



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

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

(11)



1-0031177

(51)⁷ A01H 5/02; C12N 15/82

(13) B

(21) 1-2017-01910

(22) 24/11/2015

(86) PCT/IL2015/051140 24/11/2015

(87) WO 2016/084077 A1 02/06/2016

(30) 62/083,912 25/11/2014 US

(45) 25/02/2022 407

(43) 25/07/2017 352A

(73) YISSUM RESEARCH DEVELOPMENT COMPANY OF THE HEBREW
UNIVERSITY OF JERUSALEM LTD. (IL)

POB 39135, Hi Tech Park, Edmond J. Safra Campus, Givat Ram, 91390 Jerusalem,
Israel

(72) AMRAD, Avichai (IL); BANDEL, Kfir (IL); PLEBAN, Tzili (IL); ZAMIR, Dani
(IL).

(74) Công ty Luật TNHH WINCO (WINCO LAW FIRM)

(54) CÂY HOA CÁT TƯỜNG (EUSTOMA GRANDIFLORUM) CÓ QUÁ TRÌNH
XUÂN HÓA ĐỘC LẬP VÀ PHƯƠNG PHÁP TẠO RA CÂY NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến cây hoa cát tường (*Eustoma grandiflorum*) mà không cần phải có
quá trình xử lý lạnh (quá trình xuân hoá) để gây ra sự kết trái sớm và ra hoa và còn đề cập
đến các phương tiện và phương pháp tạo ra cây này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến cây hoa cát tường (*Eustoma grandiflorum*) mà không cần phải có quá trình xử lý lạnh (quá trình xuân hoá) để gây ra sự kết trái sớm và ra hoa và đến các phương tiện và phương pháp tạo ra cây này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Cây hoa cát tường, *Eustoma grandiflorum* thuộc họ *Gentianaceae*, là cây hoa tương đối mới đối với thị trường quốc tế, được sử dụng một cách rộng rãi làm hoa cắt cành và cả làm cây trồng trong chậu. Tên gọi chung đối với cây có trong tự nhiên là cây hoa chuông Texas, cây hoa hồng thảo nguyên và cây hoa long đờm thảo nguyên. Cây hoa cát tường là sinh vật lưỡng bội có khả năng tự thụ phấn hoặc thụ phấn chéo và hầu hết tất cả hạt có bán trên thị trường đều là thế hệ lai F₁. Các loài *E. grandiflorum* có nguồn gốc từ các thảo nguyên của các bang đồng bằng ở Bắc Mỹ và được mô tả là cây một năm hoặc cây hai năm ra hoa vào mùa xuân hoặc đầu mùa hè. Chỉ có các loài đã biết khác trong chi *Eustoma* là *E. exaltatum*, có khả năng thụ phấn chéo với *E. grandiflorum*. Trong khoảng thời gian dưới 30 năm bắt đầu từ cuối thế kỷ 20, cây hoa cát tường được chuyển từ cây vô danh về mặt thực tế thành một trong số 10 cây hoa cắt cành hàng đầu trên thế giới.

Các nỗ lực để biến nạp kiểu hình trồng thành lưỡng trong vườn kiêu đại vào cây hoa cắt cành hiện đại đang trở lại đầu những năm 1930 và chủ yếu được thực hiện ở Nhật Bản. Tuy nhiên, sự giao thoa đáng kể chỉ xảy ra vào năm 1977 với sự phát triển của thế hệ lai F₁ thứ nhất mà được đưa ra thị trường quốc tế khoảng năm 1984 dưới dạng một loạt giống có tên “Yodel”. Các chương trình nhân giống nhằm vào các giống được cải thiện đối với cây trồng trong chậu hoặc trồng thành lưỡng trong vườn hoặc đối với thị trường hoa cắt cành đã được bắt đầu vào cuối những năm 1980. Ngày nay, thị trường hoa cát tường chủ yếu tập trung vào các giống hoa cắt cành.

Việc giới thiệu hoa cát tường làm cây trồng đã bị chậm lại, gặp phải các thách thức về canh tác và kinh tế bao gồm mẫu hình sinh trưởng không phù hợp, sản lượng hoa thấp, thiếu tính đồng nhất và thời gian sinh trưởng dài. Mối quan tâm đối với cây

trồng này ngày càng gia tăng dẫn đến sự gia tăng đồng thời về tài liệu khoa học; tuy nhiên, vẫn phải xem xét đến nghề trồng hoa ví dụ “cây trồng ít được quan tâm”, cây trồng quan trọng về mặt kinh tế và trồng trọt nhưng thiếu sự quan tâm nghiên cứu cơ bản.

Các tài liệu chuyên ngành dùng để thử nghiệm sự di truyền tính trạng ở cây hoa cát tường bị hạn chế, không có tài liệu nào trong số chúng kết hợp các thông tin về phân tử và cơ chế di truyền. Ecker và các đồng tác giả (Ecker R et al., 1993. Genet. Anal. 256: 253–257; Ecker R et al 1994. Euphytica 78: 193–197) đã chứng minh tác dụng của ưu thế lai rõ ràng đối với tốc độ sinh trưởng, kích cỡ lá, đường kính cuống và số lượng nút mắt. Các thử nghiệm này được thực hiện trên các quần thể F_1 , F_2 và BC_1 nội phối khác nhau với nền tảng di truyền rộng. Mô hình đối với sự di truyền ngủ của hạt được đề xuất dựa vào việc phân tích các quần thể F_1 , F_2 và BC_1 thu được từ việc lai chéo giữa các kiểu gen yêu cầu và các kiểu gen không yêu cầu nhiệt độ lạnh để ra hoa. Mô hình này bao gồm sáu locus alen kép với các tác dụng tích lũy, trong đó sự có mặt của ít nhất chín alen 'tạo ra trạng thái ngủ' là cần thiết để gây ra trạng thái ngủ của hạt theo kiểu hình (Ecker R et al 1994. Plant Breed. 113: 335–339).

Cây hoa cát tường được cho là cây dài ngày tùy ý và mặc dù tác dụng theo chu kỳ sáng được cho là nhỏ, các thử nghiệm đã chứng minh được rằng ngày ngắn có thể có tác động làm trễ đối với sự ra hoa và cũng có tác dụng thứ cấp tiêu cực đối với quá trình kết trái sớm (Harbaugh B K., 1995. HortScience. 30: 1375–1377).

Yếu tố môi trường chính tác động đến sự sinh trưởng và gây ra sự ra hoa ở cây hoa cát tường là nhiệt độ (Ohkawa K and Sasaki E., 1999. Acta Hort. 482: 423–426). Khi hạt giống của cây hoa cát tường được cho tiếp xúc với nhiệt độ cao hơn 20°C trong hơn 14 ngày trong giai đoạn sinh trưởng thứ nhất, quá trình sinh trưởng dạng hoa thị xảy ra và làm trễ quá trình kéo dài cuống hoa. Các cây có lá dạng hoa thị sẽ không kết trái sớm và ra hoa rất muộn theo cách rải rác mà không tương thích với quá trình sản xuất nông nghiệp. Việc tiếp xúc với nhiệt độ thấp ở mức dưới 15°C trong ít nhất 4 tuần (quá trình được gọi là “xuân hoá”) đã được chứng minh là loại trừ tác dụng tiêu cực của nhiệt độ cao (Ohkawa K et al., 1991. Sci. Hort. (Amsterdam). 48: 171–176). Axit gibberelic (GA) được phát hiện là đóng vai trò quan trọng trong tác dụng xuân hoá bằng cách điều chỉnh quá trình kéo dài cuống theo số lượng cây bao gồm cả cây hoá cát tường (Hisamatsu T et al., 1998. J. Japanese Soc. Hort. Sci. 67: 866–871). Nhiệt

độ thấp có thể khơi mào quá trình sinh tổng hợp GA và làm tăng tính nhạy GA ở thực vật dạng hoa thị trong cây *Arabidopsis thaliana* và cây hoa cát tường (Oka M et al., 2001. Plant Sci. 160: 1237–1245). Glutathion giảm (GSH) cũng đã được chứng minh là có vai trò đáp ứng với quá trình xuân hóa ở cây hoa cát tường, có thể là bằng cách tác động lên sự điều hòa quá trình kết trái sớm ngược dòng của GA (Yanagida M et al., 2004. Plant Cell Physiol. 45: 129–37).

Cây hoa cát tường tương đồng chứa vài gen đã biết rõ có thể đóng vai trò trong các yêu cầu xuân hoá đã được nghiên cứu (Nakano Y et al., 2011. Physiol. Plant. 141: 383–93). Các gen được chọn dựa vào chức năng của chúng trong cơ chế xuân hoá *Arabidopsis*. *FLOWERING LOCUS C (FLC)* mã hoá yếu tố phiên mã hộp MADS và là yếu tố kìm hãm then chốt sự ra hoa được kìm hãm bởi quá trình xuân hoá. *FLOWERING LOCUS T (FT)* và *OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1 (SOC1)* là các tác nhân thúc đẩy ra hoa được ngăn chặn bởi *FLC*. Chức năng của các gen của cây hoa cát tường tương đồng được thử nghiệm bằng cách biểu hiện quá mức các gen *Eustoma* trong các cây *Arabidopsis* chuyển gen. Sự phân tích mức độ biểu hiện trong các mô và thời gian khác nhau đối với các cây được xuân hoá và không được xuân hoá cho thấy rằng *EgFLCL* (tương tự *E. grandiflorum FLC*) được điều hòa tăng bởi nhiệt độ lạnh và do đó làm chậm dựa vào *Arabidopsis FLC* được biểu hiện nhiều trước quá trình xử lý lạnh và được làm bất hoạt bởi quá trình xuân hoá. *EgSOC1L* (tương tự *E. grandiflorum SOC1*) và *EgFTL* (tương tự *E. grandiflorum FT*) được cảm ứng bởi nhiệt độ ấm và các điều kiện ngày dài theo quá trình xuân hoá trong mẫu tương tự với mẫu quan sát được đối với *Hv-FT1* ở cây lúa đại mạch được cảm ứng bởi các điều kiện nhiệt độ ấm và ngày dài theo quá trình xuân hoá (Hemming et al., 2008). Các phát hiện này gợi ý rằng việc điều chỉnh sự ra hoa bằng quá trình xuân hoá đối với cây *Eustoma* khác biệt đáng kể với mô hình được phát triển đối với cây *Arabidopsis thaliana* (Nakano et al., 2011, *ibid*).

Yêu cầu để cho các cây giống non của cây hoa cát tường tiếp xúc với nhiệt độ thấp hơn 15°C trong ít nhất 4 tuần là một gánh nặng đối với người trồng khi tính đến thời gian và tiền bạc, cụ thể là ở các quốc gia có thời tiết ấm áp như Israel mà theo cách khác rất thích hợp để sản xuất hoa cát tường cắt cành.

Do đó, vẫn có nhu cầu chưa được đáp ứng và có lợi ở mức cao về cây hoa cát tường (*Eustoma grandiflorum*) không dễ bị xuân hoá và không cần phải xử lý lạnh để

kết trái sớm và ra hoa, trong khi vẫn giữ được kiểu hình của các dòng thành công về mặt thương mại.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất cây hoa cát tường (*Eustoma grandiflorum*) làm cảnh với các yêu cầu xuân hoá được điều chỉnh. Cụ thể, sáng chế đề xuất cây hoa cát tường không phụ thuộc vào quá trình xuân hoá để kết trái sớm và ra hoa, thích hợp ở mức cao đối với mục đích thương mại trong nông nghiệp.

Sáng chế này dựa một phần vào sự phát hiện bất ngờ rằng quá trình nhập gen của đoạn nhiễm sắc thể tối thiểu tương đương với nhóm liên kết (linkage group: LG) 2 của cây *Eustoma exaltatum* kiểu dại vào hệ gen của cây hoa cát tường *E. grandiflorum* làm cảnh đã được cải biến yêu cầu xuân hoá của cây *E. grandiflorum* sao cho quá trình kết trái sớm và ra hoa xảy ra mà không cần phải tiếp xúc với nhiệt độ lạnh đã biết là cần thiết đối với cây trồng này. Việc thêm vào *E. exaltatum* kiểu dại được sử dụng là quá trình kết trái sớm độc lập với quá trình xuân hoá mà không cần phải có quá trình xử lý lạnh cần thiết để kết trái sớm ở cây *E. grandiflorum* không chứa QTL hoặc phần của nó.

Mảnh *E. exaltatum* LG-2 chứa QTL kết hợp với ít nhất một gen đánh dấu nằm ở vị trí từ khoảng 25 đến khoảng 45cM. Theo cách khác, cây *E. grandiflorum* được nhập gen của sáng chế giống với các cây loại ưu tú về vẻ bên ngoài của chúng và các yêu cầu nông học. Ngoài ra, quá trình nhập gen của QTL thu được từ cây *E. exaltatum* vào cây *E. grandiflorum* dẫn đến sự gia tăng về số lượng cuống hoa trong giai đoạn đâm chồi nảy lộc hoa thứ hai điển hình đối với các loài này.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất cây *Eustoma grandiflorum* làm cảnh chứa yếu tố di truyền có QTL thu được từ nhóm liên kết (LG) 2 của cây *Eustoma exaltatum* hoặc phần của nó, trong đó QTL hoặc phần của nó tạo ra sự độc lập với quá trình xuân hoá cho cây *E. grandiflorum*.

Theo một số phương án, cây *E. exaltatum* chứa QTL hoặc phần của nó có sự độc lập với quá trình xuân hoá. Theo một số phương án làm ví dụ, cây *E. exaltatum* có sự độc lập với quá trình xuân hoá là dòng *E. exaltatum* 14_30 P1RI, hạt của nó được lưu trữ ở NCIMB Ltd. vào ngày 23 tháng 11 năm 2015 với số lưu trữ là NCIMB 42491.

Theo một số phương án, yếu tố di truyền bao gồm QTL hoặc phần của nó tạo ra sự độc lập với quá trình xuân hoá.

Theo một số phương án, QTL hoặc phần của nó tạo ra sự độc lập với quá trình xuân hoá có liên quan đến ít nhất một gen đánh dấu nằm trên nhóm liên kết 2 của *E. exaltatum* trong khoảng cách được kéo căng giữa các vị trí từ 25 đến 45cM. Theo một số phương án, gen đánh dấu có thể là gen đánh dấu bất kỳ trong số các gen đánh dấu được liệt kê trong Bảng 1. Mỗi gen đánh dấu có thể là một phương án riêng biệt của sáng chế.

Theo một số phương án làm ví dụ, QTL hoặc phần của nó có liên quan đến ít nhất một gen đánh dấu nằm trên nhóm liên kết 2 của *E. exaltatum* trong khoảng cách được kéo căng giữa các vị trí từ 30 đến 40cM. Theo một số phương án, ít nhất một gen đánh dấu có trình tự axit nucleic nêu trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO:1 đến 42. Mỗi gen đánh dấu có thể là một phương án riêng biệt của sáng chế.

Theo một số phương án, ít nhất một gen đánh dấu có trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO:3. Theo phương án khác, ít nhất một gen đánh dấu có trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO:15. Theo phương án bổ sung, ít nhất một gen đánh dấu có trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO:40.

Theo một số phương án làm ví dụ, QTL hoặc phần của nó có liên quan đến gen đánh dấu S1_74154018. Theo một số phương án làm ví dụ, gen đánh dấu nằm ở vị trí 34.53167046 trên nhóm liên kết 2 của *E. exaltatum*. Theo một số phương án, gen đánh dấu chứa trình tự axit nucleic
CAGCTCTTTCATCACTGTGAGGCTCATAGTCTGGCTGTTCTGCATCTGAATT
TGAAACACGTGC được nêu trong SEQ ID NO:15.

Theo các phương án bổ sung, yếu tố di truyền chứa QTL hoặc phần của nó tạo ra sự độc lập với quá trình xuân hoá được kết hợp vào nhiễm sắc thể tương đương với nhóm liên kết 2 của cây *E. grandiflorum* làm cảnh. Theo một số phương án làm ví dụ, yếu tố di truyền chứa QTL hoặc phần của nó được kết hợp ở vị trí từ khoảng 25cM đến khoảng 45cM trên nhiễm sắc thể *E. grandiflorum* tương đương với nhóm liên kết 2.

Theo một số phương án, QTL hoặc phần của nó còn tạo ra sự gia tăng về số lượng cuống hoa trong giai đoạn đâm chồi nảy lộc hoa thứ hai so với số lượng cuống

trong giai đoạn đâm chồi nảy lộc thứ hai ở cây cảnh *E. grandiflorum* tương ứng không có QTL hoặc phần của nó được đưa vào.

Theo các phương án nhất định, cây cảnh *E. grandiflorum* chứa yếu tố di truyền có QTL hoặc phần của nó tạo ra sự độc lập với quá trình xuân hoá có các tính trạng nông học tương đương so với cây cảnh *E. grandiflorum* tương ứng không có QTL hoặc phần của nó được đưa vào. Theo các phương án nhất định, các tính trạng nông học được chọn từ, nhưng không chỉ giới hạn ở, chiều dài cuống, tốc độ sinh trưởng, năng suất, khả năng kháng lại các stress phi sinh học và kháng lại các tác nhân gây bệnh. Theo một số phương án làm ví dụ, yếu tố di truyền chứa QTL hoặc phần của nó được đưa vào trong cây trồng ưu tú *E. grandiflorum*. Cũng cần hiểu rằng *E. grandiflorum* của sáng chế là cây cảnh, nhưng không chỉ giới hạn ở dòng và/hoặc giống đặc hiệu.

Theo một số phương án làm ví dụ, chiều dài cuống hoa của *E. grandiflorum* chứa QTL hoặc phần của nó tương đương với chiều dài cuống của cây cảnh *E. grandiflorum* tương ứng không có QTL hoặc phần của nó được đưa vào.

Theo các phương án khác nữa, cây cảnh *E. grandiflorum* chứa yếu tố di truyền có QTL hoặc phần của nó tạo ra sự độc lập với quá trình xuân hoá không có gen di truyền gây hại có nguồn gốc từ nhiễm sắc thể *E. exaltatum*.

Theo các phương án nhất định, cây trồng là cây nội phối đồng hợp tử đối với yếu tố di truyền chứa QTL hoặc phần của nó tạo ra sự độc lập với quá trình xuân hoá. Theo phương án khác, cây trồng là cây lai dị hợp tử đối với yếu tố di truyền chứa QTL hoặc phần của nó tạo ra sự độc lập với quá trình xuân hoá. Cần phải hiểu một cách rõ ràng rằng các cây đồng hợp tử đối với QTL hoặc phần của nó có thể kết trái sớm mà không cần phải có quá trình xử lý lạnh như được mô tả trong bản mô tả này.

Hạt, cành giâm và các bộ phận thực vật khác bất kỳ có thể được sử dụng để nhân giống, bao gồm các tế bào được phân lập và môi trường nuôi cấy mô cũng được bao gồm trong phạm vi bảo hộ của sáng chế này. Cần hiểu rằng cây trồng được tạo ra từ hạt hoặc vật liệu nhân giống khác chứa QTL hoặc phần của nó tạo ra sự độc lập với quá trình xuân hoá.

Sáng chế bộc lộ sự liên quan chưa biết cho đến nay giữa QTL nằm trên nhóm liên kết 2 của *E. exaltatum* và kiểu hình được xuân hoá cơ định mà khi được biến nạp

vào trong hệ gen của *E. grandiflorum* dẫn đến khả năng kết trái sớm và ra hoa mà không cần phải tiếp xúc với nhiệt độ lạnh của quá trình xuân hoá đã biết là cần thiết đối với cây cảnh *E. grandiflorum* tương ứng không có QTL hoặc phần của nó được đưa vào.

Do đó, theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất polynucleotit được phân lập chứa trình tự axit nucleic tạo ra sự độc lập với quá trình xuân hoá, trong đó trình tự axit nucleic này thu được từ đoạn nhiễm sắc thể tương đương với nhóm liên kết 2 của cây *E. exaltatum*, cây *E. exaltatum* không cần phải có quá trình xuân hoá để kết trái sớm và ra hoa.

Theo các phương án nhất định, đoạn *E. exaltatum* có trình tự axit nucleic nằm ở vị trí từ khoảng 25cM đến khoảng 45cM hoặc phần của nó. Theo các phương án nhất định, đoạn *E. exaltatum* có trình tự axit nucleic của gen đánh dấu bất kỳ trong số các gen đánh dấu di truyền được liệt kê trong Bảng 1. Theo các phương án khác, đoạn *E. exaltatum* có trình tự axit nucleic nằm ở vị trí từ 30cM đến 40cM hoặc phần của nó. Theo các phương án này, đoạn có trình tự axit nucleic nêu trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO:1 đến 42 hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng.

Theo một số phương án làm ví dụ, trình tự axit nucleic là trình tự của gen đánh dấu di truyền S1_74154018, có trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO:15.

Theo khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra cây cảnh *E. grandiflorum* có sự độc lập với yêu cầu xuân hoá để kết trái sớm, trong đó phương pháp này bao gồm bước đưa yếu tố di truyền chứa QTL thu được từ nhóm liên kết 2 của *Eustoma exaltatum* hoặc phần của nó vào trong *E. grandiflorum*, trong đó QTL hoặc phần của nó tạo ra sự độc lập với quá trình xuân hoá cho cây *E. grandiflorum*, nhờ đó tạo ra cây cảnh *E. grandiflorum* độc lập với yêu cầu xuân hoá để ra hoa.

Theo các phương án nhất định, cây *E. exaltatum* chứa QTL hoặc phần của nó có sự độc lập với quá trình xuân hoá.

Theo một số phương án làm ví dụ, cây *E. exaltatum* độc lập với quá trình xuân hoá chứa QTL hoặc phần của nó là dòng *E. exaltatum* 14_30 P1RI, hạt của nó được lưu trữ ở NCIMB Ltd. vào ngày 23 tháng 11 năm 2015 với số lưu trữ là NCIMB 42491.

Theo một số phương án, yếu tố di truyền bao gồm QTL hoặc phần của nó tạo ra sự độc lập với quá trình xuân hoá.

Theo một số phương án, QTL hoặc phần của nó tạo ra sự độc lập với quá trình xuân hoá có liên quan đến ít nhất một gen đánh dấu nằm trên nhóm liên kết 2 của *E. exaltatum* ở vị trí từ khoảng 25 đến khoảng 45cM hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng. Theo một số phương án, ít nhất một gen đánh dấu di truyền được chọn từ nhóm được liệt kê trong Bảng 1. Mỗi gen đánh dấu có thể là một phương án riêng biệt của sáng chế. Theo các phương án khác, QTL hoặc phần của nó có liên quan đến ít nhất một gen đánh dấu nằm trên nhóm liên kết 2 của *E. exaltatum* ở vị trí từ khoảng 30 đến khoảng 40cM hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng. Theo các phương án này, ít nhất một gen đánh dấu di truyền có trình tự axit nucleic nêu trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO:1 đến 42.

Theo một số phương án làm ví dụ, QTL hoặc phần của nó có liên quan đến gen đánh dấu S1_74154018, có trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO:15.

Theo phương án nhất định, yếu tố di truyền chứa QTL hoặc phần của nó được đưa vào nhiễm sắc thể tương đương với nhóm liên kết 2 của *E. grandiflorum*. Theo một số phương án làm ví dụ, đoạn được đưa vào ở vị trí ở vị trí từ khoảng 25cM đến khoảng 45cM của nhóm liên kết 2 của *E. grandiflorum*.

Phương pháp bất kỳ đã biết với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể được sử dụng để đưa yếu tố di truyền chứa QTL hoặc phần của nó vào *E. grandiflorum*.

Theo một số phương án làm ví dụ, yếu tố di truyền được đưa vào bằng phương pháp nhập gen.

Theo các phương án khác, yếu tố di truyền được đưa vào bằng phương pháp biến nạp.

Theo các phương án nhất định, việc chọn cây *E. grandiflorum* có sự kết trái sớm độc lập với quá trình xử lý xuân hoá được thực hiện bằng cách phát hiện sự có mặt của QTL hoặc phần của nó thu được từ *E. exaltatum* được mô tả trong bản mô tả này trong hệ gen của cây *E. grandiflorum*. Phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này có thể được sử dụng để phát hiện QTL hoặc phần của nó. Theo một số phương án

làm ví dụ, việc phát hiện được thực hiện bằng cách xác định các gen đánh dấu di truyền nằm trong QTL như được mô tả trong bản mô tả này.

Các mục đích, dấu hiệu kỹ thuật và ưu điểm khác của sáng chế sẽ trở nên rõ ràng dựa vào phần mô tả và các hình vẽ sau đây.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện chín giai đoạn phát triển khác nhau được xác định từ các giai đoạn chồi (giai đoạn 1) đến giai đoạn hoá già (giai đoạn 9). Hình ảnh thể hiện các hoa của con lai F₁ thu được từ phép lai chéo giữa bố-mẹ màu hồng *E. grandiflorum* và *E. exaltatum*.

Fig.2 thể hiện các cây không kết trái sớm và ở giai đoạn dạng hoa thị (Fig.2A) và cây kết trái sớm (Fig.2B).

Fig.3 thể hiện các kiểu hình hoa khác nhau. Fig.3A: Sự thay đổi về số lượng nhị hoa. Fig.3B: Sự thay đổi về thủy nhụy. Fig.3C: Chiều dài cuống. Fig.3D: chiều dài đài hoa.

Fig.4 thể hiện dạng sơ đồ về cấu trúc của hai quần thể lập bản đồ nội phối tái tổ hợp (recombinant inbred: RI).

Fig.5 thể hiện sự liên kết của gen đánh dấu được ước tính của quần thể hoa cát tường nội phối tái tổ hợp được tổ hợp. Dòng này thể hiện sự liên kết (điểm số LOD lớn hoặc phân đoạn tái tổ hợp nhỏ) và tổng quát thể hiện các gen đánh dấu không liên kết (điểm số LOD nhỏ hoặc phân đoạn tái tổ hợp lớn).

Fig.6 thể hiện bản đồ liên kết hoa cát tường gồm có 4500 gen đánh dấu SNP và 69 nhóm liên kết.

Fig.7 thể hiện đồ thị Manhattan: QTL dạng hoa thị của hoa cát tường trên bản đồ liên kết RI đồng hợp tử kết hợp được tạo cấu trúc bằng cách sử dụng dữ liệu kiểu gen khi giải trình tự (GBS).

Fig.8 thể hiện hình vẽ chi tiết của QTL dạng hoa thị của hoa cát tường trên nhóm liên kết 2 của bản đồ liên kết RI đồng hợp tử tổ hợp được tạo cấu trúc bằng cách sử dụng dữ liệu GBS.

Fig.9 thể hiện phép so sánh số lượng trung bình của cây kết trái sớm đồng hợp

tử đối với alen *E. grandiflorum* của S1_74154018 (1) và các cây đồng hợp tử đối với alen *E. exaltatum* của S1_74154018 (3).

Fig.10 thể hiện đồ thị Manhattan: QTL dạng hoa thị của cây hoa cát tường trên bản đồ liên kết RI dị hợp tử tổ hợp được tạo cấu trúc bằng cách sử dụng dữ liệu kiểu gen khi giải trình tự (GBS).

Fig.11 thể hiện hình vẽ chi tiết của QTL dạng hoa thị của cây hoa cát tường trên nhóm liên kết 2 của bản đồ liên kết RI dị hợp tử tổ hợp được tạo cấu trúc bằng cách sử dụng dữ liệu GBS.

Fig.12 thể hiện phép so sánh về số lượng trung bình của các cây kết trái sớm đồng hợp tử đối với alen *E. grandiflorum* của S1_74154018 (1) và các cây dị hợp tử chứa một alen *E. grandiflorum* và một alen *E. exaltatum* của S1_74154018 (2).

Fig.13 thể hiện sự kết trái sớm của của cây dị hợp tử lai chứa alen tạo ra sự độc lập với quá trình xuân hoá (được ký hiệu là F1p) và của các giống có bán trên thị trường phụ thuộc quá trình xuân hoá. Fig.13A: tỷ lệ phần trăm kết trái sớm. Fig.13B: hình ảnh của cây F1p ra hoa. Fig.13C: hình ảnh của cây xanh Rosita 3 với kiểu hình lá dạng hoa thị.

Fig.14 thể hiện sự so sánh về số lượng trung bình của cuống/cây trong giai đoạn đâm chồi nảy lộc hoa thứ hai giữa các cây đồng hợp tử đối với alen *E. grandiflorum* của S1_74154018 (1) và các cây đồng hợp tử đối với alen *E. exaltatum* (3).

Fig.15 thể hiện sự so sánh về số lượng trung bình của các cây kết trái sớm đồng hợp tử đối với alen *E. grandiflorum* của EG_0075 (1) và các cây đồng hợp tử đối với alen *E. exaltatum* EG_0075 (3).

Fig.16 thể hiện sự so sánh về số lượng trung bình của các cây kết trái sớm đồng hợp tử đối với alen *E. grandiflorum* của S1_18474044 (1) và các cây đồng hợp tử đối với alen *E. exaltatum* S1_18474044 (3).

Mô tả chi tiết sáng chế

Các định nghĩa

Thuật ngữ "cây" được sử dụng trong bản mô tả này theo nghĩa rộng nhất của nó. Nó cũng đề chỉ nhiều tế bào thực vật được biệt hoá ở mức độ lớn thành cấu trúc có mặt ở giai đoạn bất kỳ của quá trình phát triển của thực vật. Các cấu trúc như vậy bao

gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, rễ, thân, chồi, lá, hoa, cánh hoa, quả, v.v.. Theo một số phương án làm ví dụ, các thuật ngữ “cây cảnh” hoặc “cây trồng làm cảnh” được sử dụng thay thế cho nhau trong bản mô tả này, cụ thể là sự viển dẫn đến *Eustoma grandiflorum* để chỉ các dòng thích hợp để sinh trưởng thương mại đối với cây hoa cát cảnh của chúng và như các cây trong vườn hoặc trồng trong chậu.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "phần của cây" thường để chỉ một phần của cây hoa cát tường, bao gồm các tế bào đơn lẻ và các mô tế bào như các tế bào thực vật nguyên vẹn trong cây, cụm tế bào và môi trường nuôi cấy mô mà từ đó cây hoa cát tường có thể được tạo ra. Ví dụ về các phần của cây bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các tế bào đơn lẻ và các mô từ phần hoa, nõn, lá, phôi, rễ, đỉnh rễ, bao phấn, hoa, quả, cành, chồi và hạt; cũng như phần hoa, nõn, lá, phôi, rễ, đỉnh rễ, bao phấn, hoa, quả, cành, chồi, mầm, thân rễ, hạt, thể nguyên sinh, các thể sản và các phần tương tự.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “kết trái sớm” để chỉ sự chuyển tiếp từ giai đoạn sinh dưỡng hoặc giai đoạn hoa thị sang giai đoạn sinh trưởng nở hoa hoặc sinh sản.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "quá trình xuân hoá" để chỉ quá trình mà nhờ đó làm cho hoa ở một số cây được thúc đẩy bằng cách cho cây tiếp xúc với quá trình làm lạnh trong khoảng thời gian nhất định. Theo các phương án nhất định, thuật ngữ “quá trình xuân hoá” liên quan đến cây hoa cát tường (*Eustoma*) bao gồm sự tiếp xúc của hạt giống trong giai đoạn sinh trưởng thứ nhất với nhiệt độ thấp hơn 20°C, đôi khi thấp hơn 18°C hoặc thấp hơn 15°C. Thuật ngữ “mùa sinh trưởng thứ nhất” để chỉ khoảng thời gian từ khi xuất hiện lá thứ nhất và trong khoảng thời gian ít nhất ba tuần hoặc khoảng bốn tuần hoặc nhiều hơn. Khi được sử dụng trong bản mô tả này, các thuật ngữ “sự độc lập với quá trình xuân hoá” hoặc “độc lập xuân hoá” để chỉ các cây hoa cát tường được sinh trưởng trong các điều kiện tối ưu đã biết trong lĩnh vực này để sinh trưởng thương mại mà kết trái sớm và ra hoa về cơ bản không cần phải có quá trình xử lý xuân hoá.

Thuật ngữ "locus" (số nhiều “các locus”) được định nghĩa trong bản mô tả này làm vị trí mà gen đã nêu chiếm giữ trên nhiễm sắc thể của các loài đã nêu.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "nhóm liên kết" để chỉ tất cả

các gen hoặc tính trạng di truyền nằm trên cùng nhiễm sắc thể. Trong nhóm liên kết, các locus này gần nhau đủ để sẽ có sự liên kết trong quá trình lai di truyền. Do khả năng lai chéo tăng lên theo khoảng cách vật lý giữa các gen trên nhiễm sắc thể, các gen có vị trí cách xa nhau trong nhóm liên kết có thể không có sự liên kết phát hiện được bất kỳ trong các thử nghiệm di truyền trực tiếp. Thuật ngữ "nhóm liên kết" phần lớn được sử dụng để chỉ các locus di truyền có đặc tính liên kết trong các hệ di truyền mà trong đó phép gán nhiễm sắc thể vẫn chưa được thực hiện. Do đó, trong ngữ cảnh của sáng chế, thuật ngữ "nhóm liên kết" đồng nghĩa với (thực thể vật lý của) nhiễm sắc thể.

Thuật ngữ "QTL" được sử dụng trong bản mô tả này với nghĩa đã được thừa nhận trong lĩnh vực này. Thuật ngữ "QTL tạo ra sự độc lập với quá trình xuân hoá" để chỉ vùng nằm trên nhiễm sắc thể cụ thể của *Eustoma* có liên quan đến ít nhất một gen mã hoá đối với sự độc lập với quá trình xuân hoá hoặc ít nhất một vùng điều hoà, nghĩa là vùng nhiễm sắc thể kiểm soát sự biểu hiện của một hoặc nhiều gen có liên quan đến sự độc lập với quá trình xuân hoá. Sự biểu hiện kiểu hình của gen có thể là, ví dụ, sự kết trái sớm mà không cần phải có quá trình xử lý lạnh và/hoặc sự gia tăng số lượng hoa trong giai đoạn đâm chồi nảy lộc hoa thứ hai. Ví dụ, QTL có thể chứa một hoặc nhiều gen mà sản phẩm của nó tạo ra sự độc lập với quá trình xuân hoá. Theo cách khác, QTL có thể bao gồm, ví dụ, các gen điều hoà hoặc các trình tự mà sản phẩm của nó tác động đến sự biểu hiện của các gen trên các locus khác trong hệ gen của thực vật mà nhờ đó tạo ra sự độc lập với quá trình xuân hoá. QTL của sáng chế có thể được định nghĩa bằng cách thể hiện vị trí di truyền của nó trong hệ gen của *E. exaltatum* tương ứng bằng cách sử dụng một hoặc nhiều gen đánh dấu di truyền phân tử. Một hoặc nhiều gen đánh dấu, lần lượt thể hiện locus đặc hiệu. Các khoảng cách giữa các locus thường được xác định theo tần số lai chéo giữa các locus trên cùng nhiễm sắc thể và được thể hiện theo centimorgan (cM). Nếu hai locus ở cách xa hơn, có nhiều khả năng sẽ xảy ra sự trao đổi chéo giữa chúng. Trái lại, nếu hai locus gần nhau, sự trao đổi chéo ít có khả năng xảy ra giữa chúng. Thông thường, một centimorgan (chức năng bản đồ Kosambi (cM)) có khoảng 1% tái tổ hợp giữa các locus (các gen đánh dấu). Khi QTL có thể được thể hiện bởi nhiều gen đánh dấu, khoảng cách di truyền giữa các gen đánh dấu đầu cuối thể hiện kích cỡ của QTL.

Thuật ngữ "nền tảng di truyền tự nhiên" được sử dụng trong bản mô tả này thể

hiện nền tảng di truyền ban đầu của QTL. Nền tảng như vậy là hệ gen của *Eustoma exaltatum*, cụ thể là *E. exaltatum* mà không cần phải có quá trình luân hoá đối với hoa. Do đó, dòng *E. exaltatum* 14_30 P1RI thể hiện nền tảng di truyền tự nhiên của QTL của sáng chế. Phương pháp bao gồm việc truyền ADN chứa QTL hoặc phần của nó, từ nhóm liên kết 2 của *E. exaltatum* đến vị trí giống nhau hoặc khác nhau trên nhiễm sắc thể tương ứng của các loài *Eustoma* khác sẽ làm cho QTL hoặc phần của nó không có trong nền tảng di truyền tự nhiên của nó.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "dị hợp tử" có nghĩa là điều kiện di truyền tồn tại khi các alen khác nhau cư trú ở các locus tương ứng trên các nhiễm sắc thể tương đồng.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "đồng hợp tử" có nghĩa là điều kiện di truyền tồn tại khi các alen giống nhau cư trú ở các locus tương ứng trên các nhiễm sắc thể tương đồng.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "con lai" để chỉ con cháu bất kỳ của phép lai chéo giữa hai cá thể không giống nhau về mặt di truyền, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phép lai chéo giữa hai dòng nội phối.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "nội phối" có nghĩa là thực vật hoặc dòng thực vật riêng rẽ hầu như đồng hợp tử.

Các thuật ngữ "nhập gen", "được nhập gen" và "quá trình nhập gen" để chỉ quá trình vận chuyển (các) alen mong muốn của gen hoặc locus tính trạng từ nền tảng di truyền của một loài, giống hoặc cây trồng vào trong hệ gen của các loài khác, giống hoặc cây trồng. Theo một phương pháp, (các) alen mong muốn có thể được nhập gen qua phép lai chéo giới tính giữa hai bố-mẹ, trong đó một trong số các bố-mẹ có alen mong muốn trong hệ gen của nó. Alen mong muốn có thể bao gồm một hoặc nhiều gen mong muốn, locus gen đánh dấu, QTL hoặc thành phần tương tự.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "quần thể" để chỉ nhóm dị hợp tử về mặt di truyền của các thực vật dùng chung nguồn gốc di truyền chung.

Các thuật ngữ "kỹ thuật di truyền", "biến nạp" và "cải biến di truyền" được sử dụng trong bản mô tả này để chỉ sự vận chuyển các gen được phân lập và tách dòng vào ADN, thường là ADN hoặc hệ gen của nhiễm sắc thể, của sinh vật khác hoặc để

chỉ sự cải biến của gen trong hệ gen thực vật.

Các thuật ngữ "gen đánh dấu phân tử" hoặc "gen đánh dấu ADN" được sử dụng thay thế cho nhau trong bản mô tả này và để chỉ chất chỉ báo phân tử được sử dụng trong các phương pháp để hiển thị sự khác nhau về các đặc điểm của trình tự axit nucleic. Các ví dụ về các chất chỉ báo như vậy là các gen đánh dấu của công nghệ mảng đa dạng (DArT), các gen đánh dấu đa hình có chiều dài đoạn giới hạn (RFLP), các gen đánh dấu đa hình có chiều dài đoạn được khuếch đại (AFLP), các kiểu hình nucleotit đơn (SNP), các đột biến xen đoạn, các gen đánh dấu vi vệ tinh, các vùng khuếch đại đặc trưng trình tự (SCAR), các gen đánh dấu trình tự đa hình khuếch đại được phân cắt (CAPS) hoặc các gen đánh dấu isozym hoặc các tổ hợp của các gen đánh dấu được mô tả trong bản mô tả này để xác định vị trí di truyền và nhiễm sắc thể đặc hiệu. Các gen đánh dấu ADN được sử dụng trong sáng chế hầu hết là kiểu gen theo giải trình tự (các gen đánh dấu GBS).

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất cây cảnh *Eustoma grandiflorum* chứa yếu tố di truyền có QTL thu được từ nhóm liên kết 2 của *Eustoma exaltatum* hoặc phần của nó, trong đó QTL hoặc phần của nó tạo ra sự độc lập với quá trình xuân hoá cho cây *E. grandiflorum*.

Lần đầu tiên, sáng chế bộc lộ locus tính trạng số lượng (quantitative trait locus: QTL) liên quan đến sự độc lập với quá trình xuân hoá ở cây hoa cát tường, cho đến nay đã biết là có yêu cầu bắt buộc đối với nhiệt độ thấp ở các giai đoạn sinh trưởng sớm để tạo ra cây hoa cát tường thích hợp về mặt thương mại. Quan sát được QTL trong các loài hoa cát tường không nhằm mục đích thương mại, *Eustoma exaltatum*. Khi phân tích một số lượng lớn kiểu hình và kiểu gen liên quan của chúng, QTL hầu như loại bỏ yêu cầu đối với quá trình xuân hoá được phát hiện là nằm trên nhóm liên kết 2 của cây *E. exaltatum* có kiểu hình độc lập với quá trình xuân hoá. Cây được sử dụng trong sáng chế là dòng *E. exaltatum* 14_30 P1RI. Hạt của dòng này được lưu trữ ở NCIMB Ltd., Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen, AB21 9YA, Scotland, an International Depository Authority theo Hiệp ước Budapest. Ngày lưu trữ là ngày 23 tháng 11 năm 2015. Hạt lưu trữ là mẫu vật liệu đại diện tồn tại trước ngày nộp đơn sáng chế này. Số NCIMB I.D. là NCIMB 42491.

Theo các phương án nhất định, QTL hoặc phần của nó tạo ra sự độc lập với quá

trình xuân hoá có liên quan đến ít nhất một gen đánh dấu nằm trên nhóm liên kết 2 của *E. exaltatum* trong khoảng cách kéo căng nằm giữa các vị trí từ 25 đến 45cM. Theo các phương án nhất định, ít nhất một gen đánh dấu được chọn từ các gen đánh dấu được thể hiện trong Bảng 1 dưới đây. Mỗi khả năng thể hiện một phương án riêng biệt của sáng chế.

Bảng 1: Các gen đánh dấu liên quan đến QTL tạo ra sự độc lập với quá trình xuân hoá (ở vị trí từ 25 đến 45cM)

Xác định gen đánh dấu (Tên)	Nhóm liên kết	Vị trí	Gen tiềm năng
S1_79899029	2	25.2729168	
S1_132303063	2	25.3591237	
S1_32459047	2	25.3591237	
S1_91483027	2	25.4655066	
S1_82327059	2	25.8313603	
S1_19123049	2	27.1012016	
S1_147358035	2	27.2231528	
S1_87807054	2	27.5035266	
S1_93482040	2	27.7947888	
S1_1787059	2	28.3452475	Tác nhân điều biến sự tự thực 1 điều hoà sự tổn thương ADN của <i>Alligator sinensis</i> (DRAM1), ARN thông tin
S1_96902033	2	28.5413259	
S1_148336028	2	28.671196	
S1_33221020	2	28.671196	
S1_22227029	2	28.8862498	
EG0387	2	29.3716867	Yếu tố vận chuyển nitrat <i>Solanum tuberosum</i> 1.7-tương tự (LOC102595468), ARN thông tin
S1_73884050	2	29.9902434	
S1_87283016	2	30.2963658	
EG0075	2	30.5046992	LOC104104277 không đặc trưng

Xác định gen đánh dấu (Tên)	Nhóm liên kết	Vị trí	Gen tiềm năng
			(LOC104104277) <i>Nicotiana tomentosiformis</i> , ARN thông tin
S1_123945039	2	30.7345842	
S1_11829060	2	30.8495268	<i>Gossypium raimondii</i> protein tương tự At1g67900 chứa miền BTB/POZ (LOC105785819), biến thể phiên mã X2, ARN thông tin
S1_9324035	2	30.8495268	
S1_25202031	2	32.0033729	
S1_821031	2	32.4795634	
S1_106431037	2	32.8465359	
S1_106444061	2	33.9132025	
S1_13214061	2	34.1696128	
S1_146447048	2	34.1696128	
S1_77887034	2	34.1696128	
M364	2	34.3481842	Gen <i>Eustoma exaltatum</i> subsp. <i>russellianum</i> EgFLC đối với protein tương tự locus ra hoa C
S1_74154018	2	34.5316705	Gen <i>Eustoma exaltatum</i> subsp. <i>russellianum</i> EgFLC đối với protein tương tự locus ra hoa C
S1_818061	2	34.6234136	
S1_87134020	2	34.6234136	
S1_94713045	2	34.6234136	
S1_7596056	2	34.8936839	
S1_74857018	2	34.9814032	
S1_116205031	2	35.0698987	
S1_124042040	2	35.0698987	
S1_25957031	2	35.2468899	

Xác định gen đánh dấu (Tên)	Nhóm liên kết	Vị trí	Gen tiềm năng
S1_132575046	2	35.4320751	
S1_76085030	2	35.7291048	
S1_119861024	2	36.1638874	
EG0251	2	36.4455775	histidin kinaza 3 của <i>Solanum lycopersicum</i> (LOC101247719), ARN thông tin
S1_107206032	2	36.6378852	
S1_10323014	2	36.9440077	
S1_120016062	2	36.9440077	
S1_144019030	2	37.2700946	
S1_116491060	2	37.3700946	
S1_3153042	2	37.6379518	
S1_126482027	2	37.7272375	
S1_145987039	2	37.7272375	đồng JGIBAIF-21A8 của <i>Sporobolomyces roseus</i>
S1_82366053	2	37.7272375	
S1_87161029	2	37.7272375	
S1_95462030	2	37.8149568	GH15291 của <i>Drosophila grimshawi</i> (Dgri\GH15291), ARN thông tin
S1_102889027	2	38.0091315	
S1_18474044	2	38.2014392	
S1_101739044	2	39.3221289	
S1_88239020	2	39.8028981	
S1_97044021	2	40.5381922	
S1_105014027	2	40.8013501	
S1_130428020	2	40.8013501	
S1_142182032	2	40.8013501	
S1_27670063	2	40.921832	
S1_103249035	2	41.0437833	

Xác định gen đánh dấu (Tên)	Nhóm liên kết	Vị trí	Gen tiềm năng
S1_85145041	2	41.4478237	
S1_138550028	2	41.7603237	
S1_15369024	2	42.8129552	
S1_115528043	2	43.4512531	
S1_3171045	2	44.2355668	
S1_99369052	2	45.1284240	

Theo một số phương án làm ví dụ, QTL hoặc phần của nó tạo ra sự độc lập với quá trình xuân hoá có liên quan đến ít nhất một gen đánh dấu nằm trên nhóm liên kết 2 của *E. exaltatum* với khoảng cách kéo căng ở vị trí từ 30 đến 40cM. Theo các phương án nhất định, ít nhất một gen đánh dấu được chọn từ các gen đánh dấu được liệt kê trong Bảng 2 dưới đây. Theo các phương án này, ít nhất một gen đánh dấu có trình tự axit nucleic nêu trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO:1 đến 42. Mỗi khả năng thể hiện một phương án riêng biệt của sáng chế.

Bảng 2: Các gen đánh dấu liên quan đến QTL tạo ra sự độc lập với quá trình xuân hoá (ở vị trí từ 30 đến 40cM)

Xác định gen đánh dấu di truyền (Tên)	Nhóm liên kết	Vị trí	LOD	SEQ ID NO.
S1_73884050	2	29.9902434	4,74	1
S1_87283016	2	30.2963658	7,10	2
EG0075	2	30.5046992	10,28	3
S1_123945039	2	30.7345842	6.65	4
S1_11829060	2	30.8495268	7,28	5
S1_9324035	2	30.8495268	5,79	6
S1_25202031	2	32.0033729	7,63	7
S1_821031	2	32.4795634	10,46	8
S1_106431037	2	32.8465359	9,46	9
S1_106444061	2	33.9132025	10,02	10

Xác định gen đánh dấu di truyền (Tên)	Nhóm liên kết	Vị trí	LOD	SEQ ID NO.
S1_13214061	2	34.1696128	17,01	11
S1_146447048	2	34.1696128	15,84	12
S1_77887034	2	34.1696128	18,03	13
M364	2	34.3481842	19,08	14
S1_74154018	2	34.5316705	21,71	15
S1_818061	2	34.6234136	16,68	16
S1_87134020	2	34.6234136	18,44	17
S1_94713045	2	34.6234136	19,17	18
S1_7596056	2	34.8936839	13,29	19
S1_74857018	2	34.9814032	11,05	20
S1_116205031	2	35.0698987	12,59	21
S1_124042040	2	35.0698987	10,68	22
S1_25957031	2	35.2468899	13,36	23
S1_132575046	2	35.4320751	10,92	24
S1_76085030	2	35.7291048	11,14	25
S1_119861024	2	36.1638874	5,91	26
EG0251	2	36.4455775	16,82	27
S1_107206032	2	36.6378852	12,06	28
S1_10323014	2	36.9440077	12,73	29
S1_120016062	2	36.9440077	14,36	30
S1_144019030	2	37.2700946	13,04	31
S1_116491060	2	37.3700946	14,83	32
S1_3153042	2	37.6379518	13,09	33
S1_126482027	2	37.7272375	11,53	34
S1_145987039	2	37.7272375	12,73	35
S1_82366053	2	37.7272375	14,49	36
S1_87161029	2	37.7272375	13,49	37
S1_95462030	2	37.8149568	13,78	38

Xác định gen đánh dấu di truyền (Tên)	Nhóm liên kết	Vị trí	LOD	SEQ ID NO.
S1_102889027	2	38.0091315	9,59	39
S1_18474044	2	38.2014392	12,80	40
S1_101739044	2	39.3221289	5,88	41
S1_88239020	2	39.8028981	4,00	42

Đơn vị di truyền “QTL” thể hiện vùng trên hệ gen có liên quan trực tiếp đến tính trạng số lượng kiểu hình, yêu cầu của cây hoa cát tường về quá trình xuân hoá để kết trái sớm và ra hoa theo sáng chế. QTL khác với đơn vị di truyền “gen”, mà trên đó sự biểu hiện của kiểu hình phụ thuộc vào số lượng lớn các yếu tố có thể không dự đoán được. Vài gen đánh dấu của QTL được xác định trong sáng chế đã được phát hiện là nằm trong các gen đã biết (xem Bảng 1). Các gen này có thể đóng vai trò hoặc có thể không đóng vai trò trong tính trạng thừa kế QTL của sự độc lập với quá trình xuân hoá, được bộc lộ lần đầu tiên bởi sáng chế.

Tính trạng đặc hiệu có liên quan đến một hoặc nhiều gen đánh dấu cụ thể. Các gen đánh dấu được bộc lộ trong sáng chế thể hiện vị trí của QTL và ngoài ra, có tương quan với sự có mặt của tính trạng kiểu hình đặc hiệu của sự độc lập với quá trình xuân hoá ở cây trồng. Cần lưu ý rằng các gen đánh dấu của hệ gen kế tiếp thể hiện vị trí của QTL trên hệ gen về nguyên tắc là tùy ý hoặc không hạn chế. Nói chung, vị trí của QTL được thể hiện bởi dãy gen đánh dấu kế tiếp có sự tương quan thống kê với tính trạng kiểu hình. Khi gen đánh dấu được tìm thấy bên ngoài dãy đó (nghĩa là gen đánh dấu mà có điểm số LOD thấp hơn ngưỡng nhất định, điều này cho thấy rằng gen đánh dấu ở cách xa làm cho sự tái tổ hợp trong vùng giữa gen đánh dấu này và QTL xảy ra rất thường xuyên mà sự có mặt của gen đánh dấu không tương quan theo cách có ý nghĩa về mặt thống kê với sự có mặt của kiểu hình) các đường biên của QTL được thiết lập. Do đó, cũng có thể cho biết vị trí của QTL bởi các gen đánh dấu khác nằm trong vùng xác định. Các điểm số LOD của các gen đánh dấu làm ví dụ của sáng chế được nêu trong Bảng 2 trên đây.

Theo phương án bổ sung của sáng chế, các gen đánh dấu hệ gen kế tiếp cũng có thể được sử dụng để thể hiện sự có mặt của QTL (và do đó là kiểu hình) ở cây riêng rẽ, nghĩa là chúng có thể được sử dụng trong các quy trình chọn lọc được trợ giúp bởi gen

đánh dấu (MAS). Nói chung, số lượng gen đánh dấu hữu ích tiềm năng bị giới hạn, nhưng số lượng lớn gen đánh dấu cũng có thể được sử dụng. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể xác định một cách dễ dàng các gen đánh dấu bổ sung theo nội dung được bộc lộ trong sáng chế. Gen đánh dấu bất kỳ được liên kết với QTL, ví dụ, nằm trong các đường biên vật lý của vùng hệ gen được mở rộng bởi các gen đánh dấu có các điểm số LOD được thiết lập cao hơn ngưỡng nhất định, do đó cho biết rằng không có hoặc có rất ít sự tái tổ hợp giữa gen đánh dấu và QTL xảy ra trong khi lai chéo; cũng như gen đánh dấu bất kỳ theo sự mất cân bằng liên kết đối với QTL có thể được sử dụng trong các quy trình MAS. Do đó, các gen đánh dấu được xác định trong sáng chế có liên quan đến QTL, cho biết gen đánh dấu S1_74154018, chỉ là các ví dụ về gen đánh dấu thích hợp để sử dụng trong các quy trình MAS. Ngoài ra, khi QTL hoặc phần tạo tính trạng đặc hiệu của nó, được thâm nhập vào trong nền tảng di truyền khác (nghĩa là vào trong hệ gen của các loài thực vật khác), tiếp theo một số gen đánh dấu có thể không được tìm thấy hơn nữa trong thể hệ con cháu mặc dù tính trạng có mặt trong đó, cho biết rằng các gen đánh dấu như vậy là ở bên ngoài vùng hệ gen mà thể hiện phần tạo ra tính trạng đặc hiệu của QTL chỉ trong dòng bố-mẹ ban đầu và nền tảng di truyền mới có tổ chức hệ gen khác nhau.

Theo các phương án nhất định, các gen đánh dấu liên quan đến QTL của sáng chế được liệt kê trong Bảng 1. Theo phương án khác, các gen đánh dấu liên quan đến QTL của sáng chế được liệt kê trong Bảng 2, có trình tự axit nucleic được nêu trong SEQ ID NO:1 - 42. Theo một số phương án làm ví dụ, QTL hoặc phần của nó có liên quan đến gen đánh dấu được chọn từ nhóm gồm có gen đánh dấu EG0075, có trình tự axit nucleic được nêu trong SEQ ID NO:3; gen đánh dấu S1_74154018 có trình tự axit nucleic được nêu trong SEQ ID NO:15 và gen đánh dấu S1_18474044 có trình tự axit nucleic được nêu trong SEQ ID NO:40. Mỗi khả năng thể hiện một phương án riêng biệt của sáng chế.

Theo một số phương án làm ví dụ, QTL hoặc phần của nó có liên quan đến gen đánh dấu S1_74154018. Theo các phương án nhất định, gen đánh dấu có trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO:15.

Quá trình nhập gen của QTL vào hệ gen của các loài cây trồng *E. grandiflorum* làm cho các cây này kết trái sớm và phát triển các cuống hoa mà không cần phải cho tiếp xúc trước tiên với nhiệt độ thấp. Bất ngờ là quá trình nhập gen có tác động gây hại

ở mức nhỏ hoặc không có tác động gây hại đối với mẫu sinh trưởng và các hoa được tạo ra. Ngoài ra, quá trình nhập gen không chỉ tác động đến yêu cầu xuân hoá mà còn làm cho số lượng cuống hoa gia tăng/cây trong giai đoạn đâm chồi nảy lộc hoa thứ hai thường được gây ra trong quá trình sinh trưởng thương mại của cây hoa cát tường. Hai tính trạng này cùng với nhau làm giảm chi phí liên quan đến sự sinh trưởng trong nông nghiệp và nâng cao hiệu suất tạo ra giá trị thương mại đáng kể.

Việc đưa vào yếu tố di truyền chứa QTL hoặc phần của nó sẽ loại bỏ nhu cầu xuân hoá đối với cây hoa cát tường để kết trái sớm có thể được thực hiện bởi phương pháp bất kỳ như đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Cần hiểu một cách rõ ràng rằng trong *E. grandiflorum* được tạo ra, đoạn chứa QTL không có trong nền tảng tự nhiên của nó.

Trình tự axit nucleic (tốt hơn là ADN) chứa QTL của sáng chế hoặc phần bất kỳ của nó có thể làm giảm hoặc loại trừ yêu cầu xuân hoá như được bộc lộ trong bản mô tả này có thể được sử dụng để tạo ra cây cảnh *E. grandiflorum*. Theo các phương án nhất định, QTL được đưa vào *E. grandiflorum* cần có quá trình xuân hoá để kết trái sớm và ra hoa thích hợp, thường là giống thích hợp để sinh trưởng thương mại. Theo sáng chế, trình tự axit nucleic thu được từ cây thể cho *E. exaltatum*.

QTL hoặc phần của nó tạo ra sự độc lập với quá trình xuân hoá có thể được phân lập từ cây thể cho bằng cách sử dụng phương pháp bất kỳ như đã biết trong lĩnh vực này.

Trình tự của QTL hoặc phần của nó tạo ra sự độc lập với quá trình xuân hoá có thể được chuyển vào cây hoa cát tường thể nhận bằng phương pháp bất kỳ như đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Theo các phương án nhất định, QTL hoặc phần của nó có thể được đưa vào bằng cách lai chéo cây thể cho QTL với cây hoa cát tường thể nhận, cụ thể là *E. grandiflorum* (nghĩa là, bằng phương pháp nhập gen). Theo cách khác, trình tự axit nucleic được phân lập chứa QTL hoặc phần của nó có thể được đưa vào bằng phương pháp biến nạp như được mô tả dưới đây. Phương pháp biến nạp tùy ý sau khi chọn lọc các cây con cháu chứa QTL và có sự độc lập với quá trình xuân hoá.

QTL của sáng chế có thể được phân lập và trình tự axit nucleic của nó có thể được xác định bằng phương pháp bất kỳ như đã biết đối với người có hiểu biết trung

binh trong lĩnh vực này. Ví dụ, trình tự axit nucleic chứa QTL hoặc phân tạo ra sự độc lập với quá trình xuân hoá của nó có thể được phân lập từ cây thể cho *E. exaltatum* bằng cách tạo đoạn hệ gen của cây này và chọn các đoạn này chứa một hoặc nhiều gen đánh dấu của QTL được bộc lộ trong bản mô tả này. Tiếp theo hoặc theo cách khác, các trình tự của gen đánh dấu (hoặc các phần của nó) của QTL có thể được sử dụng làm các đoạn mồi khuếch đại, bằng cách sử dụng, ví dụ, phản ứng PCR, để khuếch đại trình tự axit nucleic chứa QTL từ mẫu axit nucleic hệ gen hoặc mảnh hệ gen thu được từ cây này. Sau đó, trình tự đã khuếch đại có thể được tinh chế để thu được QTL phân lập. Trình tự nucleotit của QTL và/hoặc của các gen đánh dấu bổ sung bất kỳ có trong đó, có thể thu được sau đó bằng các phương pháp giải trình tự tiêu chuẩn.

Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất polynucleotit được phân lập có trình tự axit nucleic tạo ra sự độc lập với quá trình xuân hoá, trong đó trình tự axit nucleic thu được từ đoạn nhiễm sắc thể tương đương với nhóm liên kết 2 của cây *E. exaltatum*, trong đó cây *E. exaltatum* không cần phải có quá trình xuân hoá để kết trái sớm và ra hoa.

Việc biến nạp cây với trình tự axit nucleic được phân lập thường bao gồm cấu trúc của vật truyền biểu hiện mà sẽ thực hiện chức năng trong tế bào thực vật. Theo bản mô tả của sáng chế, vật truyền như vậy chứa QTL của sáng chế hoặc phần của nó. Thông thường, vật truyền chứa QTL hoặc phần của nó dưới sự kiểm soát hoặc được liên kết khi hoạt động với phần tử điều hoà. Theo các phương án nhất định, phần tử điều hoà được chọn từ nhóm gồm gen khởi đầu và gen tăng cường và trình tự kết thúc dịch mã. (Các) vật truyền có thể ở dạng plasmit và có thể được sử dụng riêng rẽ hoặc kết hợp với các plasmit khác, trong phương pháp tạo ra cây *E. grandiflorum* chuyển gen mà không cần phải có quá trình xuân hoá để kết trái sớm bằng cách sử dụng các phương pháp biến nạp đã biết trong lĩnh vực này thích hợp để biến nạp trình tự axit nucleic vào cây hoa cát tường.

Các vật truyền biểu hiện có thể chứa ít nhất một gen đánh dấu (gen thông báo), được liên kết khi hoạt động với phần tử điều hoà (như gen khởi đầu) để cho phép tế bào đã biến nạp chứa gen đánh dấu để được thu hồi bằng cách chọn lọc âm tính (bằng cách ức chế sự sinh trưởng của tế bào không chứa gen đánh dấu có thể chọn lọc) hoặc bằng cách chọn lọc dương tính (bằng cách sàng lọc sản phẩm được mã hoá bởi gen đánh dấu). Nhiều gen đánh dấu có thể chọn lọc thường được sử dụng để biến nạp thực

vật là đã biết trong lĩnh vực này và bao gồm, ví dụ, các gen mã hoá đối với các enzym giải độc về mặt chuyển hoá tác nhân hoá học có thể chọn lọc có thể là thuốc kháng sinh hoặc thuốc diệt cỏ hoặc các gen mã hoá đích được biến đổi để không miễn cảm với chất ức chế. Vài phương pháp chọn lọc dương tính đã biết trong lĩnh vực này, như phương pháp chọn lọc manozơ. Theo cách khác, sự có mặt của QTL trong cây biến nạp được xác định bằng cách sử dụng các gen đánh dấu liên quan đến QTL làm đoạn dò.

Các phương pháp biến nạp tế bào thực vật với các trình tự axit nucleic theo sáng chế là đã biết trong lĩnh vực này. Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “sự biến nạp” hoặc “biến nạp” mô tả quy trình mà nhờ đó trình tự axit nucleic ngoại lai, như vật truyền, đi vào và làm thay đổi tế bào thể nhận thành tế bào được biến nạp, cải biến di truyền hoặc chuyển gen. Quá trình biến nạp có thể là ổn định, trong đó trình tự axit nucleic được gắn vào hệ gen thực vật và do đó thể hiện tính trạng ổn định và thừa kế hoặc tạm thời, trong đó trình tự axit nucleic được biểu hiện bởi tế bào được biến nạp nhưng không được gắn vào hệ gen và do đó thể hiện tính trạng tạm thời. Theo các phương án cụ thể, trình tự axit nucleic của sáng chế được biến nạp ổn định vào tế bào thực vật.

Có nhiều phương pháp khác nhau để đưa gen ngoại lai vào trong cả thực vật một lá mầm và thực vật hai lá mầm (ví dụ, tài liệu: Potrykus I. 1991. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 42:205-225; Shimamoto K. et al., 1989. *Nature* 338:274-276).

Các phương pháp chủ yếu gắn ổn định ADN ngoại lai vào ADN hệ gen của thực vật bao gồm hai phương pháp chính:

Chuyển gen qua trung gian *Agrobacterium*: Hệ thống qua trung gian *Agrobacterium* bao gồm việc sử dụng các vật truyền plasmit chứa các đoạn ADN xác định gắn vào ADN hệ gen của thực vật. Các phương pháp cấy mô thực vật thay đổi phụ thuộc vào các loài thực vật và hệ phân phối *Agrobacterium*. Phương pháp được sử dụng một cách rộng rãi là phương pháp đĩa lá, phương pháp này có thể được thực hiện với phần chiết mô bất kỳ để tạo ra nguồn tốt để khơi mào quá trình biệt hoá toàn bộ thực vật (Horsch et al., 1988. *Plant Molecular Biology Manual* A5, 1-9, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht). Phương pháp bổ sung sử dụng hệ phân phối *Agrobacterium* kết hợp với việc thẩm lọc chân không.

Chuyển axit nucleic trực tiếp: Có nhiều phương pháp khác nhau để chuyển axit nucleic trực tiếp vào tế bào thực vật. Trong quá trình đánh thủng bằng điện, các thể nguyên sinh được cho tiếp xúc nhanh với điện trường, mở lỗ nhỏ để cho phép ADN đi vào. Trong quá trình vi tiêm, axit nucleic được tiêm theo cách cơ học trực tiếp vào trong tế bào bằng cách sử dụng vi ống nhỏ giọt. Trong quá trình bắn vi hạt, axit nucleic được hấp phụ vào vi hạt như tinh thể magie sulfat hoặc hạt vonfram và vi hạt được gia tốc về mặt vật lý vào trong tế bào hoặc mô thực vật. Phương pháp khác để đưa axit nucleic vào thực vật là bằng cách siêu âm tế bào đích. Theo cách khác, việc dung hợp liposom hoặc tế bào trần được sử dụng để đưa các vật truyền biểu hiện vào trong thực vật.

Sau khi biến nạp mô đích của cây hoa cát tường, sự biểu hiện của các gen đánh dấu chọn lọc được mô tả trên đây cho phép chọn lọc ưu tiên các tế bào, mô và/hoặc thực vật được biến nạp, bằng cách sử dụng các phương pháp tái sinh và chọn lọc đã biết trong lĩnh vực này.

Theo cách khác, QTL hoặc phần của nó theo sáng chế có thể được biến nạp mà không cần phải có quá trình phân lập trước trình tự axit nucleic để tạo ra sự độc lập với quá trình luân hoá.

Theo một số phương án làm ví dụ, việc chuyển QTL hoặc phần của nó được thực hiện bằng quá trình nhập gen của đoạn nhóm liên kết của *E. exaltatum* vào *E. grandiflorum* cần phải có quá trình luân hoá để kết trái sớm và ra hoa.

Theo các phương án nhất định, phương pháp bao gồm các bước:

- a. tạo ra dòng cây bố-mẹ *E. grandiflorum* cần phải xử lý lạnh để kết trái sớm và ra hoa và cây *E. exaltatum* mà không cần phải có quá trình xử lý lạnh để kết trái sớm và ra hoa, cây *E. exaltatum* chứa QTL liên quan đến gen đánh dấu S1_74154018;
- b. lai chéo dòng cây bố-mẹ *E. grandiflorum* với cây *E. exaltatum* để tạo ra cây lai F₁;
- c. tự phối cây lai F₁ để tạo ra quần thể F₂;
- d. lai ngược quần thể F₂ với dòng bố-mẹ *E. grandiflorum* ít nhất một lần để tạo ra quần thể lai ngược;
- e. chọn từ quần thể lai ngược các cây *E. grandiflorum* chứa QTL liên quan đến

gen đánh dấu S1_74154018.

Theo các phương án nhất định, bước (d) lai ngược quần thể F₂ với dòng bố-mẹ *E. grandiflorum* được lặp lại 5 lần để tạo ra quần thể lai ngược 5.

Theo một số phương án, các cây *E. grandiflorum* chứa QTL liên quan đến gen đánh dấu S1_74154018 không cần phải có quá trình xuân hoá để kết trái sớm và ra hoa.

Việc chọn lọc cây *E. grandiflorum* chứa QTL liên quan đến gen đánh dấu S1_74154018 có thể được thực hiện bằng phương pháp bất kỳ như đã biết trong lĩnh vực này.

Theo một số phương án, việc chọn lọc cây chứa QTL bao gồm bước phát hiện sự có mặt của gen đánh dấu liên quan đến QTL được mô tả trong bản mô tả này.

Phương pháp phát hiện có thể bao gồm bước tạo ra oligonucleotit hoặc polynucleotit có khả năng lai trong các điều kiện lai nghiêm ngặt với trình tự axit nucleic của gen đánh dấu được liên kết với QTL, tốt hơn là được chọn từ các gen đánh dấu được xác định trong bản mô tả này như được liên kết với QTL, cho oligonucleotit hoặc polynucleotit tiếp xúc với axit nucleic hệ gen thu được từ cây của quần thể lai ngược và xác định sự có mặt của quá trình lai đặc hiệu của oligonucleotit hoặc polynucleotit với axit nucleic hệ gen.

Theo cách khác, khi trình tự nucleotit của QTL được xác định, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể thiết kế các đoạn dò lai đặc hiệu hoặc các oligonucleotit có khả năng lai trong các điều kiện lai nghiêm ngặt với trình tự axit nucleic của QTL và có thể sử dụng các đoạn dò lai như vậy trong các phương pháp phát hiện sự có mặt của QTL của sáng chế trong các cây hoa cát tường để được là độc lập với quá trình xuân hoá.

Cụm từ "các điều kiện lai nghiêm ngặt" để chỉ các điều kiện mà trong đó đoạn dò hoặc polynucleotit sẽ lai với trình tự đích của nó, thường là trong hỗn hợp phức hệ của các axit nucleic, nhưng nhất thiết không lai với các trình tự khác. Các điều kiện nghiêm ngặt là phụ thuộc trình tự và sẽ khác nhau trong các trường hợp khác nhau. Các trình tự dài hơn lai đặc hiệu ở nhiệt độ cao hơn. Hướng dẫn chuyên sâu để lai axit nucleic được tìm thấy trong ấn phẩm: Tijssen (Tijssen P. 1993 Hybridization With

Nucleic Acid Probes. Part I. Theory and Nucleic Acid Preparation. In: Laboratory Techniques in Biochemistry và Molecular Biology. Elsevier). Thông thường, các điều kiện lai nghiêm ngặt được chọn để nằm trong khoảng từ 5 đến 10°C thấp hơn so với điểm nóng chảy do nhiệt (T_m) đối với trình tự đặc hiệu ở độ pH có nồng độ ion xác định. T_m là nhiệt độ (trong nồng độ ion xác định, độ pH và nồng độ axit nucleic) mà ở đó 50% đoạn dò bù với đích lai với trình tự đích khi cân bằng (khi trình tự đích có mặt với lượng dư, ở T_m , 50% đoạn dò được chiếm giữ khi cân bằng). Các điều kiện nghiêm ngặt sẽ là các điều kiện mà trong đó nồng độ muối nhỏ hơn khoảng 1,0M ion natri, nồng độ ion natri thường là nằm trong khoảng từ 0,01 đến 1,0M (hoặc các muối khác) ở độ pH nằm trong khoảng từ 7,0 đến 8,3 và nhiệt độ ít nhất là khoảng 30°C trong các đoạn dò ngắn (ví dụ, từ 10 đến 50 nucleotit) và ít nhất là khoảng 60°C đối với các đoạn dò dài (ví dụ, lớn hơn 50 nucleotit). Các điều kiện nghiêm ngặt cũng có thể đạt được với việc bổ sung các chất làm mất ổn định như formamit. Để lai chọn lọc hoặc đặc hiệu, tín hiệu dương tính là ít nhất hai lần nền tảng, tốt hơn là 10 lần lai nền tảng. Các điều kiện lai nghiêm ngặt làm ví dụ thông thường là: 50% formamit, 5xSSC, và 1% SDS, ủ ở 42°C hoặc 5xSSC, 1% SDS, ủ ở 65°C, kèm rửa trong 0,2xSSC và 0,1% SDS ở 65°C. Đối với PCR, nhiệt độ khoảng 36°C là thông thường đối với quá trình khuếch đại nghiêm ngặt thấp, mặc dù nhiệt độ ủ có thể thay đổi nằm trong khoảng từ 32°C đến 48°C phụ thuộc vào chiều dài đoạn mồi. Các hướng dẫn bổ sung để xác định các tham số lai được đưa ra trong nhiều tài liệu tham chiếu, ví dụ ấn phẩm: Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel, et al. 1995.

Các ví dụ sau đây được thể hiện để minh họa đầu đủ hơn một số phương án của sáng chế. Tuy nhiên, không nên hiểu rằng, chúng sẽ làm giới hạn phạm vi bảo hộ rộng của sáng chế. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể dễ dàng tạo ra nhiều thay đổi và sửa đổi các nguyên lý được bộc lộ trong bản mô tả này mà không chệch khỏi phạm vi bảo hộ của sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Vật liệu và phương pháp

Vật liệu thực vật

Dự án hoa cát tường ở Robert H. Smith Faculty of Agriculture, Food and Environment, The Hebrew University of Jerusalem, bao gồm hàng trăm dòng nhân

giống khác nhau và các tài nguyên di truyền thu được từ hơn 50 cá thể lai thương mại từ sáu công ty nhân giống khác nhau cũng như *E. grandiflorum* và *E. exaltatum* kiểu đại thu được từ giống nguồn.

Tạo ra hạt giống và các điều kiện sinh trưởng của cây

Việc gieo hạt được thực hiện, không kể những địa điểm khác, trong Hishtil Ltd. Israel, ở các vườn ươm Nehalim (Israel) trong 360 hoặc 406 khay gieo hạt hoa cát tường tiêu chuẩn. Hạt giống được sinh trưởng ở các phòng của Hishtil Ltd. Company, Israel. Đến năm 2010, hạt giống được sinh trưởng trong vườn ươm Hishtil ở Nehalim và từ năm 2011 ở Susya (Israel). Hạt giống được sinh trưởng trong các điều kiện sinh trưởng của các cá thể lai thương mại tiêu chuẩn và các yêu cầu về nhiệt độ thấp (xuân hoá) của cây hoa cát tường tiêu chuẩn được đáp ứng.

Thông thường, việc chọn lọc và tạo ra hạt được thực hiện trong trang trại của Faculty of Agriculture, Food and Environment của Hebrew University of Jerusalem, đặt tại Rehovot, Israel. Mùa ra hoa thường xảy ra từ mùa xuân đến mùa hè (tháng tư đến tháng tám) phụ thuộc vào thời gian gieo hạt. Việc tưới tiêu và bón phân được thực hiện theo quy trình của cây hoa cát tường tiêu chuẩn và theo các điều kiện sinh trưởng và giai đoạn sinh trưởng. Quá trình xử lý bảo vệ cây trồng chỉ được thực hiện sau khi xuất hiện triệu chứng đặc hiệu và chỉ trước khi bắt đầu ra hoa. Hoa thứ nhất được chụp ảnh nhanh ở thực vật được sử dụng để mô tả đặc điểm kiểu hình. Việc thu hoạch được thực hiện ở lần ra hoa thứ hai.

Thụ phấn hoa và xử lý hạt

Tự thụ phấn:

1. Hoa nằm trong khoảng từ giai đoạn 3 (nụ bắt đầu phồng, cánh hoa cao hơn đài hoa) đến giai đoạn 6 (nhị hoa được thoát ra, đầu nhụy đóng kín, Fig.1) được bọc bằng túi giấy.
2. 5 đến 14 ngày sau khi hoa được bọc, mở túi và việc tự thụ phấn thủ công được thực hiện. Sau khi thụ phấn, hoa được bọc kín lại trong túi giấy.

Chỉ có hạt mà được tạo ra bằng việc tự thụ phấn thủ công được cho là hạt tự thụ phấn đúng.

Thụ phấn chéo:

1. Hoa ở giai đoạn 3 (nụ bắt đầu phồng, hoa cao hơn đài hoa, Fig.1) được mở thủ công và loại bỏ bao phấn. Bọc kín mỗi hoa được cắt xén trong túi giấy.
2. 7 đến 14 ngày sau khi loại bỏ bao phấn, mở túi giấy chứa mỗi hoa và phần hoa được áp dụng thủ công lên đầu nhụy bằng cách gắn bao phấn của cây đực vào đầu nhụy hoặc bằng cách sử dụng chổi được làm vô trùng bằng 70% etanol và được phủ với bao phấn. Sau khi thụ phấn thủ công, hoa được bọc kín lại trong túi giấy.

Sau 50 đến 75 ngày từ khi thụ phấn (cả đối với tự thụ phấn và thụ phấn chéo), thu hoạt quả vào trong túi giấy và giữ trong thiết bị ủ hoặc lò sấy ở 37 đến 45°C để làm khô hoàn toàn. Hạt được lưu trữ ở $\pm 7^{\circ}\text{C}$ và độ ẩm 30% cho đến khi gieo trồng.

Mô tả đặc điểm kiểu hình

Các tính trạng được mô tả trong bản mô tả này dựa vào nỗ lực kiểu hình mở rộng để mô tả đặc điểm nhiều tính trạng, dựa vào 113 tính trạng mà được chọn lọc để tạo ra hạng mục kiểu hình chi tiết để mô tả đặc điểm các quần thể di truyền.

Để tiêu chuẩn hoá các đặc điểm kiểu hình khác nhau, cần phải xác định ngôn ngữ chung của vài thuật ngữ:

Giai đoạn hoa: Chín giai đoạn phát triển khác nhau được xác định từ các giai đoạn chồi sớm đến hoá già, như được mô tả trên Fig.1. Giai đoạn 1: Chồi kín, đài hoa cao hơn (dài hơn) so với cánh hoa; Giai đoạn 2: Bắt đầu phồng chồi, đài hoa và cánh hoa sần sùi có cùng chiều dài; Giai đoạn 3: Chồi lớn, đài hoa ngắn hơn so với cánh hoa, chồi phồng; Giai đoạn 4: Cánh hoa bắt đầu mở ra, nhị chưa chín hoàn toàn; Giai đoạn 5: Hoa bắt đầu nở, các cánh hoa tách biệt, nhị chưa được phóng ra, nhụy bọc kín; Giai đoạn 6: Hoa nở, nhị được phóng ra, nhụy bọc kín; Giai đoạn 7: Nở hoa, nhị được phóng ra, nhụy mở; Giai đoạn 8: Hoa bắt đầu héo, cánh hoa tàn và bắt đầu khép lại; Giai đoạn 9: Hoá già.

Cành: chỉ có các cành với hai hoặc nhiều cặp lá được xác định là các cành.

Chồi hoa: chỉ có chồi hoa được mọc từ lá bắc và dài hơn 1cm được xác định là chồi hoa.

Thời gian ra hoa: ngày mà khi đó hoa thứ nhất đạt đến giai đoạn phát triển 6 (hoa mở, nhị hoa được xả ra, nhụy hoa đóng kín, Fig.1).

Thời gian thu hoạch: ngày mà khi đó hoa thứ hai đạt đến giai đoạn phát triển 7 (nở hoa, Fig.1).

Kết trái sớm: sự chuyển tiếp của cây từ sinh trưởng sinh dưỡng sang ra hoa được xác định theo vẻ bên ngoài và sự kéo dài của cuống (Fig.2). Mức độ kết trái sớm được xác định theo ba thời điểm khác nhau:

(a) Kết trái sớm ở tuần 18 [kết trái sớm (18)]: Tỷ lệ phần trăm của các cây kết trái sớm/dòng 18 tuần sau khi gieo trồng.

(b) Kết trái sớm ở tuần 20 [kết trái sớm (20)]: Tỷ lệ phần trăm của cây kết trái sớm/dòng 20 tuần sau khi gieo trồng.

(c) Kết trái sớm ở tuần 22 [kết trái sớm (22)]: Tỷ lệ phần trăm của cây kết trái sớm/dòng 22 tuần sau khi gieo trồng.

Các tính trạng liên quan đến giai đoạn đâm chồi nảy lộc thứ hai: số lượng tính trạng mà mô tả cây sau khi thu hoạch hoa của giai đoạn đâm chồi nảy lộc thứ nhất và trong quá trình sinh trưởng đến giai đoạn đâm chồi nảy lộc thứ hai của quá trình ra hoa.

(a) Sự sống của quá trình đâm chồi nảy lộc thứ hai [SF. survival]: Tỷ lệ phần trăm của cây/dòng mà sống sau khi thu hoạch và có quá trình đâm chồi nảy lộc thứ hai của hoa.

(b) Cuối đâm chồi nảy lộc thứ hai/cây [SF.S_PLN]: Số lượng cành/cây trong giai đoạn đâm chồi nảy lộc thứ hai.

(c) Dạng hoa thị trong giai đoạn đâm chồi nảy lộc thứ hai [SF.rosettin]: Tỷ lệ phần trăm của cây/dòng mà thể hiện dạng hoa thị và không kết trái sớm sau lần thu hoạch thứ nhất (Fig.2A).

(d) Các này đối với giai đoạn đâm chồi nảy lộc thứ hai [SF.days]: Số ngày tối thiểu/dòng từ lần thu hoạch thứ nhất đến thứ hai (thu hoạch quá trình đâm chồi nảy lộc thứ hai).

Kích cỡ của các cơ quan hoa: kích cỡ của các cơ quan hoa được đo bằng trực lẫn (trong năm 2011) hoặc bằng phân tích hình ảnh (trong năm 2012).

(a) Chiều dài cuống nhỏ [Pedicel.LN]: Chiều dài của giống mang hoa trên

cuồng chính, được đo bằng trục lẫn trong tất cả các mùa (Fig.3C).

Các phân tích kiểu hình được thực hiện qua bốn thử nghiệm chính:

Nhà kính năm 2011 – Các cây được sinh trưởng trong nước trong nhà kính làm bằng chất dẻo không có sự gia nhiệt trong thùng chứa tám lít. Môi trường sinh trưởng được sử dụng là “Odem 93” (Tuff Marom Golan Ltd., Israel) (2/3 đá tốp, 1/3 than bùn). Mỗi dòng nội phối tái tổ hợp (RIL) được gieo trồng trong ba đồ chứa được phân bố ngẫu nhiên trong nhà kính. Mỗi đồ chứa chứa năm bản sao RIL (tổng số gồm 15 bản sao/RIL). Ngoài ra, sáu bản sao từ mỗi RIL được gieo trồng trong một đồ chứa để nhân giống và mô tả đặc điểm trên mức độ họ. Tổng kích cỡ của nhà kính là 150m². Ngày gieo trồng là ngày 15 tháng 2 năm 2011; sự ra hoa được bắt đầu vào ngày 22 tháng 4 năm 2011.

Nhà kính năm 2012 – Các cây được gieo trồng theo cách giống nhau và trong cùng nhà kính như được mô tả đối với thử nghiệm năm 2011. Do thử nghiệm của năm này có các dòng lai ngược (BCL) F5BC1, do khoảng trống ràng buộc mỗi dòng chỉ được gieo trồng trong hai đồ chứa (tổng cộng 10 bản sao/dòng). Ngày gieo trồng là ngày 12 tháng 1 năm 2012; sự ra hoa được bắt đầu vào ngày 15 tháng 4 năm 2011.

Nhà lưới năm 2012 – Các cây được sinh trưởng trong nước trong nhà lưới trong các đồ chứa làm bằng chất dẻo một hàng chứa hai môi trường sinh trưởng pha chứa lớp đá tốp mỏng phủ lên lớp đá tốp thô. Sáu bản sao từ mỗi dòng được gieo trồng trong một địa điểm. Các cây được sinh trưởng ở mật độ 30 cây/m². Tổng kích cỡ của nhà lưới là 100m². Ngày gieo trồng là ngày 12 tháng 1 năm 2012; sự ra hoa được bắt đầu vào ngày 22 tháng 5 năm 2012.

Nhà kính SHTIL NETO năm 2013 – Các cây được sinh trưởng trong nhà kính làm bằng chất dẻo trong các khay gieo hạt lớn (1,5 inso) chứa than bùn. 177 dòng khác nhau (tổng số có 11 bản sao/dòng). Ngày gieo trồng – ngày 29 tháng 7 năm 2013; kết thúc kết trái sớm – ngày 20 tháng 10 năm 2013.

Các phân tích kiểu hình được thực hiện trong toàn bộ mùa sinh trưởng từ khi nảy mầm đến lúc thua hoạch. Phân tích chính được tập chung xung quanh thời gian ra hoa và được thực hiện như sau: ba lần một tuần (chủ nhật, thứ ba và thứ năm) cách xa các sự kiện ngày nghỉ cụ thể, v.v, hoa thứ nhất nở từ mỗi cây được ghi chép, chụp ảnh và loại bỏ. Các cây tiếp tục sinh trưởng và đạt đến thời gian thu hoạch (như được xác

định trên đây) được thu hoạch. Việc xác định kiểu hình của cây thu hoạch được thực hiện ở ngày thu hoạch và ở ngày tiếp theo. Các phân tích kiểu hình khác không được thực hiện liên quan đến các cây thu hoạch cũng như xác định kiểu hình hoa cắt cành đặt vào bình và việc nhân giống được thực hiện trong các ngày khác nhau đến ngày thu hoạch.

Chiết ADN

Lá cây non tươi được thu hoạch và làm đông lạnh ngay lập tức bằng nitơ lỏng. Mô đông lạnh được giữ trong -80°C cho đến khi chiết xuất ADN. Việc chiết xuất ADN được thực hiện bằng cách sử dụng quy trình vi điều chế tiêu chuẩn (Fulton T M et al., 1995. Plant Mol. Biol. Report. 13: 207–209).

Phân tích QTL

Các phân tích lập bản đồ QTL được thực hiện trên dữ liệu hàng trung bình đối với quần thể và thử nghiệm riêng biệt. Các kiểu gen dị hợp tử đối với gen đánh dấu đặc hiệu trong RIL được loại bỏ ra khỏi phân tích gen đánh dấu. Bằng cách lấy trị số trung bình điểm số tính trạng/dòng trong cả thử nghiệm các tính trạng thứ tự và nhị phân (có/không có kiểu hình) được biến nạp đối với các tính trạng với bản chất danh nghĩa. Thử nghiệm Shapiro-Wilk được thực hiện để thử nghiệm giả định chuẩn của mỗi sự phân bố tính trạng và các tính trạng được phân loại như các tính trạng thể hiện sự phân bố kiểu hình theo tiêu chuẩn đối lại không tiêu chuẩn. Các điểm số LOD được tính toán bằng các phương pháp sau đối với sự phân bố kiểu hình tiêu chuẩn và không theo tiêu chuẩn (Borman K W và Sen S., 2009. A guide to QTL mapping with R/qtl 1st ed. (Springer New York)). Nói chung, đối với các tính trạng được phân bố theo tiêu chuẩn, thử nghiệm tỷ lệ thích hợp $\log_{10}$, mà tương tự với ANOVA một đường (hồi quy gen đánh dấu), được áp dụng, trong khi thống kê thử nghiệm Kruskal-Wallis được chia theo $2(\ln 10)$ được sử dụng đối với các tính trạng phân bố không theo tiêu chuẩn. Tất cả tính toán được thực hiện bởi phần mềm thống kê R. Hiệu quả của QTL được tính toán là tỷ lệ phần trăm khác nhau được gán cho alen kiểu đại đồng hợp tử trong RIL hoặc alen dị hợp tử trong BCL.

$$\text{Hiệu quả (RIL)} = \frac{\mu(\text{exs}) - \mu(\text{gra})}{\mu(\text{exs})} \times 100$$

$$\text{Hiệu quả (BCL)} = \frac{\mu(\text{het}) - \mu(\text{gra})}{\mu(\text{het})} \times 100$$

trong đó: $\mu(\text{gra})$ = trị số trung bình tính trạng của các cây *E. grandiflorum* đồng hợp tử đối với QTL; $\mu(\text{exs})$ = trị số trung bình tính trạng của các cây *E. exaltatum* đồng hợp tử đối với QTL; $\mu(\text{het})$ = trị số trung bình tính trạng đối với các cây dị hợp tử đối với QTL.

Việc gán QTL được thực hiện trong vài giai đoạn: 1. Sự liên kết kiểu hình kiểu gen cao hơn điểm số ngưỡng 2,5 LOD trong ít nhất một trong số các thử nghiệm trong một trong số các quần thể được chọn lọc. 2. Do ngưỡng có thể được giảm do sự phát hiện trước về QTL (Lander E S và Schork N J., 1994. Science 265(5181): 2037–2048.), tất cả các thử nghiệm đều thể hiện điểm số cao hơn 1 LOD (trị số <0,031 p) đối với các liên kết được chọn ở giai đoạn 1 được thể hiện như các thử nghiệm thể hiện QTL. 3. Nếu số lượng gen đánh dấu lân cận có liên quan đến cùng tính trạng, QTL chính đối với tính trạng được chọn dựa vào số lượng thử nghiệm trong đó liên kết được quan sát và theo các điểm số LOD. Nếu QTL chỉ được phát hiện trong một thử nghiệm nhà lưới, nó được giảm do thử nghiệm này có các đoạn lặp sinh học giảm do mô hình thử nghiệm (chỉ có một đồ thị/dòng) và/hoặc số lượng cây lớn hơn bị tác động bởi sự phá hoại do bọ trĩ và do đó ít tin cậy hơn.

Đối với bản đồ QTL, tính trạng được chọn để thể hiện QTL trong trường hợp mà trong đó một vài tính trạng liên quan chặt chẽ được liên kết với cùng locus. Tính trạng được gán là tính trạng thể hiện ý nghĩa trong nhiều thử nghiệm hoặc tính trạng với điểm số trung bình cao hơn LOD trong trường hợp về cùng số lượng thử nghiệm có ý nghĩa. Tác dụng cần được thể hiện trên bản đồ được chọn theo thứ tự sau đây trong trường hợp về vài thử nghiệm có ý nghĩa: 1. Quần thể màu trắng, 2012; 2. Quần thể màu trắng, 2011; 3. Quần thể màu hồng, 2012; 4. Quần thể màu hồng, 2011.

Ví dụ 1: Các dòng nội phối tái tổ hợp (RIL)

Trong năm 2006, hơn 140 phép lai chéo được thực hiện giữa các dòng thuần khác nhau thu được từ các thể lai thương mại và từ số truy cập kiểu đại của *E. grandiflorum* và *E. exaltatum* (sự thu gom của Hebrew University of Jerusalem, Israel). Đặc điểm kiểu hình của quần thể F₁ và các bố-mẹ của chúng, và năm 2007, cho

phép chọn hai quần thể có dòng nội phối tái tổ hợp giữa các loài (RIL) được sử dụng trong nghiên cứu được thể hiện trong bản mô tả này. Việc chọn lọc chủ yếu được dựa vào: (A) Tính đồng hợp tử của các dòng bố-mẹ như được quan sát dựa vào kiểu hình; (B) Tính đồng nhất của F_1 ; và (C) các đặc điểm kiểu hình của các dòng bố-mẹ. Cuối cùng, hai quần thể nhập gen di truyền được chọn đối với trong thử nghiệm sâu.

Hai quần thể RIL được tạo cấu trúc từ phép lai chéo giữa *E. exaltatum* và hai dòng *E. grandiflorum* từ nền tảng gieo trồng của các hoa màu hồng và màu trắng. Các đặc điểm chính của các dòng bố-mẹ là: *E. exaltatum*: hoa màu tím đơn nhỏ, sinh trưởng rậm rạp, ra hoa muộn, sự di chuyển nhịp sinh học mạnh, lá hẹp và cuống hẹp và không có xu hướng tạo ra dạng hoa thị. Việc truy cập được sử dụng đối với các phép lai chéo thể hiện tính đồng nhất rất cao, mà thể hiện nó là dòng thuần đồng hợp tử. *E. grandiflorum* màu hồng: hoa đơn có kích cỡ trung bình, màu hồng đậm, sự chiếm ưu thế của đỉnh yếu, giống ngắn, sản lượng hoa cao, có xu hướng tạo dạng hoa thị và nói chung là sự sinh trưởng thay đổi điển hình vào mùa hè (tính chịu nhiệt tốt, sinh trưởng chậm). *E. grandiflorum* màu trắng: hoa trắng kép lớn, nhiều cánh hoa, sự chiếm ưu thế đỉnh mạnh, sản lượng hoa thấp và nói chung là sự sinh trưởng thay đổi điển hình vào mùa đông (các yêu cầu về nhiệt độ ở mức độ vừa phải để kết trái sớm, sinh trưởng nhanh). Các dòng F_5 RIL được lai ngược với bố-mẹ *E. grandiflorum* của chúng để tạo ra các dòng lai ngược (BCL). Phần mô tả dạng sơ đồ của các cấu trúc của hai RIL được thể hiện trên Fig.4.

Ví dụ 2: Các dữ liệu về kiểu hình

Các quan sát về kiểu hình được thực hiện đối với hai thể hệ riêng biệt trong ở hai địa điểm. Vào năm 2011, hai quần thể RIL ở một địa điểm được mô tả đặc điểm; vào năm 2012, hai quần thể RIL và hai quần thể BCL ở hai địa điểm được mô tả đặc điểm (Bảng 3). Các thử nghiệm thường có các dòng bố-mẹ và các thể hệ F_1 và việc phân tích thống kê được dựa vào nhiều đoạn lặp được gieo trồng theo cách ngẫu nhiên (xem phần vật liệu và phương pháp trên đây).

Bảng 3: Bản tổng kết về việc thu gom kiểu hình

Dạng quần thể*	Năm	Địa điểm	Số lượng tính trạng	Số lượng nhóm tính trạng**	Các bản sao trung bình/kiểu
----------------	-----	----------	---------------------	----------------------------	-----------------------------

					gen
RIL	2011	Nhà kính	89	8	13,9
RIL, BCL	2012	Nhà kính	104	8	10,1
RIL, BCL	2012	Nhà lưới	83	6	4,9
Tổng số tính trạng thông thường đối với tất cả các thử nghiệm			81	6	

* Tất cả thử nghiệm có cả các dòng bố-mẹ, F_1 ban đầu và giống lai đối chứng.

** Các tính trạng khác nhau được gán cho các nhóm kiểu hình như được mô tả trong hạng mục kiểu hình (xem phần vật liệu và phương pháp).

Ví dụ 3: Bản đồ di truyền

Hai bản đồ di truyền được tạo cấu trúc với các gen đánh dấu di truyền sẵn có đối với mỗi quần thể RIL.

Các dữ liệu dạng đa hình ADN được tạo ra bằng cách sử dụng nền tảng kiểu gen theo giải trình tự (GBS) sẵn có như dịch vụ ở Cornell University tại the Institute of Genomic Research (Elshire R J et al. 2011. PLoS One 6:e19379). Bằng cách sử dụng nền tảng như vậy, việc phát hiện gen đánh dấu và ghi điểm số xảy ra đồng thời và hàng nghìn SNP mà được chấp nhận qua quá trình kiểm soát chất lượng nghiêm ngặt được phát hiện. Các SNP được lập bản đồ bằng cách sử dụng các dụng cụ tạo cấu trúc bản đồ di truyền của R/qtl được phát triển và được tuân theo bởi Karl W. Broman từ University of Wisconsin-Madison, Department of Biostatistics & Medical Informatics và được mô tả trong ấn phẩm: Technical Report # 214 (In: Broman K W và Sen S A. Guide to QTL Mapping with R/qtl. New York: Springer; 2009). Bản đồ về các phân đoạn tái tổ hợp được ước tính (hình tam giác bên trái phía trên) và các điểm số LOD (hình tam giác bên phải phía dưới) đối với tất cả các cặp gen đánh dấu được tạo ra (Fig.5). Khoảng 4500 gen đánh dấu thu được 69 nhóm liên kết gồm có các gen đánh dấu mà ở đó khoảng cách dài nhất giữa các gen đánh dấu lân cận được cố định nhỏ hơn 20% tái tổ hợp (Fig.6). Phần cắt này được chọn để ngăn sự hợp nhất lỗi của các nhóm liên kết.

Ví dụ 4: Xác định QTL tạo ra sự độc lập với quá trình xuân hoá

QTL được xác định bằng cách sử dụng khả năng thông tin sinh học của Phenome

Networks (Rehovot, Israel) để phát triển một bộ trương trình để thể hiện các chi tiết về các thành phần khác nhau của kiểu hình phức để khám phá kiến thức sinh học phức tạp và bị ẩn (Zamir D., 2013. PLoS Biol. 11: e1001595). Phenome Network khiến cho việc sử dụng nhiều hàm R và các thuật toán phù hợp với các mô hình thống kê thích hợp với cấu trúc di truyền của các quần thể. Dựa vào Fig.7, biết được rằng phần lớn QTL dùng cho quá trình xuân hoá (Lod 20) được định vị trên nhóm liên kết 2 khi được phân tích trong thử nghiệm trong Shtil Neto vào năm 2013 chỉ dựa vào các RI đồng hợp tử từ hai quần thể được tổ hợp. Hình vẽ chi tiết về nhóm liên kết 2 (Fig.8) thể hiện rằng các đỉnh tác dụng QTL trong khoảng cách nằm trong khoảng từ 30 đến 40cM trên nhóm liên kết đó.

Một trong số các gen đánh dấu mạnh nhất tác động lên kiểu hình kết trái sớm là S1_74154018 (có trình tự axit nucleic được nêu trong SEQ ID NO:15). Như được thể hiện trên Fig.9, trong nhóm cây có kiểu gen 1 (đồng hợp tử đối với alen *E. grandiflorum*) khoảng 15% cây thể hiện kết trái sớm và phần còn lại 85% cây tạo ra dạng hoa thị và không ra khoa, trong khi trong nhóm có kiểu gen 3 (đồng hợp tử đối với alen *E. exaltatum*) gần bằng 90% cây kết trái sớm, trợ giúp vị trí của QTL trên nhóm liên kết 2. Bảng 4 đưa ra bản tổng kết về dữ liệu kết trái sớm dựa vào tất cả các thử nghiệm được thực hiện đối với các RI đồng hợp tử thể hiện khả năng lặp lại của tác dụng. Các kết quả tương tự thu được với các gen đánh dấu được định vị gần hơn với các mép của QTL được xác định, như được thể hiện trên Fig.15 đối với gen đánh dấu di truyền EG_0075 (có trình tự axit nucleic được nêu trong SEQ ID NO:3) nằm ở vị trí 30.5046992 và trên Fig.16 đối với gen đánh dấu di truyền S1_18474044 (có trình tự axit nucleic được nêu trong SEQ ID NO:40) nằm ở vị trí 38.2014392.

Bảng 4: Bản tổng kết về dữ liệu kết trái sớm đối với các RI đồng hợp tử *Eustoma* so với gen đánh dấu S1_74154018

Vị trí	Quần thể	Kiểu gen 1 (số cây)	Kiểu gen 3 (số cây)	% kiểu gen 1 kết trái sớm (trung bình)	% kiểu gen 3 kết trái sớm (trung bình)	Tỷ lệ F	Prob>F
ShtilNeto	P-RIL	23	7	11,06	77,23	41,94	<0,0001
ShtilNeto	W-RIL	25	35	20,66	90,9	104,3	<0,0001

ShtilNeto	P+W- RIL	48	42	16,06	88,62	179,3	<0,0001
-----------	-------------	----	----	-------	-------	-------	---------

P-Bố-mẹ màu hồng; W-Bố-mẹ màu trắng; RIL - Dòng nội phối tái tổ hợp

Ngoài mong đợi, các quan sát rất tương tự liên kết QTL với sự độc lập với quá trình xuân hoá được tìm thấy đối với các thể lai dị hợp tử RI. Trong trường hợp hạt của các thể lai chứa RI với bố-mẹ *E. grandiflorum* tương ứng được nảy mầm. Fig.10 thể hiện rằng phần lớn QTL để xuân hoá (Lod 20) được định vị trên nhóm liên kết 2 như được thể hiện đối với quần thể đồng hợp tử (Fig.7) và tác dụng QTL đỉnh trong khoảng từ 30 đến 40cM trên nhóm liên kết đó (Fig.11). Fig.12 thể hiện rằng dựa vào các cây có kiểu gen 1 (đồng hợp tử đối với alen *E. grandiflorum* của S1_74154018) khoảng 40% cây được kết trái sớm và 60% cây còn lại tạo ra dạng hoa thị và không ra hoa, trong khi trong nhóm có kiểu gen 2 (cây dị hợp tử chứa một alen *E. grandiflorum* và một alen *E. exaltatum* của S1_74154018) gần bằng 90% cây được kết trái sớm. Bảng 5 đưa ra bản tổng kết về các dữ liệu kết trái sớm dựa vào tất cả các thử nghiệm được thực hiện với các RI dị hợp tử thể hiện khả năng lặp lại tác dụng.

Các kết quả này rõ ràng chứng minh rằng QTL liên quan đến khả năng không dễ xuân hoá là chiếm ưu thế, cho đến nay trái với các gen liên quan đến quá trình xuân hoá đã biết mà được thể hiện chỉ có hiệu quả khi ở trạng thái đồng hợp tử.

Bảng 5: Tổng kết về dữ liệu kết trái sớm đối với các RI dị hợp tử *Eustoma* liên quan đến gen đánh dấu S1_74154018

Vị trí	Quần thể	Kiểu gen 1 (số cây)	Kiểu gen 2 (số cây)	% kiểu gen kết trái sớm 1 (trung bình)	% kiểu gen kết trái sớm 2 (trung bình)	Tỷ lệ F	Prob>F
ShtilNeto	P-BC	20	8	42,37	75	5,184	0,031
ShtilNeto	W-BC	26	33	40,91	97,42	63,08	<0,0001
ShtilNeto	P+W-BC	46	41	41,54	93,04	64,53	<0,0001

Phát hiện này còn được xác nhận bằng cách sinh trưởng các cây lai dị hợp tử đối với alen độc lập *E. exaltatum vernalization* (được ký hiệu là F1p) trong các điều

kiện nhiệt độ cao (chu kỳ của ngày là 12 giờ 28°C và 12 giờ 34°C) trong tủ nuôi trong ba tháng. Các giống thương mại hàng đầu (Rosita White, Rosita 2 Purple, Aube Pink Flush, Piccolo 2 Hot Lips, Rosita 3 Green, Eosita 3 Pink và Tzili) được sử dụng làm đối chứng. Như được thể hiện rõ ràng trên Fig.13, hơn 80% cây lai dị hợp tử được kết trái sớm so với tối đa khoảng 28% kết trái sớm trong các giống phụ thuộc xuân hoá.

Ví dụ 5: Tác dụng của QTL tạo ra sự độc lập với quá trình xuân hoá trên các kiểu hình bổ sung

Các nỗ lực để thâm nhập các tín trạng có lợi từ các cây kiểu đại hoặc tổ tiên nhiều lần gặp phải vấn đề kéo theo di truyền đáng kể của các tính trạng không mong muốn từ cây cho vào trong cây nhận. Tuy nhiên, không chỉ có sự kéo theo về các tính trạng không mong muốn là không đáng kể ở các cây của sáng chế, QTL làm ảnh hưởng dương tính đến số lượng cuống trong giai đoạn đâm chồi nảy lộc hoa thứ hai thường đối với mẫu vật sinh trưởng của cây hoa cát tường. Fig.14 thể hiện như trị số trung bình là 3,5 cuống/cây trong giai đoạn đâm chồi nảy lộc thứ hai đối với cây có kiểu gen 3 (đồng hợp tử đối với alen *E. exaltatum*) so với chỉ có 2,5 cuống/cây trong giai đoạn đâm chồi nảy lộc thứ hai đối với các cây có kiểu gen 1 ((đồng hợp tử đối với alen *E. grandiflorum*)).

QTL có tác dụng tiêu cực không đáng kể đối với chiều dài cuống mà làm gia tăng không đáng kể ở các cây chứa QTL. Sự gia tăng như vậy là không mong muốn bởi vì nó làm yếu hoa có xu hướng bị gãy. Tuy nhiên, tác động này có thể khắc phục được bằng cách đưa QTL vào cây hoa cát tường với nền tảng di truyền thích hợp của các cuống nhỏ rất ngắn.

Phần mô tả trên đây về các phương án cụ thể sẽ thể hiện một cách đầy đủ bản chất chung của sáng chế mà mặt khác có thể, bằng cách áp dụng kiến thức hiện tại, sửa đổi một cách dễ dàng và/hoặc làm thích ứng đối với các ứng dụng khác nhau các phương án đặc hiệu như vậy cần phải có quá trình thử nghiệm quá mức và không chệch khỏi khái niệm chung, và do đó, các thích ứng và sửa đổi như vậy sẽ và được dự định để bao gồm trong nghĩa và khoảng tương đương của các phương án được bộc lộ. Cần hiểu rằng cụm từ hoặc thuật ngữ được dùng trong bản mô tả này đối với mục đích mô tả và không làm giới hạn phạm vi bảo hộ của sáng chế. Các phương tiện, vật liệu và các bước để thực hiện các chức năng khác nhau được bộc lộ có thể thu được nhiều

dạng khác nhau mà vẫn nằm trong phạm vi bảo hộ của sáng chế.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Cây hoa cát tường *Eustoma grandiflorum* (*E. grandiflorum*) làm cảnh chứa yếu tố di truyền từ nhóm liên kết 2 của *Eustoma exaltatum* (*E. exaltatum*) có locus tính trạng số lượng (quantitative trait locus: QTL), trong đó QTL chứa ít nhất một gen đánh dấu nằm trên nhóm liên kết 2 của *E. exaltatum* ở vị trí từ khoảng 25cM đến khoảng 45cM, trong đó ít nhất một gen đánh dấu được chọn từ nhóm bao gồm gen đánh dấu EG_0075 có trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO:3; gen đánh dấu S1_74154018 có trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO:15; và gen đánh dấu S1_18474044 có trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO:40, và trong đó QTL tạo ra quá trình xuân hoá độc lập cho cây cảnh *E. grandiflorum*.
2. Cây hoa cát tường *E. grandiflorum* làm cảnh theo điểm 1, trong đó cây này kết trái sớm mà không cần phải có quá trình xử lý lạnh để kết trái sớm ở cây cảnh *E. grandiflorum* không có QTL hoặc phần của nó nêu trên.
3. Cây hoa cát tường *E. grandiflorum* làm cảnh theo điểm 1, trong đó QTL chứa ít nhất một gen đánh dấu bổ sung có trình tự axit nucleic nêu trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 1-2, 4-14, 16-39 và 41 - 42.
4. Cây hoa cát tường *E. grandiflorum* làm cảnh theo điểm 1, trong đó yếu tố di truyền nằm ở vị trí từ khoảng 25cM đến khoảng 45cM trên nhóm liên kết 2 của cây cảnh *E. grandiflorum* nêu trên.
5. Cây hoa cát tường *E. grandiflorum* làm cảnh theo điểm 1, trong đó QTL còn tạo ra sự gia tăng về số lượng cuống hoa trong giai đoạn đâm chồi nảy lộc hoa thứ hai so với số lượng cuống trong giai đoạn đâm chồi nảy lộc hoa thứ hai ở cây cảnh *E. grandiflorum* tương ứng không có QTL hoặc phần của nó được đưa vào.
6. Cây hoa cát tường *E. grandiflorum* làm cảnh theo điểm 1, trong đó cây này không có gen di truyền gây hại thu được từ nhóm liên kết 2 của *E. exaltatum*.
7. Hạt của cây hoa cát tường *E. grandiflorum* làm cảnh theo điểm 1, trong đó cây được sinh trưởng từ hạt này chứa yếu tố di truyền từ nhóm liên kết 2 của *Eustoma exaltatum* chứa QTL, trong đó QTL chứa ít nhất một gen đánh dấu nằm trên nhóm

liên kết 2 của *E. exaltatum* ở vị trí từ khoảng 25cM đến khoảng 45cM, trong đó ít nhất một gen đánh dấu được chọn từ nhóm bao gồm gen đánh dấu EG_0075 có trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO:3; gen đánh dấu S1_74154018 có trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO:15; và gen đánh dấu S1_18474044 có trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO:40, và trong đó QTL tạo ra quá trình xuân hoá độc lập cho cây này.

8. Tế bào hoặc môi trường nuôi cấy mô thu được từ cây theo điểm 1, trong đó cây được phát triển từ tế bào hoặc môi trường nuôi cấy mô này chứa yếu tố di truyền từ nhóm liên kết 2 của *Eustoma exaltatum* chứa QTL, trong đó QTL chứa ít nhất một gen đánh dấu nằm trên nhóm liên kết 2 của *E. exaltatum* ở vị trí từ khoảng 25cM đến khoảng 45cM, trong đó ít nhất một gen đánh dấu được chọn từ nhóm bao gồm gen đánh dấu EG_0075 có trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO:3; gen đánh dấu S1_74154018 có trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO:15; và gen đánh dấu S1_18474044 có trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO:40, và trong đó QTL tạo ra quá trình xuân hoá độc lập cho cây này.
9. Phương pháp tạo ra cây hoa cát tường *E. grandiflorum* làm cảnh cần có quá trình xuân hoá độc lập để kết trái sớm, trong đó phương pháp này bao gồm bước đưa yếu tố di truyền từ nhóm liên kết 2 của *Eustoma exaltatum* chứa QTL vào cây cảnh *E. grandiflorum*, trong đó QTL chứa ít nhất một gen đánh dấu nằm trên nhóm liên kết 2 của *E. exaltatum* ở vị trí từ khoảng 25cM đến khoảng 45cM, trong đó ít nhất một gen đánh dấu được chọn từ nhóm bao gồm gen đánh dấu EG_0075 có trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO:3; gen đánh dấu S1_74154018 có trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO:15; và gen đánh dấu S1_18474044 có trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO:40, và trong đó QTL hoặc phần của nó tạo ra quá trình xuân hoá độc lập cho cây cảnh *E. grandiflorum*, nhờ đó tạo ra cây cảnh *E. grandiflorum* cần có quá trình xuân hoá độc lập để kết trái sớm và/hoặc ra hoa.
10. Phương pháp theo điểm 9, trong đó QTL chứa ít nhất một gen đánh dấu bổ sung có trình tự axit nucleic nêu trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 1-2, 4-14, 16-39 và 41-42.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110>	Yissum Research Development Company of the Hebrew University of Jerusalem	
<120>	CÂY HOA CÁT TƯỜNG (EUSTOMA GRANDIFLORUM) CÓ QUẢ TRÌNH XUÂN HOÁ ĐỘC LẬP VÀ PHƯƠNG PHÁP TẠO RA CÂY NÀY	
<130>	YISSUM/0115 PCT	
<150>	US 62/083912	
<151>	2014-11-25	
<160>	42	
<170>	PatentIn version 3.5	
<210>	1	
<211>	64	
<212>	ADN	
<213>	Eustoma exaltatum	
<400>	1	
	cagctcttat gtgacataag aaatgttaca aaatgcatgc agtattcgat gtaaattacc	60
	gacg	64
<210>	2	
<211>	64	
<212>	ADN	
<213>	Eustoma exaltatum	
<400>	2	
	ctgcaaacat cagctcttatt gcagttaaaa cagaaaatag gcatagaaaa acaagtaggg	60
	aatg	64
<210>	3	
<211>	590	
<212>	ADN	
<213>	Eustoma exaltatum	
<400>	3	
	gaaggcaaaa atttttgagg agatgagccg caaaagagag agagcttctc aagccggcta	60
	ctttccgagc tcttttccga aacgccggcg gccagtgtc ccccgacgcg atctccccga	120
	cgactcaaaa ttactctcg acgtcccctc ttccccggcg gcctcctcca agcagcaaaa	180
	cacgggtggtg gtgagtgggc tgccgaccga ttgctccgtg ttggacctga aatccccgctt	240
	cgagatctat ggctctatct ctcgcaccgc aatggaccct aatggctctg cttacatcac	300
	ttttcgggtcc catgattccg ccacttccgc cgtctccgcc gccctcgacc cttctttccg	360
	catcacctta ctctctaaac ctgtacaagt gatgtgggct actgaccggg taccgcagtg	420
	gagggaaaggt gtgacaaaaga aagaaggtgc atcatcaaga ctgttgtctt caagctagtg	480

aggcctgacg tacctctatg tacgcgaggg agaggtaata aattgatttc agctattgtt 540

aatccagaga aaaggataat ggtaatggca ttggcaatga tgaaagggaa 590

<210> 4
<211> 64
<212> ADN
<213> Eustoma exaltatum

<400> 4
ctgcgattcc aaaaacgtgg aaggaagcaa actccgatgc aacaagttat tccctattga 60

atga 64

<210> 5
<211> 64
<212> ADN
<213> Eustoma exaltatum

<400> 5
cagcaccaaa taattcaatt gcctgatttt cccggtaggaa tcgaggcttt tgagctatgt 60

gcta 64

<210> 6
<211> 64
<212> ADN
<213> Eustoma exaltatum

<400> 6
cagcaatggt attcactggt ctctatctag tggcgctagg agttggaggc atcaagggat 60

ccct 64

<210> 7
<211> 64
<212> ADN
<213> Eustoma exaltatum

<400> 7
cagcatctgc gcacctgtta gtgcctgggg cgccacaaag tgaatgtatg ttaaagttaa 60

ggtt 64

<210> 8
<211> 64
<212> ADN
<213> Eustoma exaltatum

<400> 8
cagcaaaagt gcaatgatta gcaaccaagg cgccaaacag agcaacagtc caaattctaa 60

tagc 64

<210> 9

<211> 64
 <212> ADN
 <213> Eustoma exaltatum

 <400> 9
 ctgcattctg ttcaaaaagc atggccatgt taaacgtatc cagcaaaatt ttctccaaaa 60
 gaaa 64

 <210> 10
 <211> 64
 <212> ADN
 <213> Eustoma exaltatum

 <400> 10
 ctgcattctt ctttttgggt actactccta tcttatagtc ttttgcatac tcctctgtgt 60
 tttc 64

 <210> 11
 <211> 64
 <212> ADN
 <213> Eustoma exaltatum

 <400> 11
 cagcacctgg atttgggctt gaaaggggaa aagctgaggg tacacatact ggatttacag 60
 ttgg 64

 <210> 12
 <211> 64
 <212> ADN
 <213> Eustoma exaltatum

 <400> 12
 ctgcttgaaa atttgttgca ggttcaaag cgtgattcta tccgttgtca gccttgctc 60
 gatg 64

 <210> 13
 <211> 64
 <212> ADN
 <213> Eustoma exaltatum

 <400> 13
 cagctgtcca agttttgcac gcgcaaaaag ctcgaccaga tcattctgag gcaattgtgg 60
 agga 64

 <210> 14
 <211> 1400
 <212> ADN
 <213> Eustoma exaltatum

 <400> 14
 aagtaggtcg gagggggagt gcccttcctt ttgtgctcac tgctacgtaa cttcttcttt 60

ttgtttttgc gtggagtctt gacatcattg taacctattc tgatgctagg gtggcatct	120
ttttgtatcg gccaaatccc tgggaatctg tgttcaccac ccccgatatt gatgagcaag	180
ctcttgccca aaggttacac tttctttgat gcattatccc ctggactaca tcggctaacc	240
tattctgatt ctagggtggt cttctttttg tatcggccaa atccctggga acctgtgttt	300
accacccccg gatttgatga gcaagctctt gctcaaagta actttctttg atgcattatc	360
ccctggacta cataggctag attatcttta actttgagac attttgtttc ctacactgac	420
aagtagatca ccattcattt ggcaatgaac ttatctcctt gggtgagcct atatcaagtc	480
tccgtttttc ctgcatgaat acaactttat ccttaattct tgccctgac tttagacatt	540
gccattgaaa ctatttagtc cgggttctgc tttcgtcgag tcaacttctg tgtgaaagac	600
ggactagact catcatggaa gaaaacctta gagtcagatc actatgggca ccctcgagct	660
tatttgtttg ctttgagagg aattccataa ctagtccagc gcccaagaag ttgtttcagt	720
ccttgatat tttctcttgt gataacacag ttgtatctca ccataagcac tccatgaacc	780
cctttcaacg tttctccaaa ccaatatcag gacattgctg tgtataccga agccaattta	840
tacatttata gtgatttattc agggcacgaa attgacatta ctggatgata tttgtactac	900
atggtaatgc agaaatgcaa tccgattcat taacgcttta gcaagacacc acggaaagag	960
tatgcctttc tggccatgtt cttgcagcgt tctgaaatgc tccaacgaaa gctctttgcc	1020
aaaagaacgt taaaaaaggc aggggatatg aacaatttca cagcacctag ctagtcgtac	1080
gttaactcgc accataaaaa tatgtaacag aaagagtaca ctccctcgt cccatcttat	1140
aattccacaa actattttga gatgtccaaa cttacaagtc tgcatgcttt aaattgtgaa	1200
agaaagcgga atcttttctt actttctcct tttctaaagt acacgcagtt aaaaaatgca	1260
cctaacttct tgtggcgaaa gttggaatac cttattttat gctatgtctc acttcacaa	1320
ggtcttacat tttagaacag agggcagctg ctaatgatag tgccactttc aaggaacaag	1380
gaaacaagac ccacctgatt	1400

<210> 15
 <211> 64
 <212> ADN
 <213> Eustoma exaltatum

<400> 15	
cagctctttc atcactgtga ggctcatagt ctggctgttc tgcatctgaa tttgaaacac	60
gtgc	64

<210> 16
 <211> 64

<212> ADN
 <213> Eustoma exaltatum

 <400> 16
 cagcaaaagt gaaatataag gtcttgagc catgccgcct atgaccatct gaaaggatga 60
 tttc 64

 <210> 17
 <211> 64
 <212> ADN
 <213> Eustoma exaltatum

 <400> 17
 ctgcaaaatt caaatgtgac gttttggtta atcctcaacc ataacggagc ccaaactct 60
 gtga 64

 <210> 18
 <211> 64
 <212> ADN
 <213> Eustoma exaltatum

 <400> 18
 ctgcaccacc atgggataga ccaccagcat ttgaaccata aggttcata ttgaaagact 60
 ggtt 64

 <210> 19
 <211> 64
 <212> ADN
 <213> Eustoma exaltatum

 <400> 19
 cagcaagtgg ctccatattg cttttatttg caaatatgca aatggttctc ctagataacc 60
 gtgc 64

 <210> 20
 <211> 64
 <212> PRT
 <213> Eustoma exaltatum

 <400> 20

 Cys Ala Gly Cys Thr Gly Ala Ala Thr Gly Ala Gly Gly Cys Ala Cys
 1 5 10 15

 Thr Gly Ala Ala Cys Cys Thr Gly Ala Thr Cys Thr Thr Thr Gly Cys
 20 25 30

 Ala Ala Thr Gly Cys Cys Ala Thr Thr Thr Gly Ala Gly Cys Cys Thr
 35 40 45

Gly Ala Cys Ala Cys Ala Ala Thr Gly Ala Gly Cys Thr Gly Gly Ala
 50 55 60

<210> 21
 <211> 64
 <212> ADN
 <213> Eustoma exaltatum

<400> 21
 ctgccgcctc ctgaatgaat gtgcgcggaa tgcagattga attcgtgctg aaaaaaaaaa 60
 aaaa 64

<210> 22
 <211> 64
 <212> ADN
 <213> Eustoma exaltatum

<400> 22
 ctgcgatttc ttttcagatc tctagcatgg aaaagtgatt acctttatca gctagcctag 60
 ttgc 64

<210> 23
 <211> 64
 <212> ADN
 <213> Eustoma exaltatum

<400> 23
 cagcatgcaa ctaggctagc tgataaaggt catcactttt ccatgctaga gatctgaaaa 60
 gaaa 64

<210> 24
 <211> 64
 <212> ADN
 <213> Eustoma exaltatum

<400> 24
 ctgctaataa atttcttccc ccaaccccaa acccccataa attactatct tgctgacgtg 60
 gaaa 64

<210> 25
 <211> 64
 <212> ADN
 <213> Eustoma exaltatum

<400> 25
 cagctggaaa aagctttaga gaagacatat atgaatcctt gtttggagaa tatgaagggt 60
 ggat 64

<210> 26
 <211> 64

<212> ADN
 <213> Eustoma exaltatum

 <400> 26
 ctgcctgaaa atttgagaa agagaagtcc tgaatcagtg tcctttacaa aatttaattg 60
 gcat 64

 <210> 27
 <211> 566
 <212> ADN
 <213> Eustoma exaltatum

 <400> 27
 gaacaggatg tttgggataa ggatttggat atgtacaata attttttcca caaattgaaa 60
 gtgattaagc agaacagtat tccaaaactc ttcctgttgg ccaattatat aaagtctaata 120
 agagcaagtg tgtcagctgg tggcttttct actcctggca ttgtcacgaa gccactacgc 180
 gcaagtatgc tttctgcatc tctacgacgt gctatgggca gaggcacagg gtgtaatgga 240
 gatgttcgta atctgactct ttctagtctg ctccatggga gaaaaattct agtagttgat 300
 gataacaagg tcaatcttaa agtcgctgag ggtttctca agaagtatgg ggctgagggtg 360
 gtgcgagtgg aaagtggaaa aagaagcagt ttcactgctg cagccacccc accaatttga 420
 tgcctgtttc atggatattc aaatgccaga aatggatggg tttgaagcaa caaagagaat 480
 tcggaacaca gaatatgaga tcaattctca gcttgaaagc ggagaacttt cagttgaaga 540
 atatgcaa atcttcaagtg gcatgt 566

 <210> 28
 <211> 64
 <212> ADN
 <213> Eustoma exaltatum

 <400> 28
 ctgcatttgg atcataaaca agagtgtgt agtaaggatc ctctctctgt gaaaacagca 60
 gaaa 64

 <210> 29
 <211> 64
 <212> ADN
 <213> Eustoma exaltatum

 <400> 29
 cagcacaacg gatgccagtt acaatgtgca agagttgttt tggagcttca ccaatacaga 60
 tatc 64

 <210> 30
 <211> 64
 <212> ADN

<213> Eustoma exaltatum

<400> 30

ctgcctgagg tgtttcctgc ttttacatct tcagatggca tacaacatat gaactttgga 60

gtgg 64

<210> 31

<211> 64

<212> PRT

<213> Eustoma exaltatum

<400> 31

Cys Thr Gly Cys Thr Gly Thr Thr Thr Thr Cys Ala Cys Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ala Thr Cys Cys Thr Thr Ala Thr Thr Ala
20 25 30

Cys Ala Gly Cys Ala Cys Thr Cys Thr Thr Gly Thr Thr Thr Ala Thr
35 40 45

Gly Ala Thr Cys Cys Ala Ala Ala Thr Gly Cys Ala Gly Ala Ala Ala
50 55 60

<210> 32

<211> 64

<212> ADN

<213> Eustoma exaltatum

<400> 32

ctgccgctat tttctcgcgg agattgaact tctcagaaat tagcggccgg acatcttcag 60

cgcc 64

<210> 33

<211> 64

<212> ADN

<213> Eustoma exaltatum

<400> 33

cagcaaattg ttgacggatc tttggcctca atgattgacc cgtggttggc agaaaaaaaa 60

aaaa 64

<210> 34

<211> 64

<212> ADN

<213> Eustoma exaltatum

<400> 34

ctgcgctaga gcatgctaaa gcactagctg atcaggaatt gcagagaact acggaagaac 60

ttca 64

<210> 35
 <211> 64
 <212> ADN
 <213> Eustoma exaltatum

<400> 35
 ctgcttctca ttttgttgat ttggttaagt gctggctgga gaatgttgaa cagaacccaa 60

gcaa 64

<210> 36
 <211> 64
 <212> ADN
 <213> Eustoma exaltatum

<400> 36
 cagcttgaga tgtgcatatt gatcacagat ctcatgagat ttttccacc tactatcacg 60

tgtc 64

<210> 37
 <211> 64
 <212> ADN
 <213> Eustoma exaltatum

<400> 37
 ctgcaaaatt tgattgagtc tttggatggc attgaacatc aaggtcattt ggcattcgag 60

acac 64

<210> 38
 <211> 64
 <212> ADN
 <213> Eustoma exaltatum

<400> 38
 ctgcacctca atacagagcc cgggaacatt aaacgttttg aacataatct caccagtgtg 60

ttcc 64

<210> 39
 <211> 64
 <212> ADN
 <213> Eustoma exaltatum

<400> 39
 ctgcatatca tggtaatctt gattttgtag gtagagttct gaaagaagg tatgatgtga 60

atct 64

<210> 40
 <211> 64
 <212> ADN

<213> Eustoma exaltatum

<400> 40

cagcaggagc ttgcaagcga agctccagga taagcacggt tcgtggctaa ccacctccgc 60

agaa 64

<210> 41

<211> 64

<212> ADN

<213> Eustoma exaltatum

<400> 41

ctgcagttat ttaatcaaac tgcctcttta aaaccttgat tcttgactca atgtgagggc 60

tagc 64

<210> 42

<211> 64

<212> ADN

<213> Eustoma exaltatum

<400> 42

ctgcaaatga aaccacaagt taacaaattg ccagattaaa atgatataac tgcaaatgaa 60

acca 64

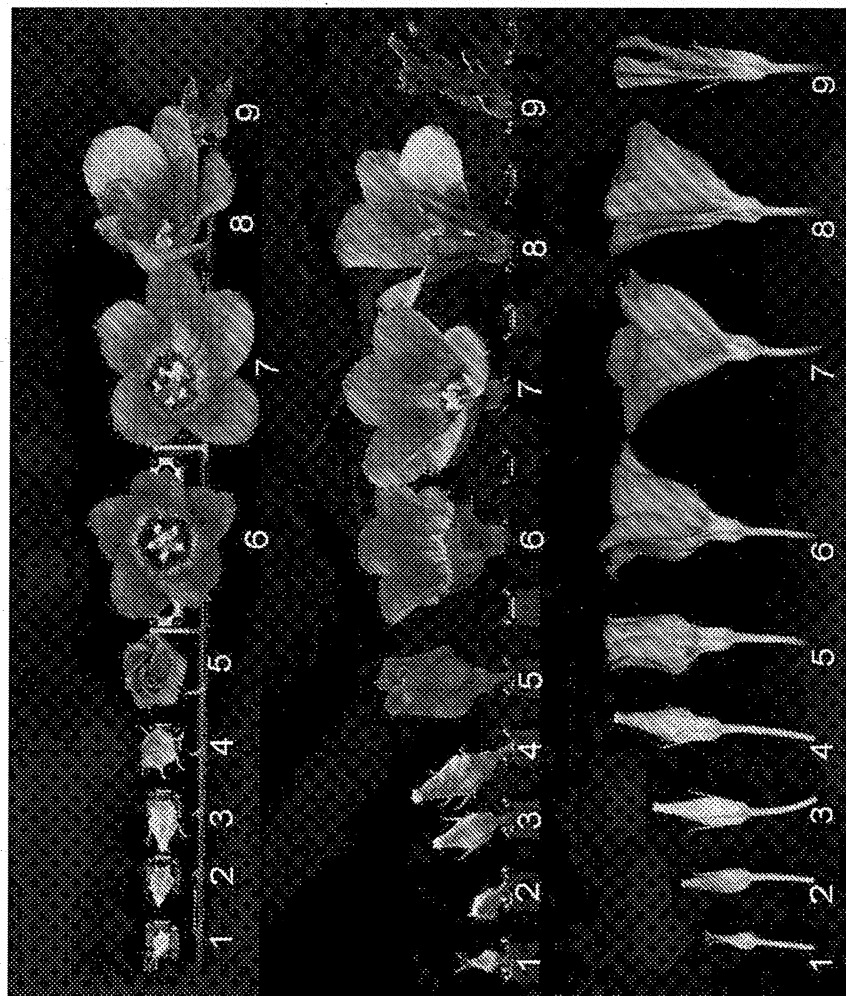


Fig.1



Fig. 2A

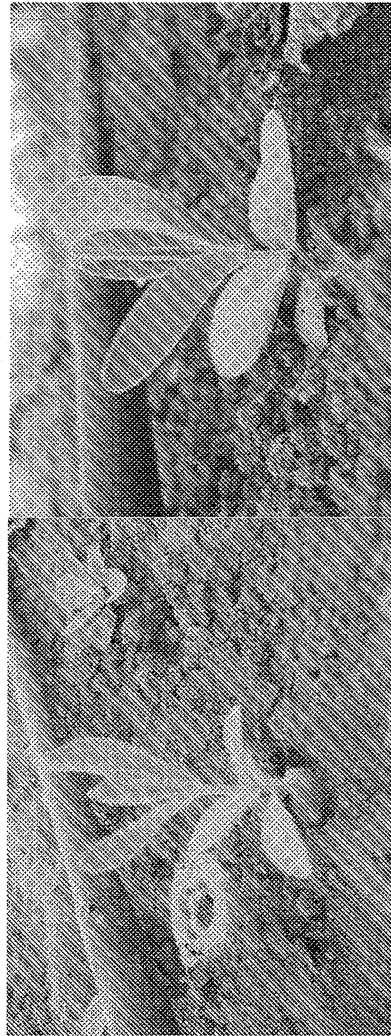


Fig. 2B

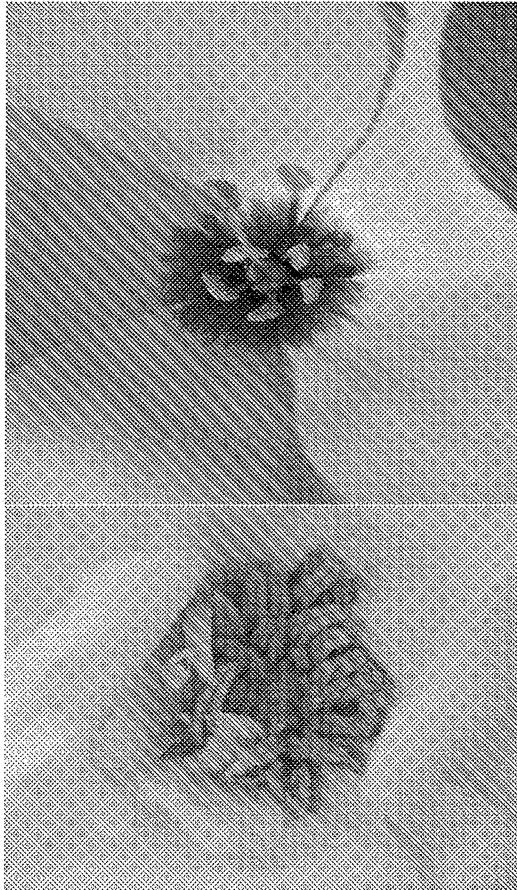


Fig.3A



Fig.3B



Fig.3D



Fig.3C

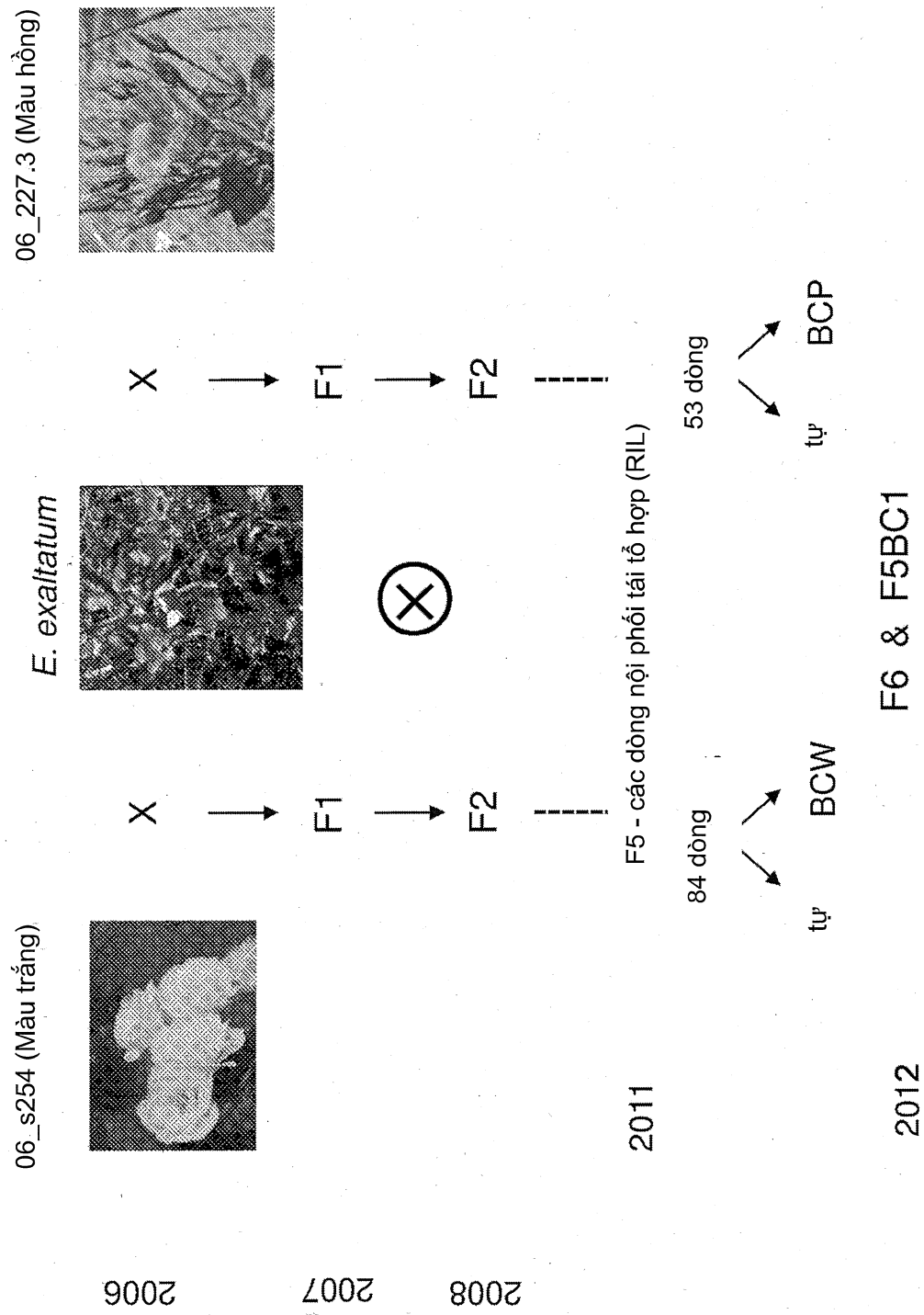


Fig.4

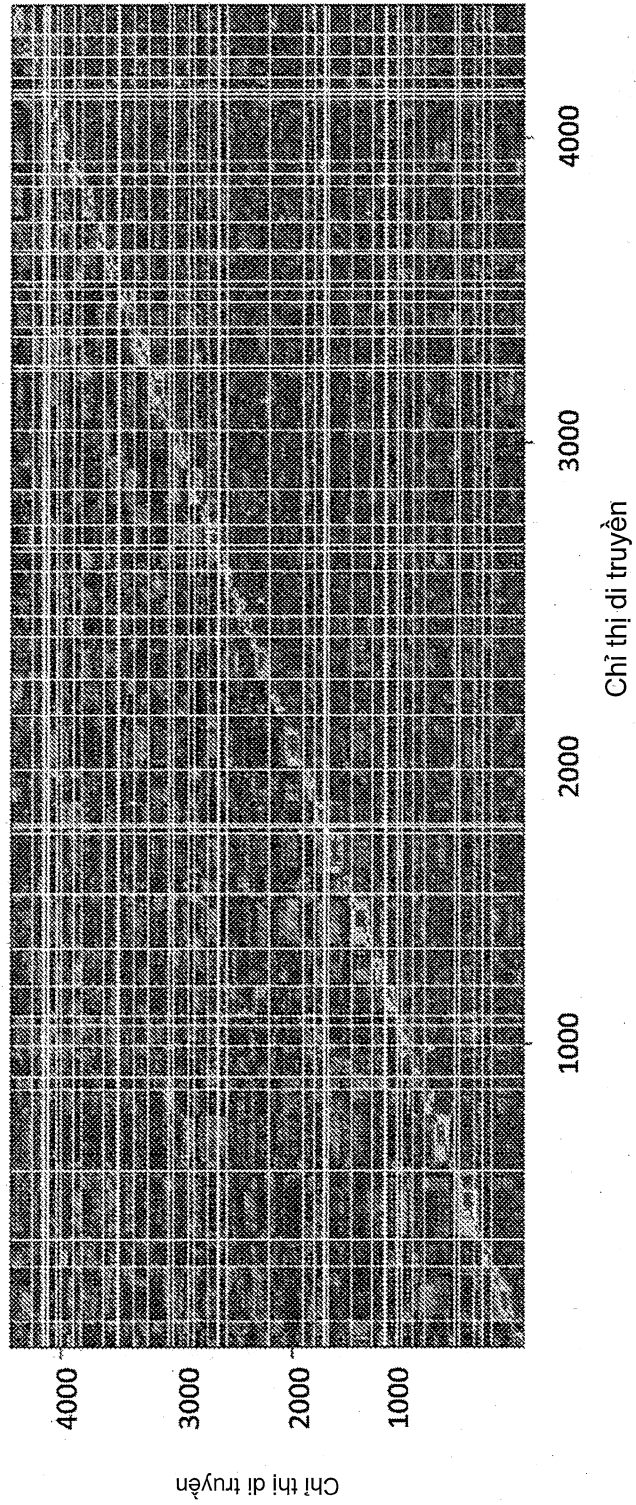


Fig.5

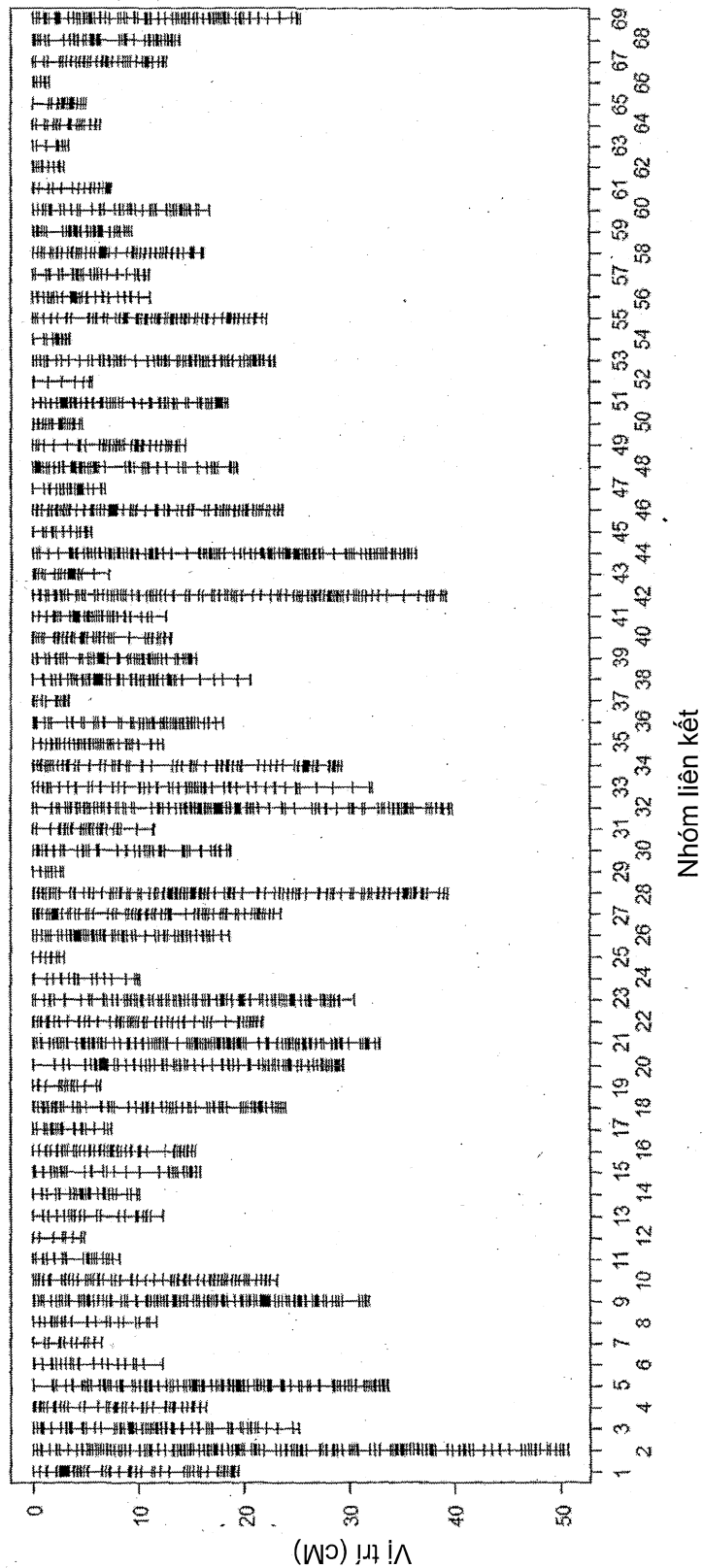


Fig.6

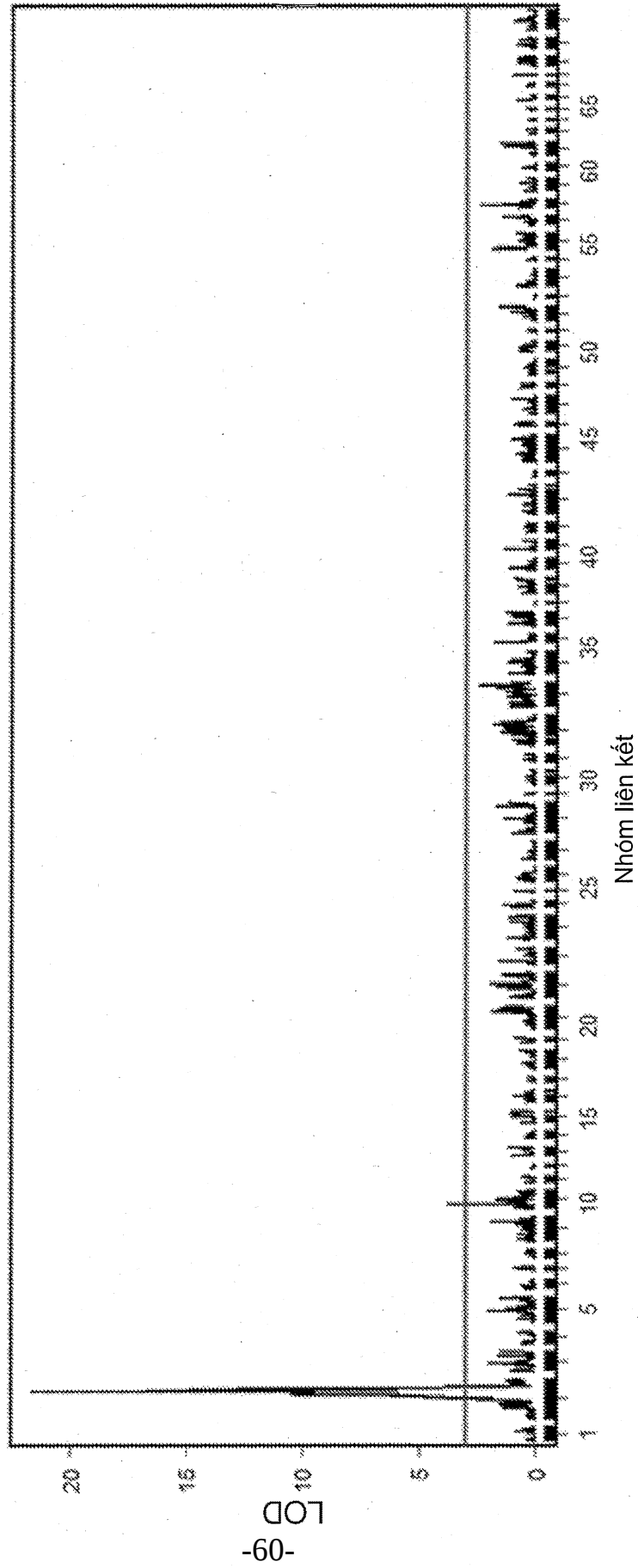


Fig.7

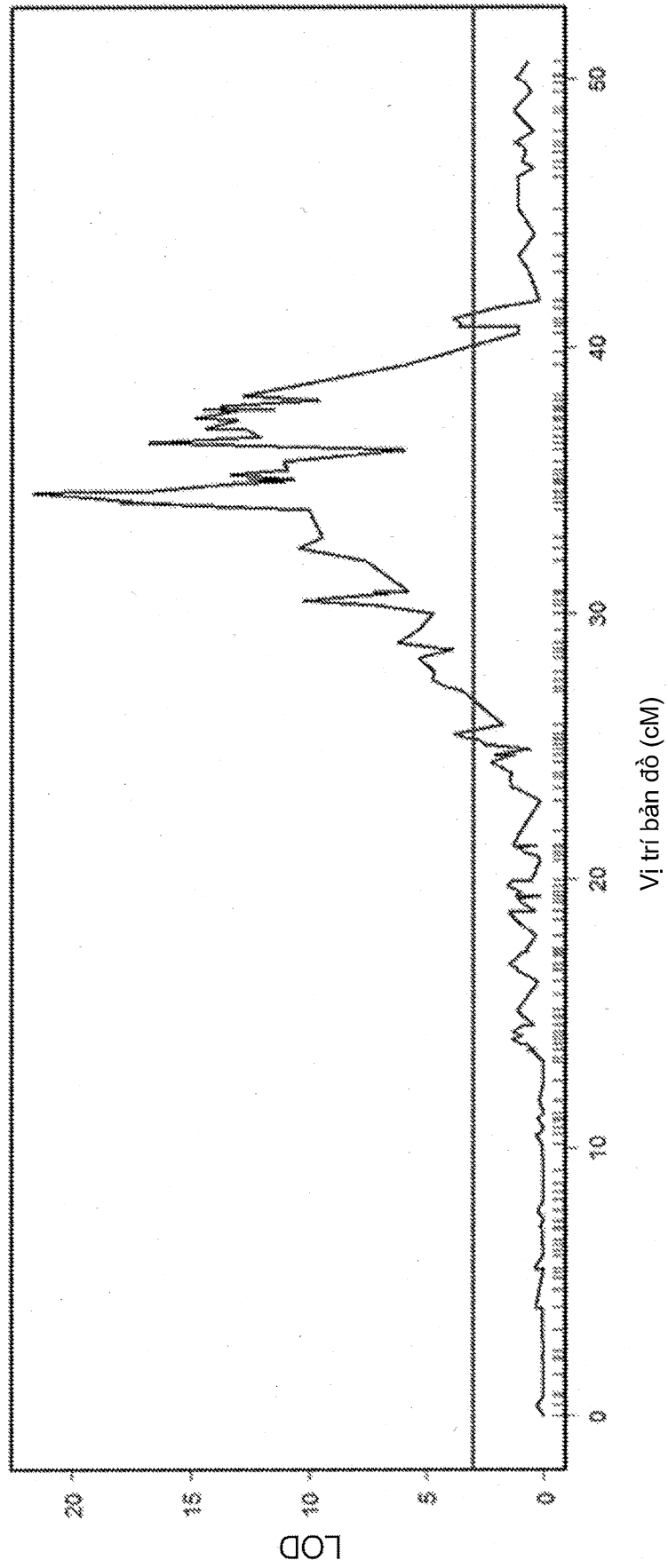


Fig.8

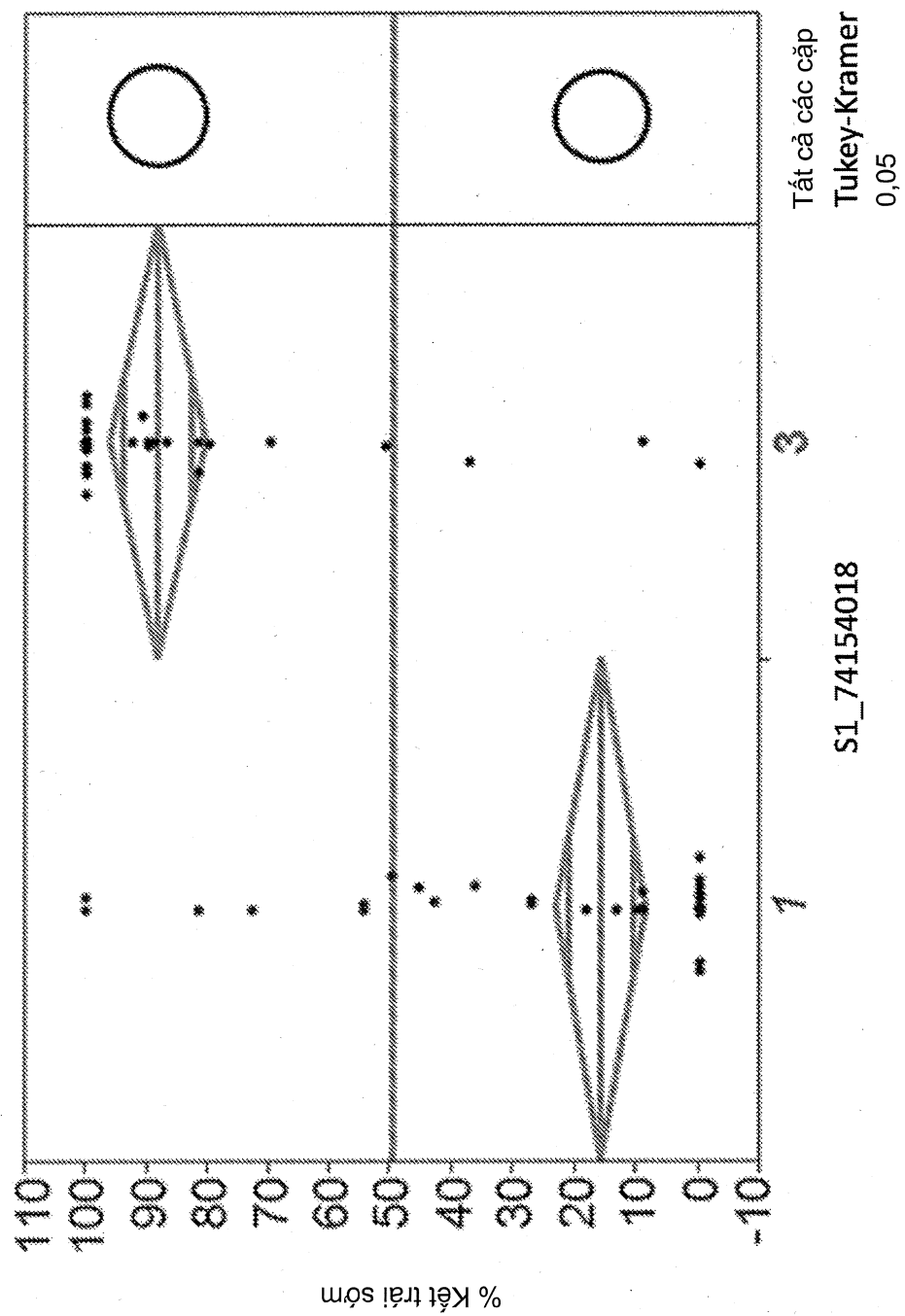


Fig.9

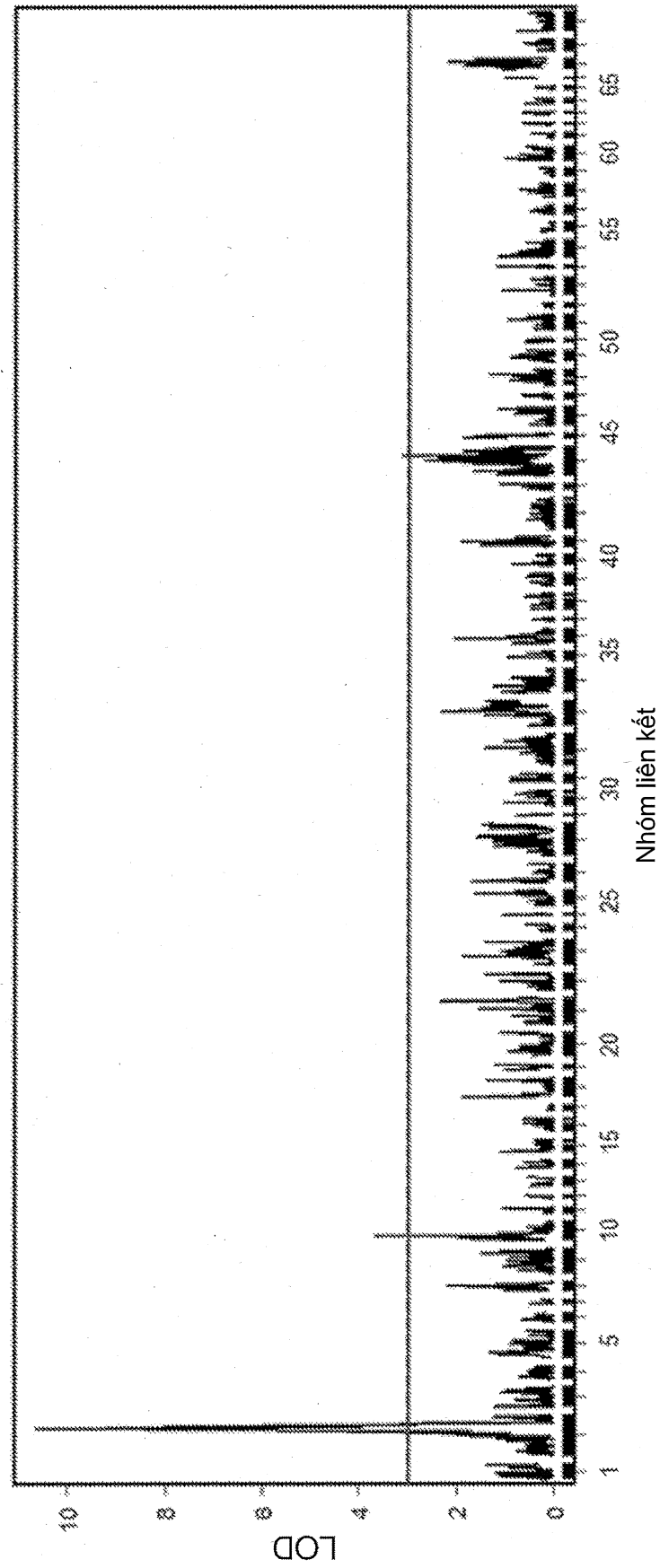


Fig.10

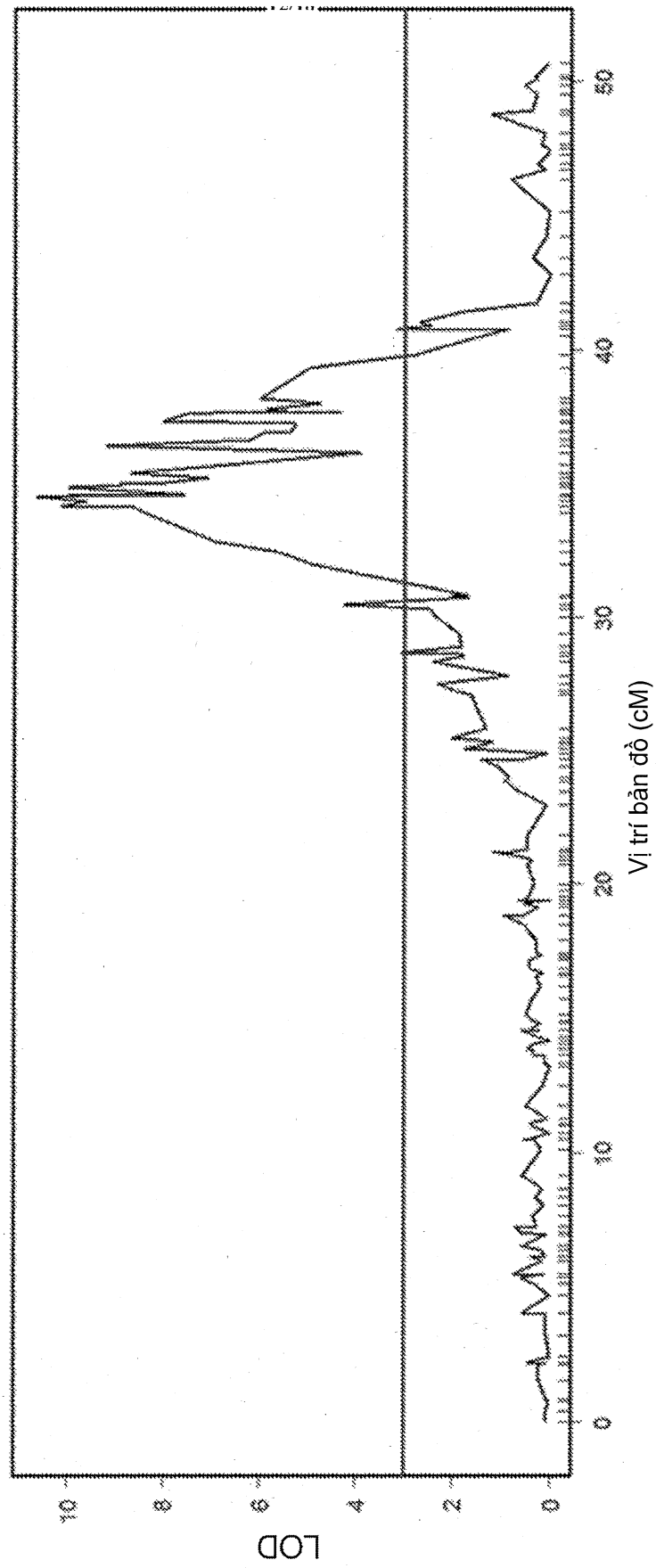


Fig.11

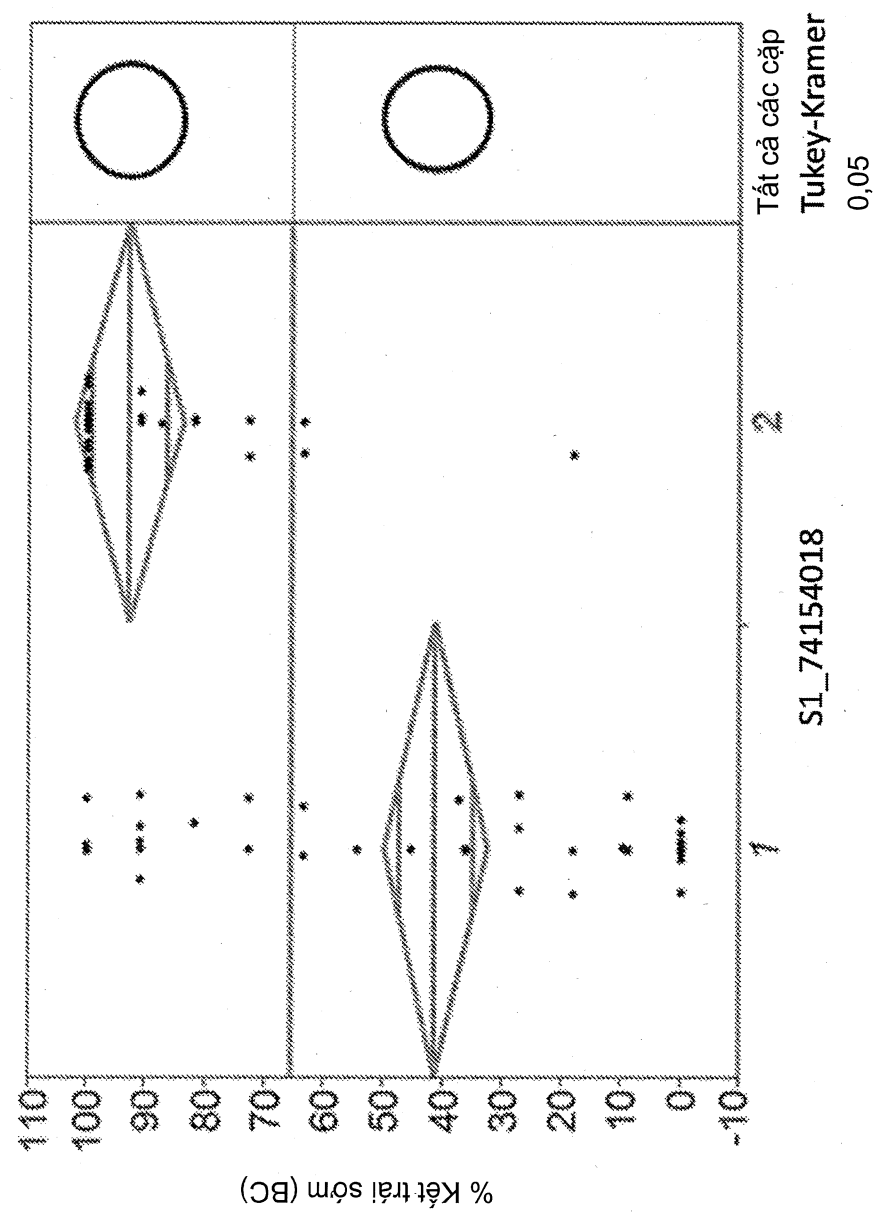


Fig.12

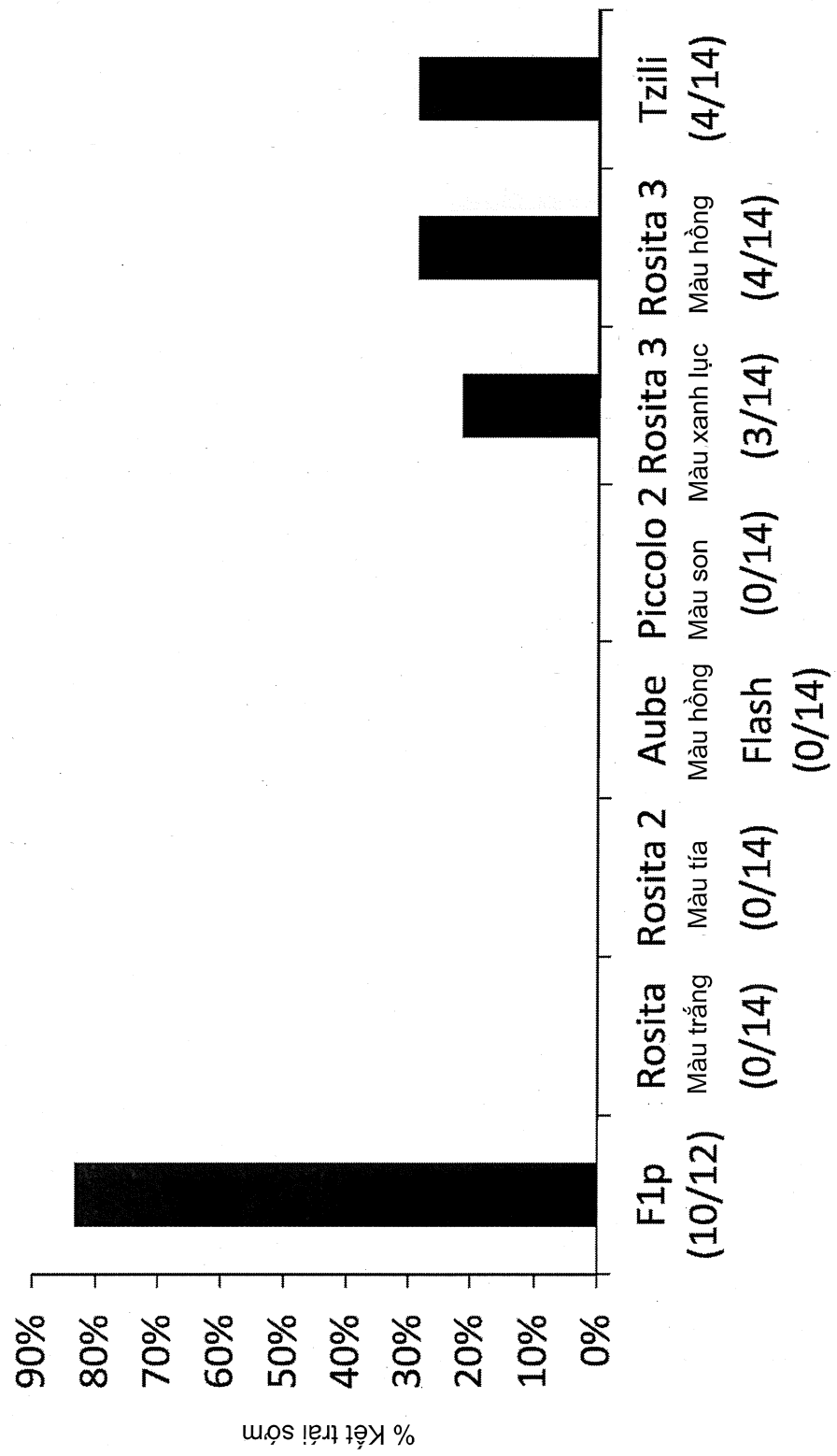


Fig.13A

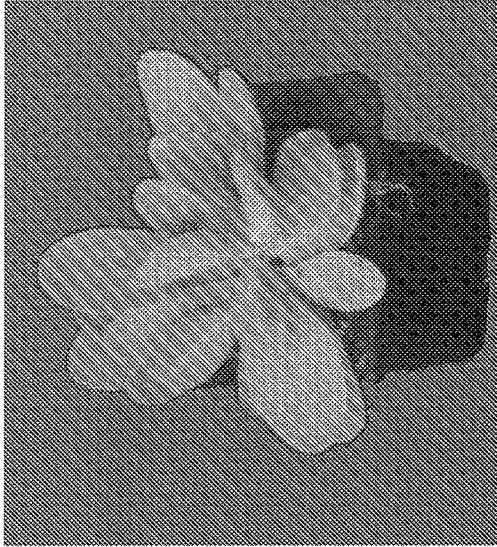


Fig.13C

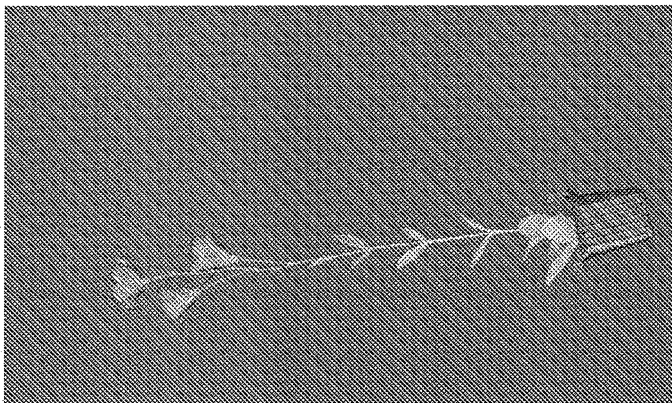


Fig.13B

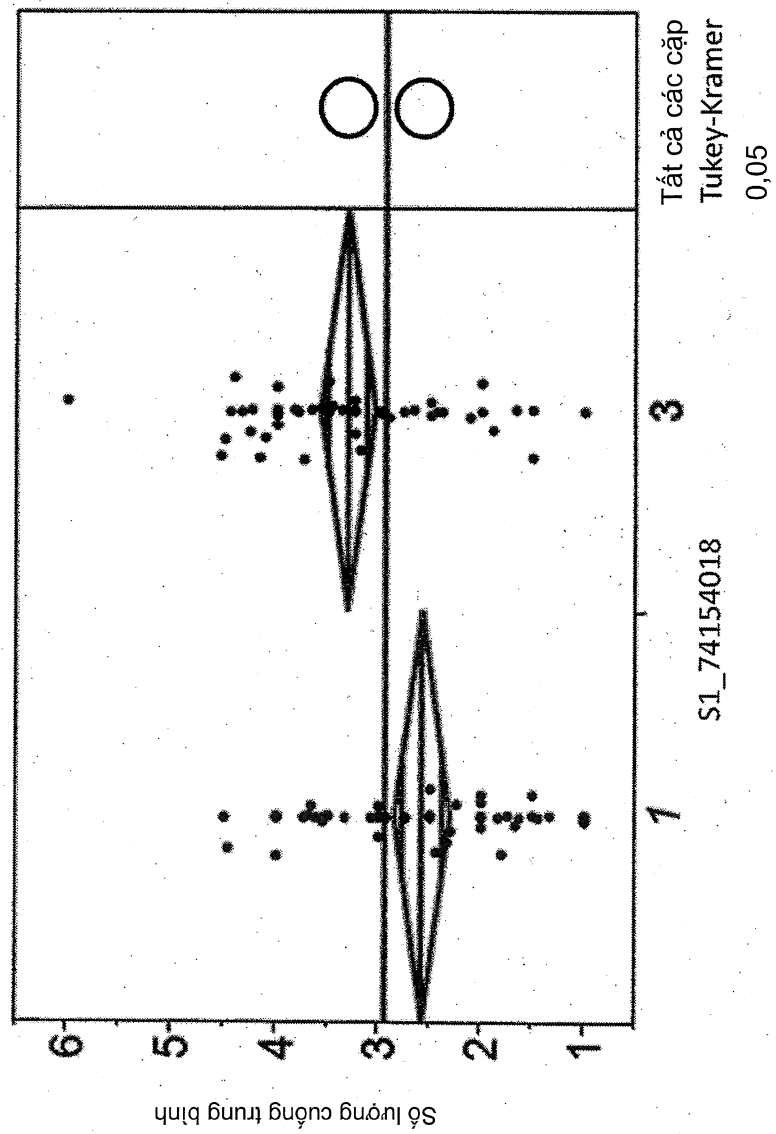


Fig.14

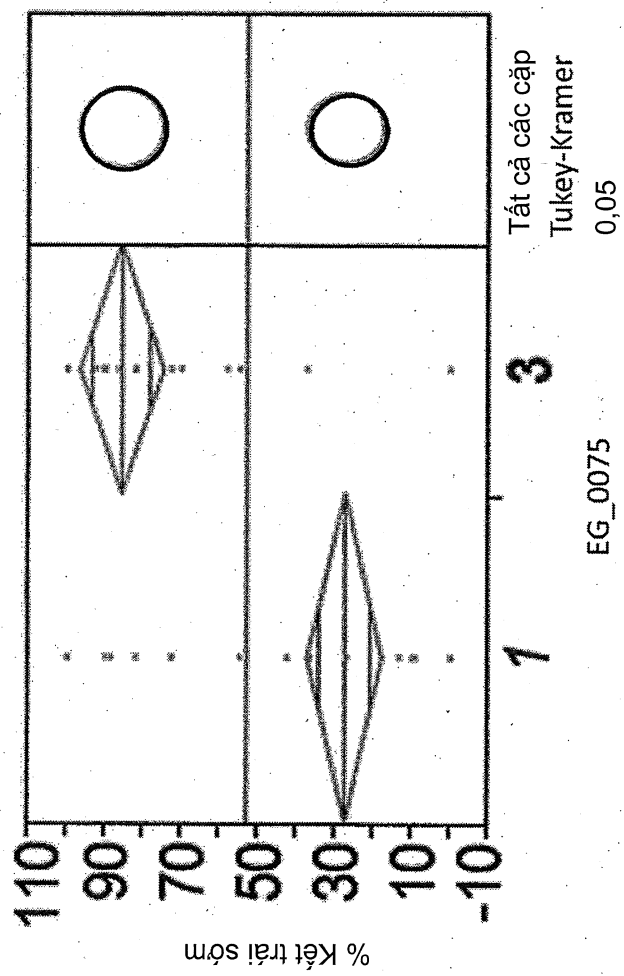


Fig.15

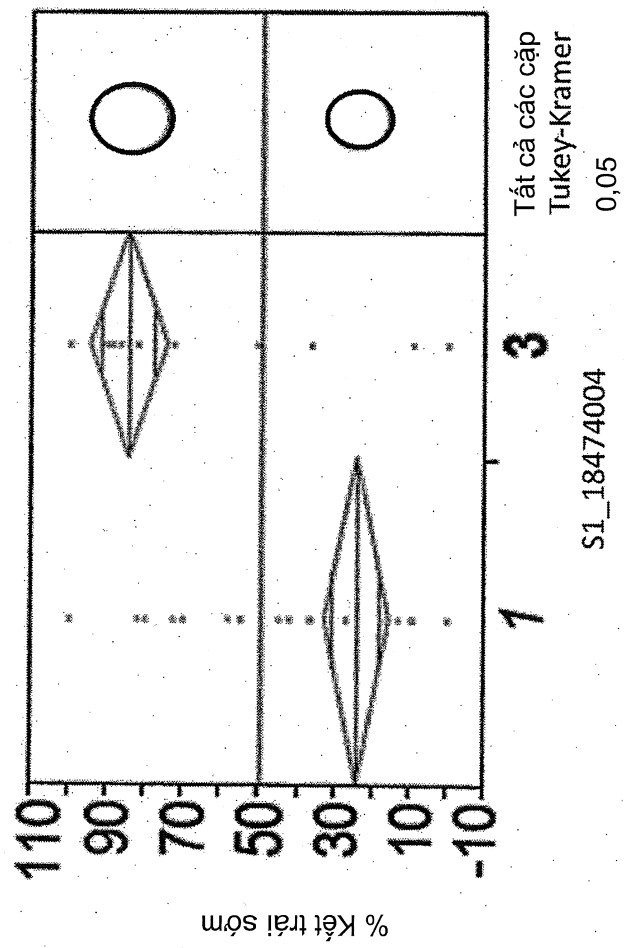


Fig.16