong phương pháp khuếch đại ADN.

14. Cây ngô hoặc hạt ngô bao gồm sự kiện MON 87427, mẫu hạt đại diện bao gồm sự kiện này đã được nộp lưu với số truy cập ATCC PTA-7899.

15. Cây ngô hoặc hạt ngô theo điểm 14, trong đó cây ngô hoặc hạt ngô này là thể lai có ít nhất một bố hoặc mẹ bao gồm sự kiện MON 87427.

16. Vật liệu thực vật không sống bao gồm trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 1 và SEQ ID NO: 2 và phân tử axit nucleic mã hóa CP4-EPSPS.

17. Vi sinh vật bao gồm trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 1 và SEQ ID NO: 2 và phân tử axit nucleic mã hóa CP4-EPSPS.

18. Vi sinh vật theo điểm 17, trong đó vi sinh vật này là tế bào thực vật.

19. Sản phẩm hàng hóa được tạo ra từ cây ngô chuyển gen bao gồm sự kiện MON 87427 và bao gồm phân tử ADN tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó việc phát hiện trình tự nucleotit này trong mẫu có nguồn gốc từ sản phẩm hàng hóa này xác định rằng sản phẩm hàng hóa này được tạo ra từ cây ngô chuyển gen bao gồm sự kiện MON 87427.

20. Sản phẩm hàng hóa theo điểm 19, trong đó sản phẩm hàng hóa này được chọn từ nhóm bao gồm hạt toàn phần hoặc đã được chế biến, thức ăn động vật, dầu, bột xay thô, bột, sản phẩm dạng vảy, cám, sinh khối và các sản phẩm nhiên liệu.

21. Phương pháp tạo ra sản phẩm hàng hóa theo điểm 19, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

a) thu cây ngô hoặc bộ phận của cây ngô bao gồm sự kiện MON 87427 của cây ngô chuyển gen; và

b) tạo ra sản phẩm hàng hóa từ cây ngô hoặc bộ phận của cây ngô này.

22. Phương pháp phòng trừ cỏ dại trên cánh đồng, trong đó phương pháp này bao gồm bước trồng cây ngô chuyển gen bao gồm sự kiện MON 87427 trên cánh đồng và dùng liều hữu hiệu thuốc diệt cỏ glyphosat để phòng trừ cỏ dại trên cánh đồng này mà không làm tổn thương cây ngô chuyển gen bao gồm sự kiện MON 87427 này.

23. Phương pháp theo điểm 22, trong đó liều hữu hiệu thuốc diệt cỏ glyphosat nằm trong khoảng từ 45,36 g (0,1 lb) đến khoảng 1,814 kg (4 lb) trên 4047 m² (1 ac).

24. Phương pháp tạo ra cây ngô chịu được việc dùng thuốc diệt cỏ glyphosat, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

a) lai hữu tính cây ngô chuyển gen bao gồm sự kiện MON 87427 bao gồm phân tử axit nucleic bao gồm một trình tự nucleotit được chọn từ nhóm gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 10 với cây ngô thứ hai, bằng cách đó tạo ra hạt;

b) thu gom hạt được tạo ra từ cây lai đã nêu;

c) cho hạt đã nêu sinh trưởng để tạo ra nhiều cây thế hệ con;

d) xử lý các cây thế hệ con này bằng glyphosat; và

e) chọn cây thế hệ con chịu được glyphosat.

25. Phương pháp tạo ra cây ngô chịu được việc dùng thuốc diệt cỏ glyphosat, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

a) tự thụ phấn cây ngô chuyển gen bao gồm sự kiện MON 87427 bao gồm phân tử axit nucleic bao gồm trình tự nucleotit được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1-8 và SEQ ID NO: 10, bằng cách đó tạo ra hạt;

- b) thu gom hạt được tạo ra từ cây tự thụ phấn này;
- c) cho hạt đã nêu sinh trưởng để tạo ra nhiều cây thế hệ con;
- d) xử lý các cây thế hệ con này bằng glyphosat; và
- e) chọn cây thế hệ con chịu được glyphosat.

26. Phương pháp tạo ra hạt ngô lai, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

- a) trồng hạt ngô chuyển gen bao gồm sự kiện MON 87427 trong một khu vực;
- b) cho hạt đã nêu sinh trưởng thành cây ngô;
- c) xử lý cây này bằng liều hữu hiệu thuốc diệt cỏ glyphosat trước khi tạo thành phần làm cho cây này mất khả năng sinh sản đực mà không làm tổn thương cây;
- d) thụ phấn cây này với phấn từ cây bố mẹ thứ hai; và
- e) thu hoạch hạt từ cây này, trong đó hạt này là hạt ngô lai được tạo ra bằng cách lai cây ngô chuyển gen bao gồm sự kiện MON 87427 với cây bố mẹ thứ hai.

27. Phương pháp theo điểm 26, trong đó liều hữu hiệu thuốc diệt cỏ glyphosat nằm trong khoảng từ 45,36 g (0,1 lb) đến khoảng 1,814 kg (4 lb) trên 4047 m² (1 ac).

28. Phương pháp theo điểm 26, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước trồng hạt của cây bố mẹ thứ hai trong khu vực đã nêu và cho cây ngô từ cây bố mẹ thứ hai đã nêu sinh trưởng.

29. Phương pháp theo điểm 28, trong đó cây bố mẹ thứ hai này có khả năng chịu glyphosat.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

- <110> Monsanto Technology LLC
 Feng, Paul C.C.
 Fonseca, Agustin E.
 Garnaat, Carl W
 Heredia, Oscar
 Huang, Jintai
 Kelly, Rebecca A
 Qi, Youlin
 Stoecker, Martin A
- <120> PHÂN TỬ ADN TÁI TỔ HỢP TỪ CÂY NGÔ CHUYỂN GEN BAO GỒM SỰ KIẾN MON
 87427, PHƯƠNG PHÁP VÀ KIT PHÁT HIỆN SỰ CỐ MẶT CỦA PHÂN TỬ ADN NÀY
- <130> 38-21(56887)
- <140> US ##/###,###
 <141> 2010-##-##
- <150> US 61/263,526
 <151> 2009-11-23
- <150> US 61/263,530
 <151> 2009-11-23
- <160> 19
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
- <220>
 <223> Trình tự ADN nhân tạo bao gồm trình tự hệ gen ngô và trình tự
 gen chuyển
- <400> 1
 aatcgggaca atatggagaa
 20
- <210> 2
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
- <220>
 <223> trình tự ADN nhân tạo bao gồm trình tự hệ gen ngô và
 trình tự gen chuyển
- <400> 2
 catgcaagtt gcaacgcggc
- <210> 3
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự ADN nhân tạo bao gồm trình tự hệ gen ngô và trình tự gen chuyển

<400> 3

cggtcgggtc aaatgtagaa aatcgggaca atatggagaa aaagaaagag taattaccaa
60

<210> 4

<211> 60

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự ADN nhân tạo bao gồm trình tự hệ gen ngô và trình tự gen chuyển

<400> 4

tatcagcttg ttggaagtta catgcaagtt gcaacgcggc agccgccagc ggcgcggagc 60

<210> 5

<211> 100

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự ADN nhân tạo bao gồm trình tự hệ gen ngô và trình tự gen chuyển

<400> 5

ttttttcgtta aatacggaaa cggtcgggtc aaatgtagaa aatcgggaca atatggagaa 60

aaagaaagag taattaccaa tatggagaaa accgggaaat 100

<210> 6

<211> 100

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự ADN nhân tạo bao gồm trình tự hệ gen ngô và trình tự gen chuyển

<400> 6

ttcccgctt cagtttaaac tatcagcttg ttggaagtta catgcaagtt gcaacgcggc 60

agccgccagc ggcgcggagc gacgaaacga aacgtgcgcg 100

<210> 7

<211> 972

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự ADN nhân tạo bao gồm trình tự hệ gen ngô và trình tự gen chuyển

<400> 7

tagttaggggt tatgtgggca aataccgact ttgcccctga ggggtctcac atctctatat	60
aaggaacctg tacatccctt cataatacag agatcagaaa gaggccagag gcccaaccct	120
atatccagtg tctcgtgtgt ttcttctgtc gtgcttatga aaagggagac gggttctcta	180
catcttcttg cgcctctact gctgacggga gggaagggag cggatctggg gatccgtggg	240
aacgtagttc tcaacactag aaataaaaga agtaggcca gatgaactgg gcctcttgct	300
gggcccccaa gtctctgacg cagaaacgac ctcccaccgt tccgcgccgt caggccagtt	360
cagattcaga catagggatg aaaacagacg gaaacggacg gaaaaacccc tctcctgttt	420
ccgtatccgc attttatcat cggaaacggg atcagggtccg gaatagtcgg gaacggaaac	480
gggagcggga taaacggaat tgcgaaaacg aacggaaaca gaaatactaa cggaaagtca	540
taatttaata taaatagaaa tggtattgat gtttgactag tgattgattg acagaacaat	600
aacataaaac aaatagatat agagagacaa cattctattg ttgtttgggt gctaaatgtg	660
tacatttagc tacatccgat gttgtttaag acttttagatc acctgtcatt tgaaaacagc	720
cgggtggttat aatgacaaat tatgctataa tttgtcacct aaatacacga ggatttagtt	780
tatatactaa tgcataattag ctcggtcccat atttgtcaaa tacggaataa atacgggttc	840
aatccggaaa aaaacgggat ctcgcaaaaa cggacggaat aagtcctctc ccgtttccgt	900
cccattttca tattttttcg taaatacggg aacggtcggg tcaaatgtag aaaatcggga	960
caatatggag aa	972

<210> 8

<211> 1078

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự ADN nhân tạo bao gồm trình tự hệ gen ngô và trình tự gen chuyển

<400> 8

catgcaagtt gcaacgcggc agccgccagc ggcgcggagc gacgaaacga aacgtgcgcg	60
cggctgggtcc tagagggggcg gttgcaactt gcatgtaact tccacgcgac cgcaggcgtg	120
cgtgcgtcac gactcgcgtc gtagcctctc gtcaactcgcg ttccggcttcc gctcgggggc	180
gcgaatcttc tcgacccatc gaggaagaa acccaagcct aatccgaccc gccatggctt	240
tccttgcttg ctcccccccc ccttatcttc ccgcgggtag tatataatca tccctccgc	300
cgggctcgtt tccttgcgca accatccaat ccaatcgaac caccagtcca ccacctgatt	360
gactagagca aaagcacaag ccgcccacgc atctcgattg cagcagcagc agcagcagca	420

gaagcggcgc gcagagctcg tgacgagagc aaccttcctt ccgttcctcg atcgccatgg 480
 acaaggtgct agccttctcg atcctgagcg cgtcgccggc cgacctctcc tccgcggggc 540
 ccggcttcgg cgggagctgg gcgcggctgt cgtggcggag gggcgcggac gaccagcgtg 600
 cgccgcggcg ggagcagcag cagcggcagg aggaggagga cagggagaag cgagacccgc 660
 gctcccgcga cggcggcgcg cacgcgagcg gagggggagc ggcggcggcg ccgccgccac 720
 cgcggttcgc gccggagttt gacgggatcg actggttcgg aaccatcgtg tcgcgctgat 780
 caacaatccg ggctcggccg acgcgcccc cgagttaacc acgtgaccaa tcctgtctac 840
 tggagtatgt tttttacctg atggtggatt aattgtccca acacagataa ttgggactcc 900
 gcgtgttgta catacaggga actgctcact tatcaggggg ggatggggaa catttatttg 960
 ttctgtcct ctgcattttt tttcctgtac cgaaatggat ggatgggtctc caattcgaaa 1020
 ccgagtcctg cagctccagg taatctgccg gtggatgaac ccaagccgaa ctgtcccc 1078

<210> 9

<211> 3746

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự ADN nhân tạo bao gồm trình tự hệ gen ngô và trình tự gen chuyển

<400> 9

atatggagaa aaagaaagag taattaccaa tatggagaaa accgggaaat ctacatggat 60
 cagcaatgag tatgatggtc aatatggaga aaaagaaaga gtaattacca attttttttc 120
 aattcaaaaa tgtagatgtc cgcagcgtta ttataaaatg aaagtacatt ttgataaaac 180
 gacaaattac gatccgtcgt atttataggc gaaagcaata aacaaattat tctaattcgg 240
 aaatctttat ttcgacgtgt ctacattcac gtccaaatgg gggcttagat gagaaacttc 300
 acgatcgatg cggccgcggt aacaagcttc tgcaggtccg attgagactt ttcaacaaag 360
 ggtaatatcc ggaaacctcc tcggattcca ttgccagct atctgtcact ttattgtgaa 420
 gatagtggaa aaggaagggt gtcctacaa atgccatcat tgcgataaag gaaaggccat 480
 cgttgaagat gcctctgccg acagtgggtc caaagatgga cccccacca cgaggagcat 540
 cgtggaaaaa gaagacgttc caaccacgtc ttcaaagcaa gtggattgat gtgatgggtc 600
 gattgagact tttcaacaaa gggtaatatc cggaacctc ctcggtattcc attgccagc 660
 tatctgtcac tttattgtga agatagtgga aaaggaagggt ggctcctaca aatgccatca 720
 ttgcgataaa ggaaaggcca tcgttgaaga tgcctctgcc gacagtgggtc ccaagatgg 780
 acccccaccc acgaggagca tcgtggaaaa agaagacgtt ccaaccacgt cttcaaagca 840

agtggattga tgtgatatct ccactgacgt aagggatgac gcacaatccc actatccttc 900
 gcaagaccct tcctctatat aaggaagttc atttcatttg gagaggacac gctgacaagc 960
 tgactctagc agatctaccg tcttcggtac gcgctcactc cgccctctgc ctttgttact 1020
 gccacgtttc tctgaatgct ctcttggtg gtgattgctg agagtggttt agctggatct 1080
 agaattacac tctgaaatcg tgttctgcct gtgctgatta cttgccgtcc tttgtagcag 1140
 caaaatatag ggacatggta gtacgaaacg aagatagaac ctacacagca atacgagaaa 1200
 tgtgtaattt ggtgcttagc ggtatttatt taagcacatg ttggtgttat agggcacttg 1260
 gattcagaag tttgctgtta atttaggcac aggcttcata ctacatgggt caatagtata 1320
 gggattcata ttataggcga tactataata atttgttcgt ctgcagagct tattatttgc 1380
 caaaattaga tattcctatt ctgtttttgt ttgtgtgctg ttaaattggt aacgcctgaa 1440
 ggaataaata taaatgacga aattttgatg tttatctctg ctcttttatt gtgaccataa 1500
 gtcaagatca gatgcacttg ttttaaata tgttgtctga agaaataagt actgacagta 1560
 ttttgatgca ttgatctgct tgtttgttgt aacaaaattt aaaaataaag agtttccttt 1620
 ttgttgctct ccttacctcc tgatggtatc tagtatctac caactgacac tatattgctt 1680
 ctctttacat acgtatcttg ctcgatgcct tctccctagt gttgaccagt gttactcaca 1740
 tagtctttgc tcatttcatt gtaatgcaga taccaagcgg cctctagagg atccaggagc 1800
 aaccatggcg caagtttagca gaatctgcaa tgggtgtgcag aaccatctc ttatctccaa 1860
 tctctcgaaa tccagtcaac gcaaactctc cttatcggtt tctctgaaga cgcagcagca 1920
 tccacgagct tatccgattt cgtcgtcgtg gggattgaag aagagtggga tgacgttaat 1980
 tggctctgag cttcgtctc ttaaggatcat gtcttctgtt tccacggcgt gcatgctaca 2040
 cgggtgcaagc agccggccgg caaccgctcg caaatcttcc ggcctttcgg gaacggctcag 2100
 gattccgggc gataagtcca tatcccaccg gtcgttcatg ttccggcggtc ttgccagcgg 2160
 tgagacgcgc atcacgggcc tgcttgaagg tgaggacgtg atcaataccg ggaaggccat 2220
 gcaggctatg ggagcgcgta tccgcaagga aggtgacaca tggatcattg acggcggttg 2280
 gaatggcggc ctgctcgccc ctgaggcccc tctcgacttc ggcaatgcgg cgacgggctg 2340
 caggctcact atgggactgg tcgggggtgta cgacttcgat agcacgttca tcggagacgc 2400
 ctgctcaca aagcgcccaa tgggccgcgt tctgaacctg ttgcgcgaga tgggcgtaca 2460
 ggtcaaatac gaggatgggt accgtttgcc cgttacgctg cgcgggccga agacgcctac 2520
 cccgattacc taccgcgtgc caatggcatc cgcccaggtc aagtcagccg tgctcctcgc 2580
 cggactgaac actccgggca tcaccacggg gatcgagccc atcatgacca gggatcatac 2640
 cgaaaagatg cttcaggggt ttggcgccaa cctgacggtc gagacggacg ctgacggcgt 2700

caggaccatc cgccttgagg gcaggggtaa actgactggc caagtcacgc atgttccggg 2760
 agaccgcgcg tccacggcct tcccgttggt tgcggcgctg ctcgtgccgg ggagtgcagt 2820
 gaccatcctg aacgtcctca tgaacccgac caggaccggc ctgatcctca cgcttcagga 2880
 gatgggagcc gacatcgagg tgatcaaccc gcgcctggca ggcggtgaag acgttgcgga 2940
 tctgcgcgtg cgctcctcta ccctgaaggg cgtgacggtc ccggaagatc gcgcgccgtc 3000
 catgatagac gagtatccta ttctggccgt cgcgcgtgcg ttcgccgaag gggccacggc 3060
 catgaacggc cttgaggaac tccgcgtgaa ggaatcggat cgcctgtcgg cgggtggccaa 3120
 tggcctgaag ctcaacggcg ttgactgcga cgaggggtgag acctcactcg tggctcgtgg 3180
 ccggcctgat ggcaagggcc tcggcaacgc cagtggagcg gccgtcgcca cgcacctcga 3240
 tcatcgcatc gcgatgtcct tcttggtgat ggggtctcgtc tcagagaacc cggtgaccgt 3300
 cgatgacgcc acgatgatag cgacgagctt cccagagttc atggatctga tggcgggcct 3360
 cggggccaag atcgaactgt ctgacacgaa ggccgcttga attcccgatc gttcaaaccat 3420
 ttggcaataa agtttcttaa gattgaatcc tgttgccggc cttgcgatga ttatcatata 3480
 atttctgttg aattacgtta agcatgtaat aattaacatg taatgcatga cgttatttat 3540
 gagatggggt tttatgatta gagtcccgca attatacatt taatacgca tagaaaacaa 3600
 aatatagcgc gcaactagg ataaattatc gcgcgcggcg tcactctatgt tactagatcg 3660
 gggatatccc cagcttgatg gggatcagat tgtcgtttcc cgccttcagt ttaaaactatc 3720
 agcttggttg aagttacatg caagtt 3746

<210> 10

<211> 5776

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự ADN nhân tạo bao gồm trình tự hệ gen ngô và trình tự gen chuyển

<400> 10

tagttagggt tatgtgggca aataccgact ttgcccctga ggggtctcac atctctatat 60
 aaggaacctg tacatccctt cataatacag agatcagaaa gagggcagag gcccaaccct 120
 atatccagtg tctcgtgtgt ttcttctgtc gtgcttatga aaaggagac gggttctcta 180
 catcttcttg cgcctctact gctgacggga ggggaaggag cggatctggg gatccgtggg 240
 aacgtagtgc tcaacactag aaataaaaga agtaggcaa gatgaactgg gcctcttgct 300
 gggcccccaa gtctctgacg cagaaacgac ctcccaccgt tccgcgccgt caggccagtt 360
 cagattcaga catagggatg aaaacagacg gaaacggacg gaaaaacccc tctcctgttt 420

ccgtatccgc	atTTTTatcat	cggaaacggg	atcaggtccg	gaatagtcgg	gaacggaaac	480
gggagcggga	taaacggaat	tgCGaaaacg	aacggaaaca	gaaataactaa	cggaaagtca	540
taattttaata	taaatagaaa	tgTtattgat	gtttgactag	tgattgattg	acagaacaat	600
aacataaaac	aaatagatat	agagagacaa	cattctattg	ttgtttgggt	gctaaatgtg	660
tacatttagc	tacatccgat	gttgtttaag	acttttagatc	acctgtcatt	tgaaaacagc	720
cggTgggttat	aatgacaaat	tatgctataa	tttgtcacct	aaatacacga	ggatttagtt	780
tataactaa	tgcatattag	ctcgtcccat	atttgtcaaa	tacggaataa	atacgggttc	840
aatccggaaa	aaaacgggat	ctcgcaaaaa	cggacggaat	aagtccctctc	ccgtttccgt	900
cccattttca	tatTTTTtctg	taaatacggg	aacggtcggg	tcaaatgtag	aaaatcggga	960
caatatggag	aaaaagaaag	agtaattacc	aatatggaga	aaaccgggaa	atctacatgg	1020
atcagcaatg	agtatgatgg	tcaatatgga	gaaaaagaaa	gagtaattac	caatTTTTtt	1080
tcaattcaaa	aatgtagatg	tccgcagcgt	tattataaaa	tgaaagtaca	ttttgataaa	1140
acgacaaatt	acgatccgtc	gtatttatag	gcgaaagcaa	taaacaaatt	attctaattc	1200
ggaaatcttt	atttcgacgt	gtctacattc	acgtccaaat	gggggcttag	atgagaaact	1260
tcacgatcga	tgcggccgcg	ttaacaagct	tctgcaggtc	cgattgagac	ttttcaacaa	1320
agggtaatat	ccggaaacct	cctcggattc	cattgcccag	ctatctgtca	ctttattgtg	1380
aagatagtgg	aaaaggaagg	tggctcctac	aaatgccatc	attgcgataa	aggaaaggcc	1440
atcgTtgaag	atgcctctgc	cgacagtggT	cccaaagatg	gacccccacc	cacgaggagc	1500
atcgTggaaa	aagaagacgt	tccaaccacg	tcttcaaagc	aagtggattg	atgtgatggT	1560
ccgattgaga	cttttcaaca	aagggtaat	tccggaaacc	tcctcggatt	ccattgcccc	1620
gctatctgtc	actttattgt	gaagatagtg	gaaaaggaag	gtggctccta	caaatgccat	1680
cattgcgata	aaggaaaggc	catcgTtgaa	gatgcctctg	ccgacagtgg	tcccaaagat	1740
ggacccccac	ccacgaggag	catcgTggaa	aaagaagacg	ttccaaccac	gtcttcaaag	1800
caagtggatt	gatgtgatat	ctccactgac	gtaagggatg	acgcacaatc	ccactatcct	1860
tcgcaagacc	cttcctctat	ataaggaagt	tcatttcatt	tgagaggagc	acgctgacaa	1920
gctgactcta	gcagatctac	cgtcttcggT	acgcgctcac	tcgcctctct	gcctttgtta	1980
ctgccacgtt	tctctgaatg	ctctcttTgtg	tggtgattgc	tgagagtggT	ttagctggat	2040
ctagaattac	actctgaaat	cgtgttctgc	ctgtgctgat	tacttgccgt	cctttgtagc	2100
agcaaaatat	agggacatgg	tagtacgaaa	cgaagataga	acctacacag	caatacgaga	2160
aatgtgtaat	ttggTgctta	gcggtattta	tttaagcaca	tgTtggtgtt	atagggcact	2220

tggattcaga	agtttgctgt	taatttaggc	acaggcttca	tactacatgg	gtcaatagta	2280
tagggattca	tattataggc	gatactataa	taatttgttc	gtctgcagag	cttattattt	2340
gccaaaatta	gatattccta	ttctgttttt	gtttgtgtgc	tgttaaattg	ttaacgcctg	2400
aaggaataaa	tataaatgac	gaaattttga	tgtttatctc	tgctccttta	ttgtgaccat	2460
aagtcaagat	cagatgcact	tgttttaaat	attgttgtct	gaagaaataa	gtactgacag	2520
tattttgatg	cattgatctg	cttgtttggt	gtaacaaaat	ttaaaaataa	agagtttctt	2580
ttttgttgct	ctccttacct	cctgatggta	tctagtatct	accaactgac	actatattgc	2640
ttctctttac	atacgtatct	tgctcgatgc	cttctcccta	gtgttgacca	gtgttactca	2700
catagtcttt	gctcatttca	ttgtaatgca	gataccaagc	ggcctctaga	ggatccagga	2760
gcaaccatgg	cgcaagttag	cagaatctgc	aatgggtgtc	agaacccatc	tcttatctcc	2820
aatctctcga	aatccagtca	acgcaaactc	cccttatcgg	tttctctgaa	gacgcagcag	2880
catccacgag	cttatccgat	ttcgtcgtcg	tggggattga	agaagagtgg	gatgacgtta	2940
attggctctg	agcttcgtcc	tcttaaggtc	atgtcttctg	tttccacggc	gtgcatgcta	3000
cacggtgcaa	gcagccggcc	ggcaaccgct	cgcaaactct	ccggcctttc	gggaacggtc	3060
aggattccgg	gcgataagtc	catatcccac	cggtcgttca	tgttcggcgg	tcttgccagc	3120
ggtgagacgc	gcatcacggg	cctgcttgaa	ggtgaggacg	tgatcaatac	cgggaaggcc	3180
atgcaggcta	tgggagcgcg	tatccgcaag	gaaggtgaca	catggatcat	tgacggcggt	3240
gggaatggcg	gtctgctcgc	ccctgaggcc	cctctcgact	tcggcaatgc	ggcgacgggc	3300
tgcaggctca	ctatgggact	ggtcgggggt	tacgacttcg	atagcacggt	catcgagac	3360
gcctcgctca	caaagcgccc	aatgggcccgc	gttctgaacc	cgttgcgcgga	gatgggcgta	3420
cagggtcaaat	ccgaggatgg	tgaccgtttg	cccgttacgc	tgcgcgggcc	gaagacgcct	3480
accccgatta	cctaccgcgt	gccaatggca	tccgcccagg	tcaagtcagc	cgtgctcctc	3540
gccggactga	acactccggg	catcaccacg	gtgatcgagc	ccatcatgac	cagggatcat	3600
accgaaaaga	tgcttcaggg	gtttggcgcc	aacctgacgg	tcgagacgga	cgctgacggc	3660
gtcaggacca	tccgccttga	gggcaggggt	aaactgactg	gccaaagtc	cgatgttccg	3720
ggagaccctg	cgtccacggc	cttcccgttg	gttgcgggcg	tgctcggtgc	ggggagtgc	3780
gtgaccatcc	tgaacgtcct	catgaaccgc	accaggaccg	gcctgatcct	cacgcttcag	3840
gagatgggag	ccgacatcga	ggtgatcaac	ccgcgcctgg	caggcggtga	agacggttgcg	3900
gatctgcgcg	tgcgctcctc	taccctgaag	ggcgtgacgg	tcccgggaaga	tcgcgcgcgcg	3960
tccatgatag	acgagtatcc	tattctggcc	gtcgccgctg	cgttcgccga	agggggccacg	4020
gtcatgaacg	gtcttgagga	actccgcgtg	aaggaatcgg	atcgccgtgc	ggcgggtggcc	4080

aatggcctga agctcaacgg tgttgactgc gacgaggggtg agacctcaact cgtgggtccgt 4140
ggccggcctg atggcaaggg cctcggcaac gccagtggag cggccgtcgc cacgcacctc 4200
gatcatcgca tcgcatgtc cttcttggtg atgggtctcg tctcagagaa cccggtgacc 4260
gtcgatgacg ccacgatgat agcgacgagc ttcccagagt tcatggatct gatggcgggc 4320
ctcggggcca agatcgaact gtctgacacg aaggccgctt gaattcccga tcgttcaaac 4380
atltggcaat aaagtcttctt aagattgaat cctgttgccg gtcttgcat gattatcata 4440
taatttctgt tgaattacgt taagcatgta ataattaaca tgtaatgcat gacgttattt 4500
atgagatggg tttttatgat tagagtcccg caattataca tttaatacgc gatagaaaac 4560
aaaatatagc gcgcaaacta ggataaatta tcgcgcgcggtg tgctcatctat gttactagat 4620
cggggatatac cccagcttga tggggatcag attgtcgttt cccgccttca gtttaaacata 4680
tcagcttggtt ggaagttaca tgcaagttgc aacgcggcag ccgccagcgg cgcgagcgga 4740
cgaaacgaaa cgtgcgcgcg gctggctcta gaggggagggt tgcaacttgc atgtaacttc 4800
cacgcgaccg caggcgtgcg tgcgtcacga ctgcgctcgt agcctctcgt cactcgcgtt 4860
cggcttccgc tcggggggcg gaatcttctc gacccatcga ggcaagaaac ccaagcctaa 4920
tccgacccgc catggctttc cttgcttgct ccccccccc ttatcttccc gcgggtagta 4980
tataatcatc ccctccgccc ggctcgcttc cttgcgcaac catccaatcc aatcgaacca 5040
ccagtccacc acctgattga ctagagcaaa agcacaagcc gccacgcat ctcgattgca 5100
gcagcagcag cagcagcaga agcggcgcg agagctcgtg acgagagcaa ccttccttcc 5160
gttcctcgat cgccatggac aagggtgctag ccttctcgat cctgagcgcg tcgccggccg 5220
acctctctc cgcgggcgcc ggcttcggcg ggagctgggc gcggctgtcg tggcggaggg 5280
gcgcggacga ccagcgtgcg ccgcggcggg agcagcagca gcggcaggag gaggaggaca 5340
gggagaagcg agaccgcgcg tccgcgcagc gcggcgcgca cgcgagcgga gggggagcgg 5400
cggcgggcgcc gccgccaccg cggttcgcgc cggagtttga cgggatcgac tggttcggaa 5460
ccatcgtgtc gcgctgatca acaatccggg ctcggccgac gcgccccccg agttaaccac 5520
gtgaccaatc ctgtctactg gagtatgttt ttacctgat ggtggattaa ttgtcccaac 5580
acagataatt gggactccgc gtgttgatca tacagggaac tgctcactta tcaggggggg 5640
atggggaaca tttatltgtt cctgtcctct gcattttttt tcctgtaccg aaatggatgg 5700
atggtctcca attcgaaacc gagtcctgca gctccaggta atctgccggg ggatgaacct 5760
aagccgaact gtcccg 5776

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

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

<400> 11
 ggcaaccgct cgcaaat

17

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

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

<400> 12
 atcgcccgga atcctga

17

<210> 13
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

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

<400> 13
 ttccggcctt tcgggaa

17

<210> 14
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

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

<400> 14
 gcctgccgca gaccaa

16

<210> 15
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

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

<400> 15
 caatgcagag ctcagcttca tc

22

<210> 16
 <211> 26

<212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

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

<400> 16
 tccagtacgt gcagtcctc ctccct

26

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

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

<400> 17
 cggaaacggt cgggtca

17

<210> 18
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

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

<400> 18
 ctccatattg accatcatatc tcattgc

27

<210> 19
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

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

<400> 19
 aatgtagaaa atcgggacaa t

21

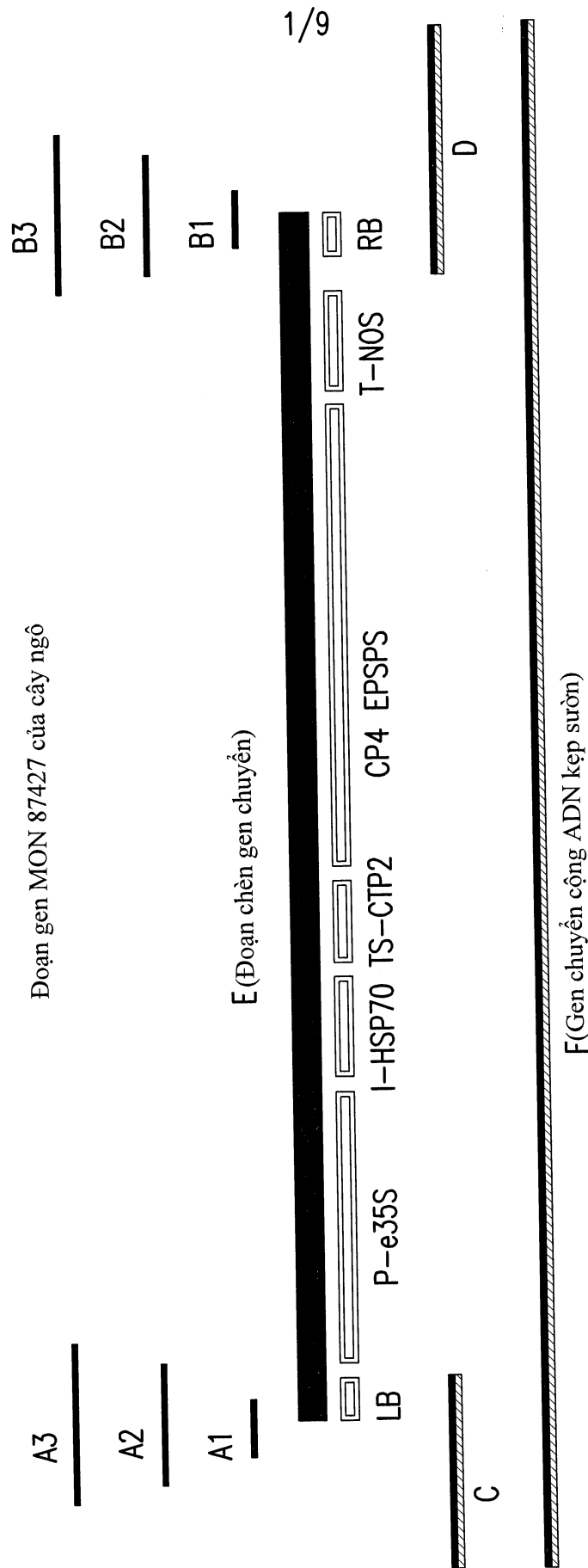


FIG.1

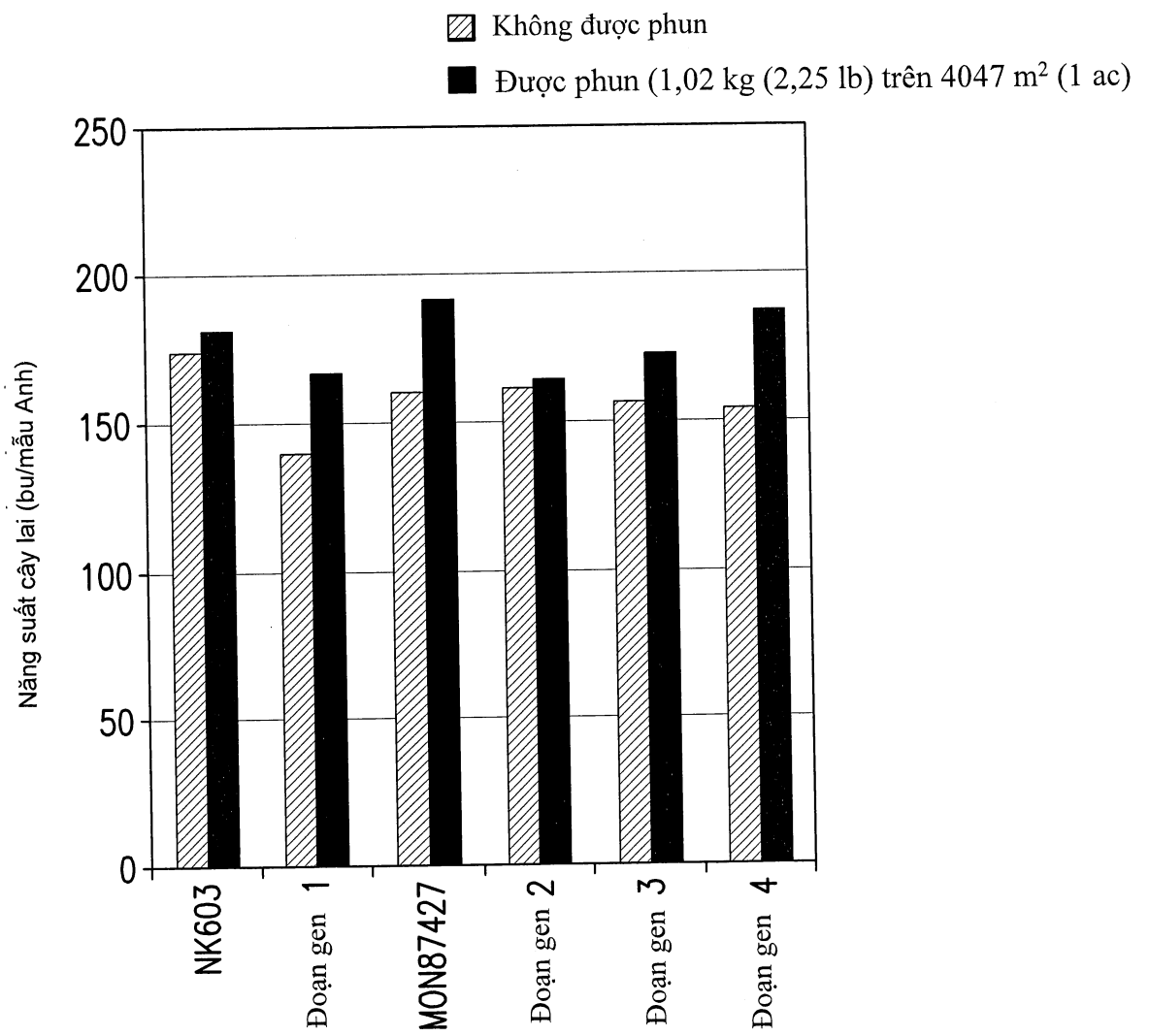


FIG.2

3/9

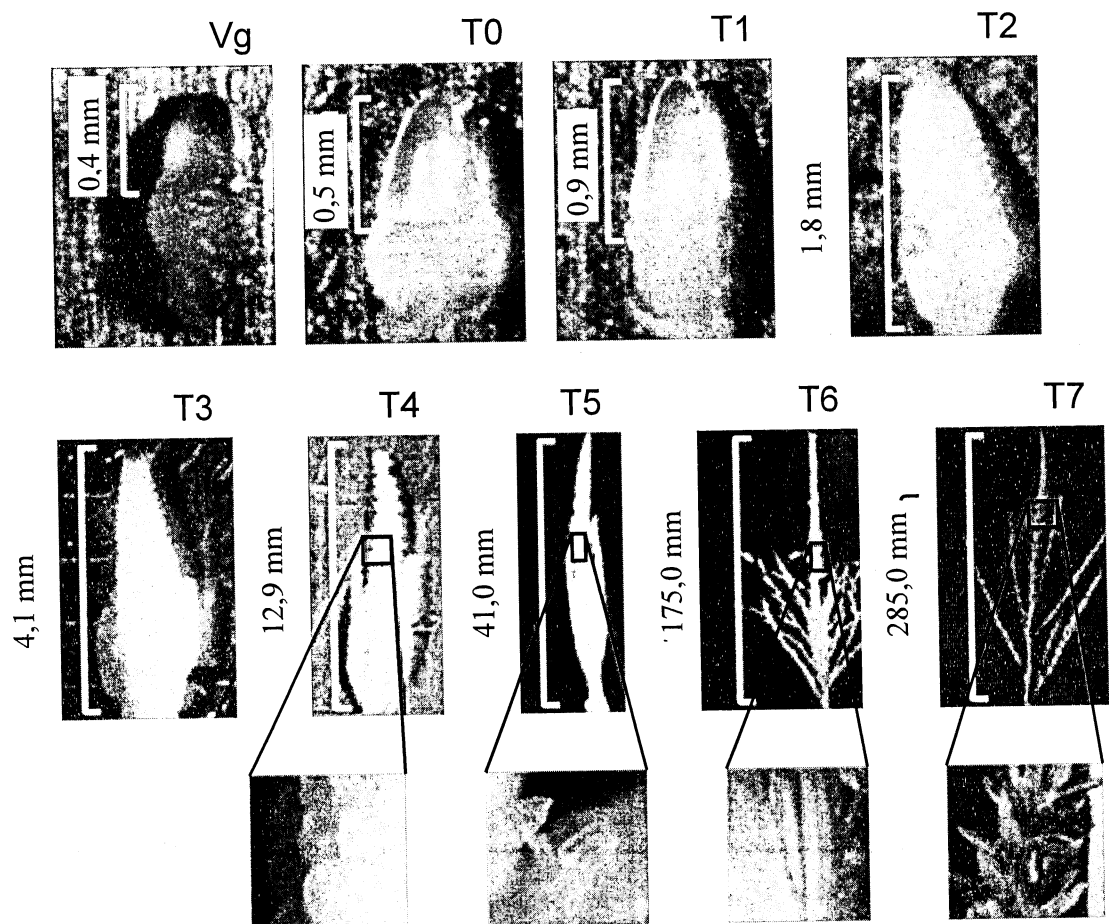
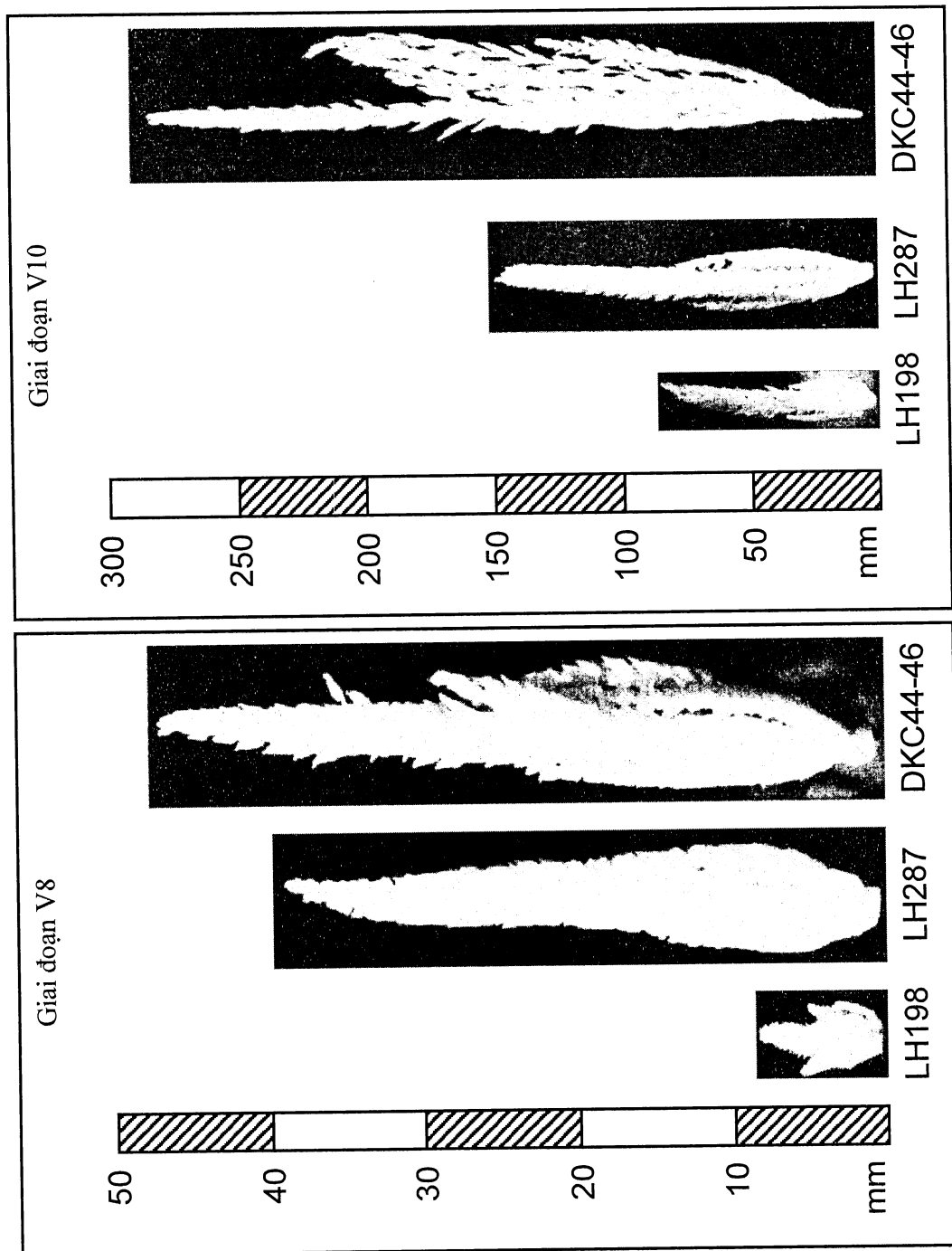


FIG.3



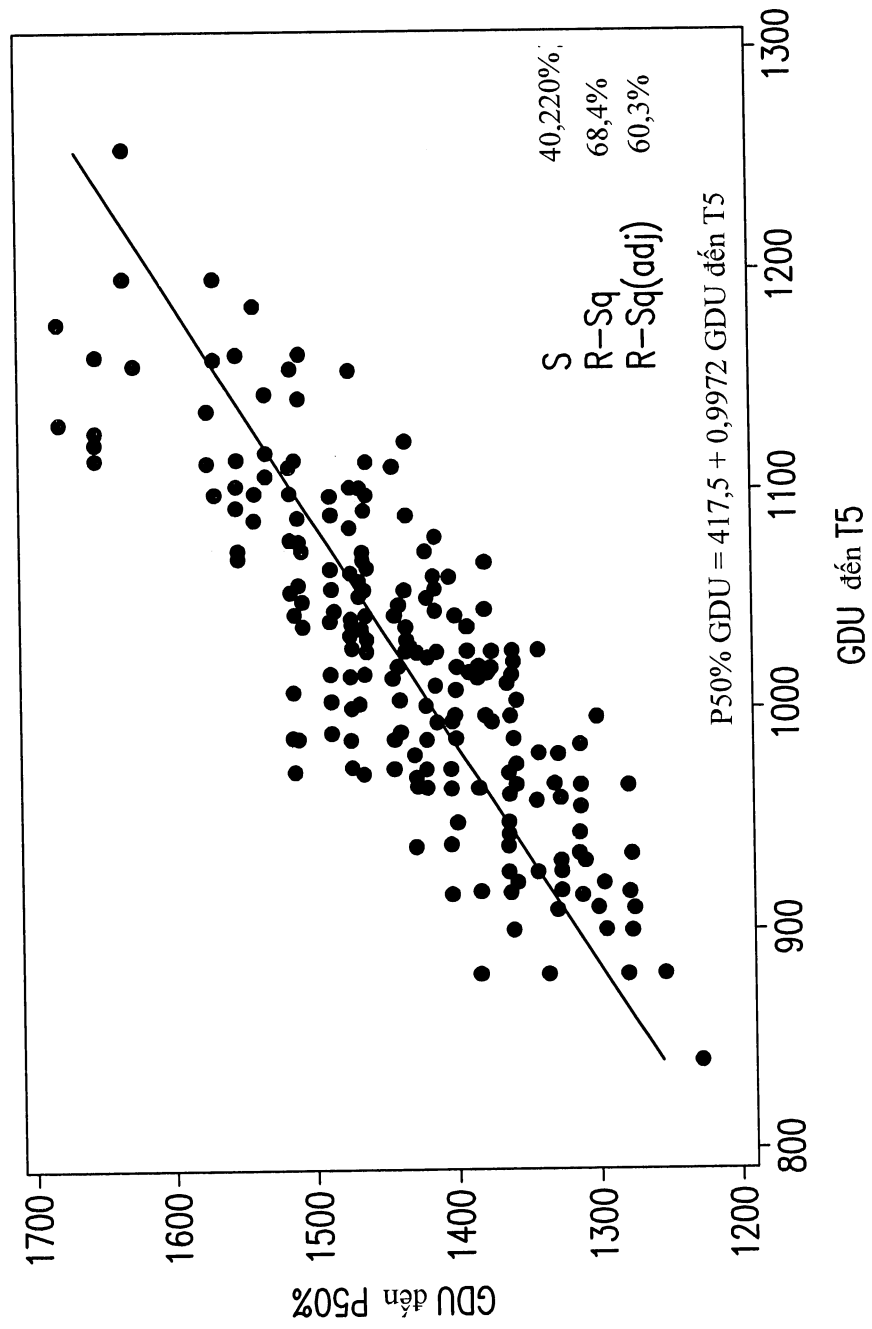


FIG.5

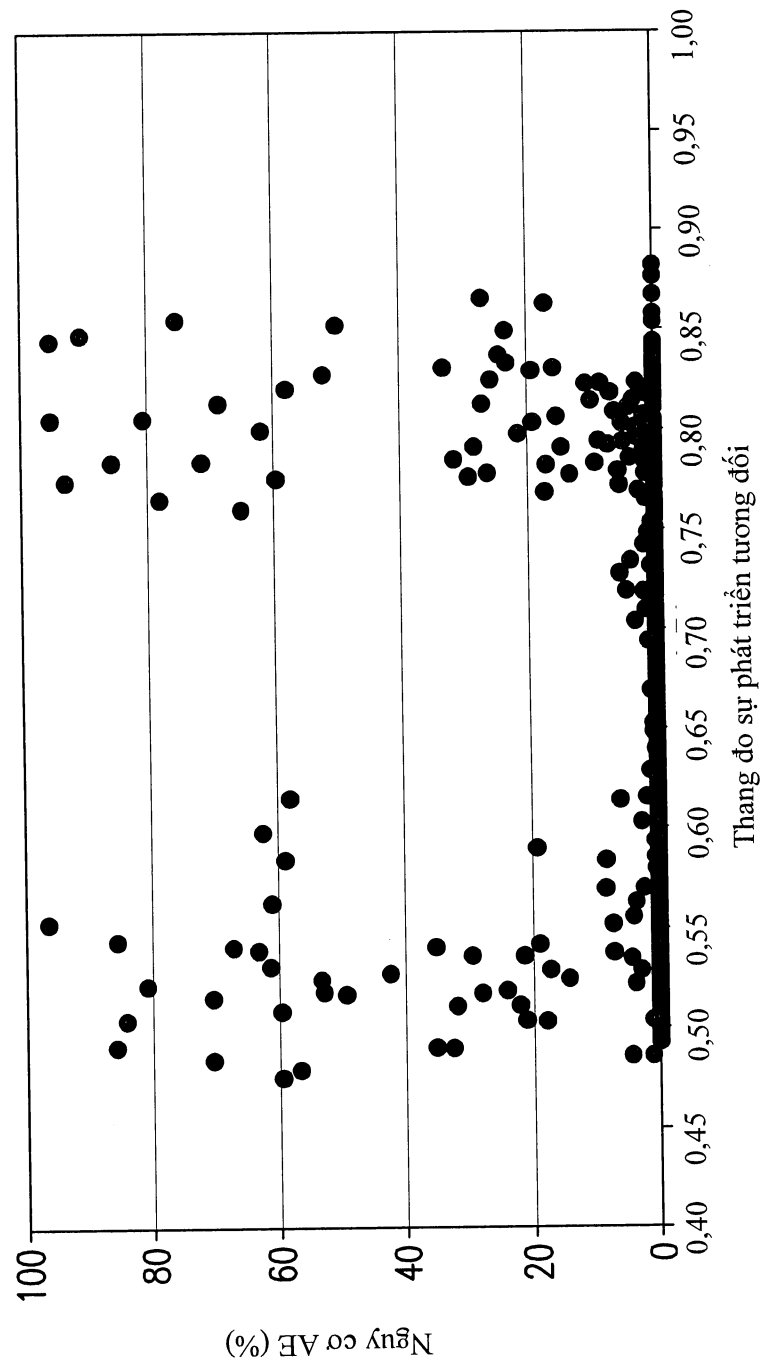


FIG.6

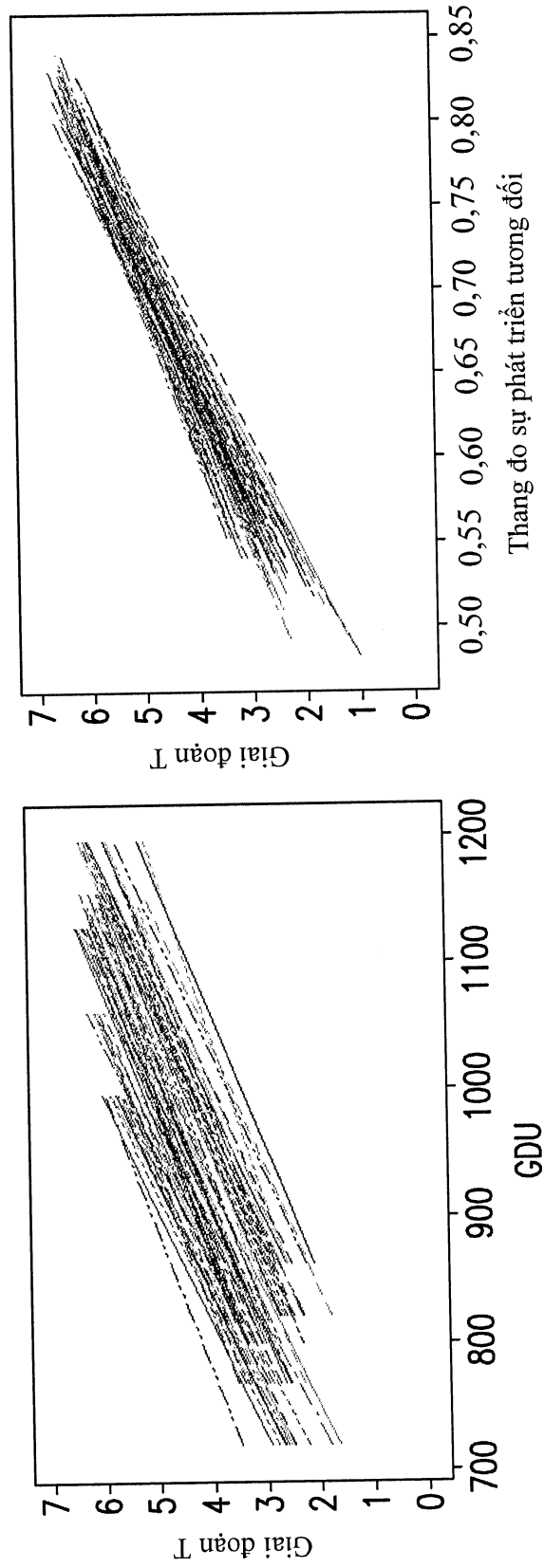


FIG.7

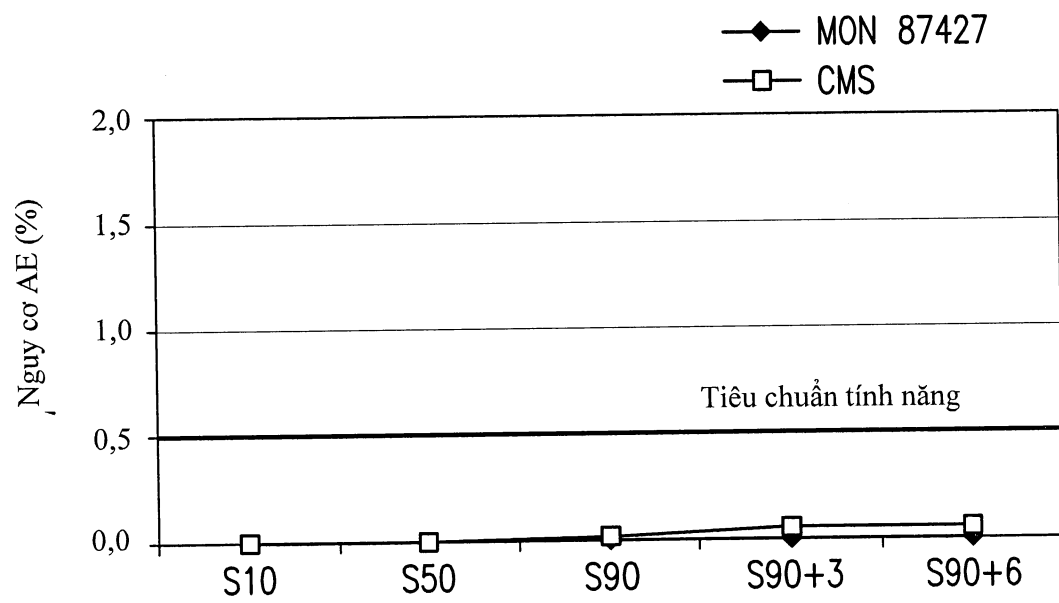


FIG.8

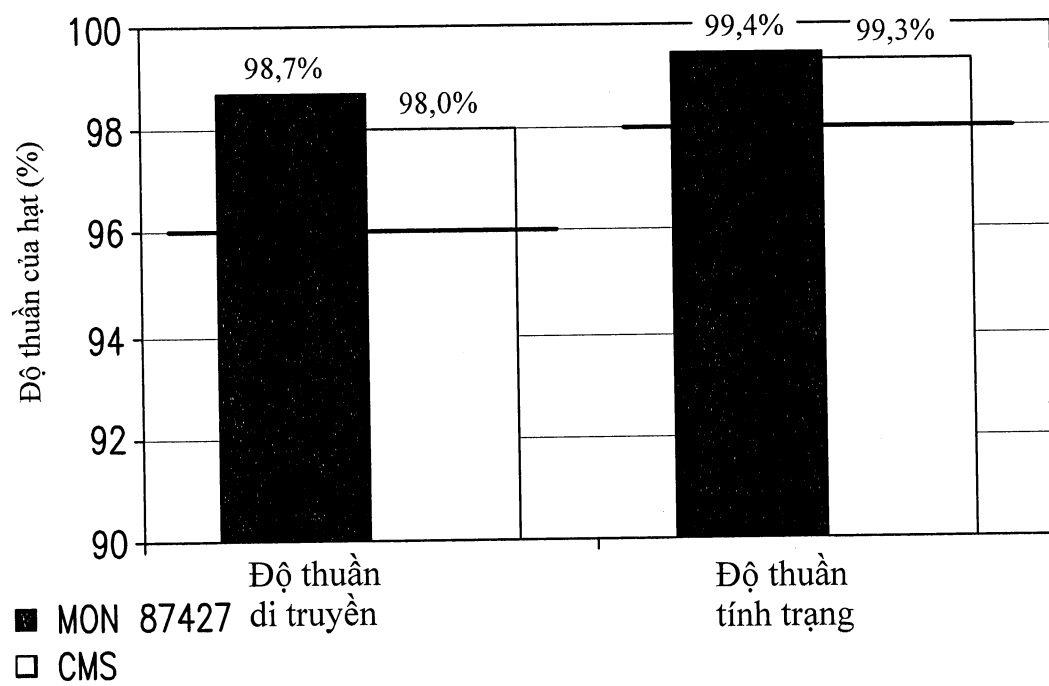


FIG.9