



(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)



1-0032008

(51)⁷ A01H 1/02; C12N 15/09; A01H 4/00

(13) B

(21) 1-2015-01004

(22) 26/09/2013

(86) PCT/JP2013/005722 26/09/2013

(87) WO 2014/050116 03/04/2014

(30) 2012-213296 27/09/2012 JP

(45) 25/05/2022 410

(43) 25/09/2015 330A

(73) SAKATA SEED CORPORATION (JP)

2-7-1, Nakamachidai, Tsuzuki-ku, Yokohama-shi, Kanagawa 2240041, Japan

(72) Kazutoshi MORI (JP); Atsushi IZUMIDA (JP); Shingo HORIUCHI (JP); Takao SUZUKI (JP).

(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) CÂY EUSTOMA CÓ TÍNH BẤT DỤC ĐỰC TẾ BÀO CHẤT VÀ PHƯƠNG PHÁP TẠO RA CÂY EUSTOMA NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến cây *Eustoma* có tính bất dục đực tế bào chất và phương pháp nhân giống chúng. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến cây *Eustoma* có tính bất dục đực tế bào chất, trong đó *Eustoma* gần như không có chức năng sản xuất phấn hoa do sự hình thành chưa hoàn chỉnh của nhị hoa hoặc phấn hoa và phương pháp nhân giống chúng.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến cây *Eustoma* mới có tính bất dục đực tế bào chất và phương pháp nhân giống cây này. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến cây *Eustoma* mới có tính bất dục đực tế bào chất, trong đó *Eustoma* gần như không có chức năng sản xuất phấn hoa do sự hình thành chưa hoàn chỉnh của nhị hoa hoặc phấn hoa và phương pháp nhân giống chúng.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Eustoma là tên di truyền của cây được nhân giống bằng hạt tự giao thuộc chi *Eustoma* trong họ *Gentianaceae* và phát triển tự nhiên ở các vùng Nam Bắc Mỹ và Trung Bắc Mỹ. Các cây này bao gồm hai loài: (1) *Eustoma grandiflorum* (Tên Tiếng Anh: Prairie gentian, tên khoa học trước đây: *E. russellianum* (Hook) G. Don ex Sweet hoặc *Lisianth(i)us russellianus* Hook.) và (2) *Eustoma exaltatum* (Tên Tiếng Anh: Seaside gentian hoặc Catchfly gentian, tên khoa học trước đây: *E. selenifolium* Salisb.). Cây này thường được biết đến với tên thông thường là *Lisianthus*. Vào năm 1835, loài cây tự nhiên này được đưa vào Scotland và được chỉ định là cây *Lisianthus russellianus* Hook. Sau đó cây được đưa vào Nhật vào những năm 1930 và được nhân giống chủ động từ đó, chủ yếu là hoa cắt hoặc cây kiểng. Cây *Eustoma grandiflorum* được sử dụng chủ yếu trong phương pháp nhân giống này.

Eustoma được biết là loài hoa và cây cảnh có giá trị thương mại và giá trị trang trí cao. Cụ thể là, các giống mà có tính đa dạng được sản xuất dưới dạng các giống hoa cắt, và các giống *Eustoma* này được xem là một trong các giống hoa cắt phổ biến (xem tài liệu phi sáng chế 1).

Nói chung, các cây thế hệ con thứ nhất (F1) có đặc tính tốt hơn so với các cây bố mẹ của chúng mà được sử dụng trong cây trồng trong vườn phổ biến, do lợi ích từ ưu thế lai. Trong số các cây trồng *Eustoma*, các cây có nhu cầu cao là các giống hoa

cát, giống thể hệ con thứ nhất cũng chiếm ưu thế do các giống này làm cho cây trồng có tính kháng bệnh hoặc có chất lượng cao.

Đối với phương pháp nhân giống hiệu quả trong sản xuất cây, nhà chọn giống cần cung cấp hạt giống có độ thuần cao. Phương pháp sản xuất giống thuộc giống thể hệ con thứ nhất bao gồm bước ngắt nhị thủ công từ cây mẹ, sau đó thụ phấn cho đầu nhụy của cây mẹ đã ngắt nhị bằng phấn hoa của cây bố.

Giai đoạn mà có thể ngắt nhị được hoa của cây mẹ thường bị hạn chế ở giai đoạn ngay trước khi nở hoa, và cũng thường phụ thuộc vào điều kiện thời tiết. Do đó phương pháp ngắt nhị có các nhược điểm về mặt thao tác trong đó giai đoạn ngắt nhị thích hợp thường rất khó dự đoán. Do thao tác ngắt nhị này được thực hiện một cách thủ công, do đó phấn hoa còn lại do ngắt nhị chưa hết có thể gây ra sự nảy mầm của hạt giống được tự thụ phấn không mong muốn. Sự nhiễm tạp do các hạt giống tự thụ phấn này dẫn đến sự giảm không có lợi về chất lượng hạt giống. Với lý do này, cần phải phát triển một phương pháp sản xuất giống cây *Eustoma* bằng cách sử dụng tính bất dục đực mà không cần dùng đến phương pháp ngắt nhị thủ công cây mẹ.

Dwarf *Lisianthus* được biến nạp bằng phương pháp chuyển gen rolC sử dụng *Agrobacterium rhizogenes* đã biết (Tài liệu phi sáng chế 2), cây này được báo cáo là cây có hoa nhỏ và bị mất tính hữu thụ của hạt phấn đồng thời mất sự ưu tiên phát triển thân chính (hội chứng rol). Kỹ thuật trong Tài liệu phi sáng chế 2 đã được ứng dụng trong phương pháp đã được bộc lộ để sản xuất giống F1 sử dụng *Lisianthus* có tính bất dục đực, trong đó giống được duy trì bằng thể hệ chồi tự sinh (Tài liệu sáng chế 1). Tuy nhiên, giống F1 được tạo ra theo phương pháp này mang các đặc tính không mong muốn. Do đó, phương pháp này không được sử dụng trong phương pháp nhân giống các giống hoa cát do các giống này cần phải có dáng cây hoặc chiều cao để có thể bán được.

Tính bất dục đực tế bào chất (cytoplasmic Male Sterility - CMS), là một dạng bất dục đực, được di truyền từ tế bào chất. Phương pháp lai dòng bất dục đực tế bào chất với dòng bất dục đực tạo ra hạt giống có độ thuần cao. Ngoài ra, dòng bất dục đực tế bào chất có thể được lai với dòng bảo tồn có hệ gen nhân tương tự với hệ gen nhân của dòng bất dục đực tế bào chất và dòng tế bào chất bình thường nhờ đó có thể dễ

dòng duy trì và nhân giống dòng. Do đó, phương pháp sản xuất hạt cho giống thể hệ con thứ nhất bằng cách sử dụng tính bất dục đực tế bào chất có tính thực tế rất cao và được sử dụng cho một lượng lớn các cây trồng chính trong vườn. Tuy nhiên, phương pháp sản xuất *Eustoma* bất dục đực tế bào chất vẫn chưa được báo cáo, mặc dù đã có nhu cầu phát triển phương pháp sản xuất hạt của *Eustoma* bằng cách sử dụng tính bất dục đực. Do đó, phương pháp sản xuất hạt cần đến thao tác ngắt nhị mà vẫn được thực hiện trong phương pháp sản xuất hạt của các giống *Eustoma* F1 do thực tế không có hệ thống sản xuất giống sử dụng các dòng bất dục đực.

Trong khi đó, muốn có độ bền của hoa dài, tức là thời gian trang trí hoa được lâu thì cần phải trì hoãn sự hóa già của cánh hoa. Các ví dụ về nguyên nhân gây ra sự hóa già của cánh hoa bao gồm sự thụ phấn và sự hình thành etylen do sự tổn thương trên đầu nhụy hoặc vòi nhụy của nhụy hoa gây ra (Tài liệu phi sáng chế 3).

Eustoma có nhụy hoa bị biến dạng, do đó đầu nhụy của nó cần được giữ kín để ngăn chặn sự thụ phấn và trì hoãn sự hóa già của hoa, đã được biết đến là giống *Eustoma* có độ bền của hoa dài (Tài liệu sáng chế 2).

Việc cải thiện độ bền của hoa cần đến sự nhân giống dòng có chỉ nhị của nhị hoa ngắn, hoặc sử dụng dòng cây có cấu trúc cơ quan được thay đổi để ngăn chặn sự thụ phấn tự nhiên trên đầu nhụy của nó, như trong nhụy hoa bị biến dạng được đề cập ở trên.

Với điều kiện là cần phải ngăn chặn sự phát tán phấn hoa vào hoa và cây cảnh có giá trị thương mại cao. Tuy nhiên, tất cả các giống *Eustoma* hiện nay đều có nhị hoa tạo ra phấn hoa và do đó, ví dụ, gây ra sự phát tán phấn hoa, là không có lợi do nó bị dính trên các cánh hoa hoặc quần áo.

Mặc dù có nhiều vấn đề liên quan đến độ bền của hoa, v.v., có thể được giải quyết bằng cách sử dụng tính bất dục đực, mà không làm thay đổi các đặc tính hữu ích, nhưng thực tế cây *Eustoma* này có tính bất dục đực vẫn chưa được phát triển.

Danh sách tài liệu trích dẫn

Tài liệu sáng chế

Tài liệu sáng chế 1: Công bố đơn yêu cầu cấp patent Nhật số 9-107829

Tài liệu sáng chế 2: patent Nhật Số 4133011

Tài liệu phi sáng chế

Tài liệu phi sáng chế 1: Nogyo Gijutsu Taikei (Agricultural Technology System (in Japanese)), Flowers and Ornamental Plants, Vol. 8, addendum, No. 6, p. 387-395, 2004, được phát hành bởi Rural Culture Association Japan

Tài liệu phi sáng chế 2: The Tissue Culture (in Japanese), Vol. 19, No. 2, p. 50-55, 1993, New Science Co., Ltd.

Tài liệu phi sáng chế 3: Jissen Kaki Engei Gijutsu (Actual Practice of Ornament Horticultural Techniques (in Japanese)), Cultivation Management and Blooming Adjustment of *Lisianthus*, 2003, được phát hành bởi Seibundo Shinkosha Publishing Co., Ltd.

Tài liệu phi sáng chế 4: E. S. Mousavi, M. Behbahani, E. Hadavi, S. M. Miri (2012), CALLUS INDUCTION AND PLANT REGENERATION IN LISIANTHUS (*EUSTOMA GRANDIFLORIUM*), ANNIVERSARY EDITION TRAKIA JOURNAL OF SCIENCES, Vol. 10, No. 1, pp. 22-25

Tài liệu phi sáng chế 5: J. Duminil, M.-H. PEMONGE and R.J. PETIT (2002), Molecular Ecology Notes, vol. 2, p. 428-430 "A set of 35 consensus primer pairs amplifying genes and introns of plant mitochondrial DNA"

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật

Đối với các vấn đề như phương pháp ngắt nhị rắc rối trong khi sản xuất hạt giống F1 thuộc các giống *Eustoma* thông thường, vấn đề về chất lượng hạt giống giảm, và các thách thức liên quan đến độ bền của hoa hoặc sự phát tán phấn hoa như được mô tả ở trên, sáng chế cũng đề xuất cây *Eustoma* mới có tính bất dục đực tế bào chất và phương pháp tạo ra các cây này.

Cách giải quyết vấn đề

Các tác giả sáng chế đã tiến hành các nghiên cứu chuyên sâu để đạt được mục đích và sau đó hoàn thành phương pháp nhân giống liên quan đến việc tạo ra cây

Eustoma mới có tính bất dục đực tế bào chất, nhân giống dòng *Eustoma* có tính bất dục đực tế bào chất, và thu giống thế hệ con thứ nhất sử dụng cây *Eustoma* bất dục đực tế bào chất.

Cụ thể, sáng chế đề cập đến cây *Eustoma* mới có tính bất dục đực tế bào chất và phương pháp nhân giống chúng. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến cây *Eustoma* mới có tính bất dục đực tế bào chất, trong đó *Eustoma* gần như không có các chức năng sản xuất phấn hoa do sự hình thành chưa hoàn chỉnh của nhị hoa hoặc phấn hoa, và phương pháp nhân giống chúng.

Cụ thể, sáng chế đề xuất các nội dung trong các mục từ (1) đến (34) dưới đây:

- (1) Cây *Eustoma* có tính bất dục đực tế bào chất, hoặc thế hệ sau của nó.
- (2) Cây *Eustoma* hoặc thế hệ sau của nó theo mục (1), trong đó cây *Eustoma* hoặc thế hệ sau của nó có trình tự nucleotit được nêu trong SEQ ID NO: 1 hoặc 2.
- (3) Cây *Eustoma* hoặc thế hệ sau của nó theo mục (1) hoặc (2), trong đó cây *Eustoma* hoặc thế hệ sau của nó là cây bất dục đực tế bào chất được tạo ra từ sự thụ phấn chéo giữa cây mẹ là cây *Eustoma* có trình tự nucleotit được nêu trong SEQ ID NO: 1 hoặc 2 và cây bố là cây *Eustoma* tùy ý.
- (4) Cây *Eustoma* hoặc thế hệ sau của nó theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (3), trong đó cây *Eustoma* hoặc thế hệ sau của nó là cây bất dục đực tế bào chất được tạo ra từ sự nhân giống chéo giữa cây mẹ là cây *Eustoma* có trình tự nucleotit được nêu trong SEQ ID NO: 1 hoặc 2 và cây bố là cây *E. grandiflorum*.
- (5) Bộ phận của cây *Eustoma* hoặc thế hệ sau của nó theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (4).
- (6) Hạt giống của cây *Eustoma* hoặc thế hệ sau của nó theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (4).
- (7) Mô sẹo bao gồm tế bào của cây *Eustoma* hoặc thế hệ sau của nó theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (4).
- (8) Cây *Eustoma* được kích thích từ mô sẹo theo mục (7) và được nhân giống vô tính bằng kỹ thuật nuôi cấy mô, hoặc thế hệ sau của nó.
- (9) Bộ phận của cây *Eustoma* hoặc thế hệ sau của nó theo mục (8).

- (10) Phương pháp tạo ra cây *Eustoma* được kích thích từ mô sẹo theo mục (7) và được nhân giống vô tính bằng kỹ thuật nuôi cấy mô.
- (11) Tế bào chất chứa trong cây *Eustoma* hoặc thể hệ sau của nó theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (4) và (8), bộ phận của cây theo mục bất kỳ trong số các mục (5) và (9), hạt giống theo mục (6), hoặc mô sẹo theo mục (7).
- (12) Ty thể chứa trong cây *Eustoma* hoặc thể hệ sau của nó theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (4) và (8), bộ phận của cây theo mục bất kỳ trong số các mục (5) và (9), hạt giống theo mục (6), hoặc mô sẹo theo mục (7).
- (13) Cây *Eustoma* có tính bất dục đực tế bào chất có số nộp lưu FERM BP-11506, hoặc thể hệ sau của nó.
- (14) Bộ phận của cây *Eustoma* hoặc thể hệ sau của nó theo mục (13).
- (15) Hạt giống của cây *Eustoma* hoặc thể hệ sau của nó theo mục (13).
- (16) Tế bào chất chứa trong cây *Eustoma* hoặc thể hệ sau của nó theo mục (13), bộ phận của cây theo mục (14), hoặc hạt giống theo mục (15).
- (17) Ty thể chứa trong cây *Eustoma* hoặc thể hệ sau của nó theo mục (13), bộ phận của cây theo mục (14), hoặc hạt giống theo mục (15).
- (18) Mô sẹo của cây *Eustoma* có tính bất dục đực tế bào chất có số nộp lưu FERM BP-11507.
- (19) Cây *Eustoma* được kích thích từ mô sẹo theo mục (18) và được nhân giống vô tính bằng kỹ thuật nuôi cấy mô, hoặc thể hệ sau của nó.
- (20) Bộ phận của cây *Eustoma* hoặc thể hệ sau của nó theo mục (19).
- (21) Phương pháp tạo ra cây *Eustoma* được kích thích từ mô sẹo theo mục (18) và được nhân giống vô tính bằng kỹ thuật nuôi cấy mô.
- (22) Tế bào chất chứa trong mô sẹo theo mục (18), cây *Eustoma* hoặc thể hệ sau của nó theo mục (19), hoặc bộ phận của cây theo mục (20).
- (23) Ty thể chứa trong mô sẹo theo mục (18), cây *Eustoma* hoặc thể hệ sau của nó theo mục (19), hoặc bộ phận của cây theo mục (20).
- (24) Phương pháp tạo ra hạt giống thể hệ con thứ nhất, bao gồm bước lai cây mẹ là cây *Eustoma* hoặc thể hệ sau của nó theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (4)

và (8) với cây bố là cây *Eustoma* có khả năng lai được với cây mẹ này, và do đó tạo ra hạt giống thể hệ con thứ nhất từ cây mẹ được lai này.

(25) Phương pháp tạo ra hạt giống thể hệ con thứ nhất, bao gồm bước lai cây mẹ là cây *Eustoma* hoặc thể hệ sau của nó theo mục (13) với cây bố là cây *Eustoma* có khả năng lai được với cây mẹ này, và do đó tạo ra hạt giống thể hệ con thứ nhất từ cây mẹ được lai này.

(26) Phương pháp tạo ra hạt giống thể hệ con thứ nhất, bao gồm bước lai cây mẹ là cây *Eustoma* được tái sinh từ mô sẹo theo mục (18), hoặc thể hệ sau của nó với cây bố là cây *Eustoma* có khả năng lai được với cây mẹ này, và do đó tạo ra hạt giống thể hệ con thứ nhất từ cây mẹ được lai này.

(27) Hạt giống thể hệ con thứ nhất được tạo ra bằng phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ (24) đến (26).

(28) Cây thể hệ con thứ nhất được trồng từ hạt giống thể hệ con thứ nhất theo mục (27).

(29) Phương pháp tạo ra cây *Eustoma*, bao gồm bước lai ngược liên tiếp cây *Eustoma* có trình tự nucleotit được thể hiện bằng SEQ ID NO: 1 hoặc 2 trong tế bào chất của nó với cây *Eustoma* có đặc tính hữu ích để tạo ra cây *Eustoma* mà có đặc tính hữu ích và biểu hiện tính bất dục đực tế bào chất.

(30) Phương pháp tạo ra cây *Eustoma*, bao gồm bước lai ngược liên tiếp cây *Eustoma* có tính bất dục đực tế bào chất có số nộp lưu FERM BP-11506, hoặc thể hệ sau của nó với cây *Eustoma* có đặc tính hữu ích để tạo ra cây *Eustoma* mà có đặc tính hữu ích và biểu hiện tính bất dục đực tế bào chất.

(31) Phương pháp tạo ra cây *Eustoma*, bao gồm bước lai ngược liên tiếp cây *Eustoma* được kích thích từ mô sẹo của cây *Eustoma* có tính bất dục đực tế bào chất có số nộp lưu FERM BP-11507 và được nhân giống vô tính bằng kỹ thuật nuôi cấy mô, hoặc thể hệ sau của nó với cây *Eustoma* có đặc điểm hữu ích để tạo ra cây *Eustoma* mà có đặc tính hữu ích và biểu hiện tính bất dục đực tế bào chất.

(32) Phương pháp tạo ra cây *Eustoma* theo mục bất kỳ trong số các mục từ (29) đến (31), trong đó cây *Eustoma* có đặc tính hữu ích có nguồn gốc từ *E. grandiflorum*.

(33) Cây *Eustoma* được tạo ra bằng phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ (29) đến (32), hoặc thế hệ sau của nó.

(34) Bộ phận của cây *Eustoma* hoặc thế hệ sau của nó theo mục (33).

Hiệu quả của sáng chế

Sáng chế đề xuất phương pháp sử dụng cây *Eustoma* mới có tính bất dục đực tế bào chất, đạt được bằng phương pháp nhân giống cây *Eustoma* và giống F1 của nó có năng suất hạt giống, độ bền của hoa, và/hoặc tính chất trang trí rất tốt và phương pháp sản xuất hạt giống chất lượng cao từ giống F1 của nó.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 thể hiện cây *Eustoma* bất dục đực tế bào chất theo sáng chế và *Eustoma* bất dục đực. Fig. 1(A) thể hiện dòng bất dục đực, Fig. 1(B) và Fig. 1(C) thể hiện dòng bất dục đực tế bào chất có nhị hoa phát triển chưa hoàn chỉnh. Fig. 1(D) thể hiện dòng bất dục đực tế bào chất không có nhị hoa.

Fig. 2 thể hiện kết quả điện di sau khi sử dụng kỹ thuật PCR, làm khuôn, ADN tổng số của dòng *Eustoma* bất dục đực tế bào chất (tế bào chất SSE-CMS: làn 1), loài *Eustoma* đại (làn 2 đến 8) được giữ lại bởi Sakata Seed Corporation, và cây trồng *Eustoma* (làn 9 đến 15) được nhân giống bởi Sakata Seed Corporation. Làn M là thang chuẩn khối lượng phân tử. Fig. 2(A) thể hiện các kết quả thu được bằng cách sử dụng Chỉ thị 1 là chỉ thị đặc hiệu đối với dòng SSE-CMS *Eustoma*. Fig. 2(B) thể hiện các kết quả thu được bằng cách sử dụng Chỉ thị 2 là chỉ thị đặc hiệu cho dòng SSE-CMS *Eustoma*. Fig. 2(C) thể hiện các kết quả thu được bằng cách sử dụng nad5/4-5 là chỉ thị chung cho tất cả các cây *Eustoma*.

Fig. 3 thể hiện trình tự nucleotit của chỉ thị 1 và chỉ thị 2.

Mô tả chi tiết sáng chế

Dưới đây, sáng chế sẽ được mô tả một cách chi tiết.

1. Cây *Eustoma* bất dục đực tế bào chất

Phương pháp nhân giống cây *Eustoma* có tính bất dục được theo sáng chế bao gồm bước sàng lọc cây lai *Eustoma* để chọn cây *Eustoma* có tính bất dục được tế bào chất.

"Cây *Eustoma*" hoặc "*Eustoma*" theo sáng chế dùng để chỉ cây thuộc giống *Eustoma* thuộc họ *Gentianaceae*. Cây này là cây trồng trong vườn thường được biết với tên là *Lisianthus* ở Nhật.

Hoa, bao gồm hoa *Eustoma*, thường có đài hoa và cánh hoa trong đó có nhị hoa và nhụy hoa. Nhị hoa thường bao gồm bao phấn và chỉ nhị chứa phấn hoa. "Tính bất dục được" theo sáng chế dùng để chỉ giai đoạn trong đó nhị hoa được phát triển không hoàn chỉnh do đó không thể đủ để tạo ra phấn hoa. Tính bất dục được được thể hiện bởi, mà không giới hạn ở, ví dụ, cây *Eustoma* không có nhị hoa hoặc nhị hoa được phát triển không hoàn chỉnh (xem Fig. 1). "Tính bất dục được tế bào chất" dùng để chỉ đặc tính bất dục được được thừa hưởng từ cây mẹ bởi gen có nguồn gốc từ một cơ quan của tế bào chất.

Theo sáng chế, "thế hệ sau của cây *Eustoma* có tính bất dục được tế bào chất" có nghĩa là thế hệ tiếp theo hoặc cây *Eustoma* sau đó thu được bằng cách lai cây mẹ là cây *Eustoma* có tính bất dục được tế bào chất với cây bố là cây *Eustoma* có khả năng được lai với cây mang tính bất dục được thừa hưởng từ mẹ. Theo sáng chế, "bộ phận của cây" chứa một hoặc nhiều tế bào của cây hoặc tế bào chất từ một hoặc nhiều tế bào của cây và cụ thể có nghĩa là bộ phận hoặc mô bất kỳ trong số các cơ quan hoặc mô như hoa, lá, thân cây, và rễ, tế bào (bao gồm thể nguyên sinh có nguồn gốc từ các tế bào) hoặc tế bào chất từ các cơ quan hoặc mô này, và tập hợp của các tế bào hoặc tế bào chất.

Trong bản mô tả sáng chế, cụm từ "cây *Eustoma* có số nộp lưu FERM BP-11506" cũng bao gồm các cây có đặc tính bất dục được tế bào chất và gần như giống với cây bình thường. Cụ thể là, cụm từ "cây *Eustoma* có số nộp lưu FERM BP-11506" cũng bao gồm, ví dụ, các đột biến hoặc tái tổ hợp gen của cây *Eustoma* có số nộp lưu FERM BP-11506 với điều kiện là các đột biến hoặc tái tổ hợp gen này duy trì được tính bất dục được tế bào chất.

Trong bản mô tả sáng chế, cụm từ "mô sẹo của cây *Eustoma* có số nộp lưu FERM BP-11507" cũng bao gồm mô sẹo từ các cây mà có đặc tính bất dục đực tế bào chất được tạo ra và gần như tương đương với mô sẹo. Cụ thể là, cụm từ "mô sẹo của cây *Eustoma* có số nộp lưu FERM BP-11507" cũng bao gồm, ví dụ, đột biến hoặc tái tổ hợp gen có nguồn gốc từ mô sẹo của cây *Eustoma* mà có số nộp lưu FERM BP-11507 và mô sẹo có nguồn gốc từ các đột biến hoặc tái tổ hợp gen (giữ lại tính bất dục đực tế bào chất) của cây *Eustoma* mà có số nộp lưu FERM BP-11506, với điều kiện là các cây được tái sinh từ dòng bảo tồn bất dục đực tế bào chất.

Cây *Eustoma* bất dục đực tế bào chất theo sáng chế có các đặc điểm sau đây:

- (1) Dòng này không cần đến bước ngắt nhị các cây mẹ để tạo ra giống thể hệ con thứ nhất và do đó đạt được sự sản xuất hạt giống có hiệu quả về mặt kinh tế.
- (2) Phương pháp lai dòng này với dòng bất dục đực tạo ra hạt giống có độ thuần cao do đặc tính bất dục đực của nó.
- (3) Dòng này có thể được lai với dòng bảo tồn có hệ gen nhân tương tự với hệ gen nhân của dòng và tế bào chất bình thường nhờ đó dễ dàng duy trì và nhân giống dòng.
- (4) Dòng này, không tự thụ phấn, có thể ức chế sự hóa già của hoa do sự thụ phấn gây ra, dẫn đến độ bền của hoa tốt hơn.
- (5) Dòng này không có phần hoa và do đó, không có cánh hoa thối hoặc hoặc bị phủ do sự phát tán phần hoa.

2. Phương pháp tạo ra cây *Eustoma* bất dục đực tế bào chất

Phương pháp sản xuất cây *Eustoma* bất dục đực theo sáng chế bao gồm bước lai cây mẹ là loài cây *Eustoma* đại với cây bố là cây *Eustoma grandiflorum*, bước sàng lọc các cá thể biểu hiện tính bất dục đực trong số các thể hệ sau. Cá thể không có nhị hoa hoặc nhị hoa được phát triển không hoàn chỉnh được sàng lọc đối với cá thể biểu hiện tính bất dục đực. Để xác nhận thêm rằng tính bất dục đực là đặc tính được thừa hưởng từ tế bào chất, cá thể được lai ngược với dòng *Eustoma* bất dục đực, và thể hệ sau của nó được xác nhận để biểu hiện tính bất dục đực.

3. Phương pháp sản xuất hạt giống thể hệ con thứ nhất

Cây *Eustoma* bất dục đực tế bào chất được sản xuất bằng phương pháp theo sáng chế có thể liên tiếp được lai ngược với cây *Eustoma* có đặc tính được ưu tiên nhờ

đó thu được dòng được ưu tiên có tính bất dục đực tế bào chất là thế hệ sau. Dòng được ưu tiên này có tính bất dục đực tế bào chất có thể được sử dụng làm cây mẹ để thu được hạt giống thế hệ con thứ nhất (hạt giống F1).

4. Thử nghiệm độ bền của hoa

Cây *Eustoma* bất dục đực tế bào chất theo sáng chế có thể được đánh giá về độ bền của hoa như được thể hiện dưới đây. Theo sáng chế, "độ bền của hoa" có nghĩa là "thời gian nở hoa". Do đó, "độ bền của hoa dài" có nghĩa là "khoảng thời gian nở hoa tương đối dài từ khi bắt đầu nở hoa đến khi ngừng nở hoa". Liệu khoảng thời gian nở hoa của cây *Eustoma* tương đối dài có được xác định bằng phương pháp đánh giá tương đối của nhiều cá thể tương ứng của cây *Eustoma* bất dục đực bình thường và cây *Eustoma* bất dục đực tế bào chất được trồng dưới các điều kiện môi trường tương tự hay không.

Ví dụ về thử nghiệm độ bền của hoa, phương pháp đánh giá độ bền của hoa cắt sẽ được mô tả. Theo phương pháp này, số lượng thích hợp của các cá thể bất dục đực và cá thể bất dục đực bình thường thích hợp của *Eustoma* được trồng dưới các điều kiện tương tự đầu tiên được tạo ra dưới dạng vật liệu thử nghiệm. Hoa của các cá thể *Eustoma* này được thu đồng thời hầu hết vào ngày nở hoa (ngày quan sát thấy sự mở của cánh hoa) trên cuống của chúng. Cuống được điều chỉnh đến chiều dài không đổi (ví dụ, khoảng từ 4 đến 6cm). Sau đó, vật liệu thử nghiệm đã được điều chỉnh kích thước được giữ đứng trong phòng được kiểm soát nhiệt độ có nhiệt độ không đổi (tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 18 đến 22°C), độ ẩm không đổi (tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 55 đến 65%), và chu kỳ 12-giờ sáng/12-giờ tối sao cho các phần cắt thân của chúng được ngâm trong nước. Quan sát các thay đổi của bông hoa.

"Thời điểm bắt đầu nở hoa" được xác định là thời điểm khi các cánh hoa được mở ra. "Thời điểm ngừng nở hoa" được xác định là thời điểm xuất hiện các cánh hoa (thời điểm héo quắt hoặc teo lại của các cánh hoa) để đo khoảng thời gian nở hoa của mỗi bông hoa (giai đoạn từ khi bắt đầu nở hoa đến khi ngừng nở hoa). Số liệu trung gian của giai đoạn nở hoa được đo tương ứng có thể được xác định và so sánh giữa các cá thể bất dục đực bình thường và cá thể bất dục đực để đánh giá độ bền hoa của cây *Eustoma* bất dục đực theo sáng chế.

5. Sự phát triển của các chỉ thị phân tử để phân biệt tế bào chất

Các trình tự hệ gen ty thể được so sánh giữa dòng *Eustoma* bất dục đực tế bào chất mà được tạo ra theo sáng chế với cây *Eustoma* đã biết thông thường. Vùng đặc hiệu đối với dòng *Eustoma* bất dục đực tế bào chất có thể được nhận biết, nhờ đó tạo ra chỉ thị phân tử đóng vai trò làm yếu tố phân biệt. Chỉ thị phân tử có thể được phát hiện theo phương pháp đã biết bởi người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, như PCR. Việc sử dụng chỉ thị phân tử có thể chứng minh được rằng dòng *Eustoma* bất dục đực tế bào chất theo sáng chế riêng biệt không chỉ khác về đặc tính hình thái học mà còn khác về đặc tính sinh học phân tử so với các cây *Eustoma* đã biết thông thường.

Trình tự nucleotit được nêu trong SEQ ID NO: 1 và 2 có thể được sử dụng làm các chỉ thị phân tử để phân biệt dòng *Eustoma* bất dục đực tế bào chất theo sáng chế. Nói cách khác, dòng *Eustoma* có trình tự nucleotit có nguồn gốc từ trình tự nucleotit được nêu trong SEQ ID NO: 1 hoặc 2 bằng cách làm mất, thay thế, hoặc bổ sung một hoặc nhiều bazơ khác nhau cũng có thể cơ bản liên quan đến dòng gần như tương tự với dòng *Eustoma* bất dục đực tế bào chất theo sáng chế, với điều kiện là trình tự nucleotit được phóng đại và được phát hiện theo cách tương tự như trong trình tự nucleotit có SEQ ID NO: 1 hoặc 2. Ví dụ, trình tự nucleotit có độ đồng nhất là 80%, tốt hơn nếu là 90%, tốt hơn nữa nếu là 95% hoặc có độ đồng nhất cao hơn so với trình tự nucleotit được nêu trong SEQ ID NO: 1 hoặc 2 có thể được sử dụng làm chỉ thị phân tử để phân biệt dòng *Eustoma* bất dục đực tế bào chất.

6. Sự kích thích mô sẹo, sự nhân giống, và biệt hóa lại dòng *Eustoma* bất dục đực tế bào chất

Dòng *Eustoma* bất dục đực tế bào chất được tạo ra theo sáng chế có thể được nhân giống vô tính bằng phương pháp nuôi cấy mô. Dòng *Eustoma* bất dục đực tế bào chất có thể được nhân giống vô tính, ví dụ, bằng phương pháp kích thích mô sẹo và biệt hóa lại được bộc lộ trong tài liệu phi sáng chế 4.

Cụ thể là, bề mặt đĩa lá của dòng *Eustoma* bất dục đực tế bào chất mà được trồng trong nhà kính được vô trùng, tiếp đó được đặt vào môi trường kích thích mô sẹo, và được nuôi cấy để kích thích mô sẹo. Tiếp đó, mô sẹo đã tạo ra được chuyển vào

môi trường được biệt hóa lại và được nuôi cấy để kích thích chồi. Sau đó, chồi đã tạo ra được chuyển vào môi trường ra rễ để kích thích sự ra rễ. Theo cách này, cây được tái sinh. Người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể thiết lập điều kiện nuôi cấy thích hợp để kích thích mô sẹo, nhân giống, và biệt hóa lại theo kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật.

Nội dung của tất cả các patent và tài liệu tham khảo được trích dẫn ở đây được kết hợp để tham khảo toàn bộ. Ngoài ra, các nội dung được mô tả trong bản mô tả và hình vẽ của đơn xin cấp patent Nhật Số 2012-213296 (được nộp vào ngày 27 tháng 9 năm 2012) dựa trên yêu cầu bảo hộ cho đơn ưu tiên của sáng chế trên cơ sở được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế sẽ được mô tả cụ thể theo các ví dụ dưới đây. Tuy nhiên, sáng chế không bị giới hạn ở các ví dụ này theo các cách bất kỳ.

Ví dụ 1: Phương pháp sản xuất cây *Eustoma* mới có tính bất dục đực

Cây *Eustoma* có tính bất dục đực theo sáng chế được tạo ra tại Misato Research Station của Sakata Seed Corporation bằng cách sàng lọc từ các cây lai giữa cây *Eustoma* tự nhiên thuộc loài có tên chưa xác định được giới thiệu từ Mỹ và *Eustoma grandiflorum*.

Quy trình nhân giống cây *Eustoma* theo sáng chế

Khoảng 60 nhóm trong tổng số các cây lai được chuẩn bị trước trong số mười hai dòng cây *Eustoma* tự nhiên thuộc loài có tên loài chưa xác định được lưu giữ bởi Sakata Seed Corporation và dòng bố mẹ (*E. grandiflorum*) có nguồn gốc khác nhau cũng được giữ lại bởi Sakata Seed Corporation để thu được hạt giống F1. Hạt giống F1 này được gieo, và kiểu hình của các cây F1 được kiểm tra. Tiếp đó các quần thể F1 được sàng lọc đối với hai hoặc ba cá thể thích hợp, tiếp đó dựa thuộc vào phương pháp lai theo khối để thu được hạt giống của thế hệ sau (dưới đây, được dùng để chỉ "thế hệ F2").

Hạt giống thế hệ F2 được gieo và khoảng từ 50 đến 100 cá thể được trồng. Đặc điểm kiểu hình được bao gồm trong các quần thể F2 được kiểm tra. Kết quả là, sự

phân chia theo đường kính, màu sắc, và loại hoa, và sự chín sớm được quan sát trong hầu hết các quần thể F2. Trong số các quần thể này, quần thể F2 có nguồn gốc từ hạt giống F1 (dưới đây, được dùng để chỉ Nhóm A) thu được bằng sự lai cây *Eustoma* tự nhiên E-1 có tên loài không xác định được lưu giữ bởi Sakata Seed Corporation là cây mẹ có dòng bố mẹ G-1 (*E. grandiflorum*) là cây bố được đề xuất, không như mong đợi, nhiều cá thể biểu hiện đặc tính bất dục đực mà trước đây chưa được biết về cây *Eustoma*. Một cá thể được chọn trong số các cá thể này và được lai với 4 dòng bố mẹ G-2, G-3, G-4, và G-5 được lưu giữ Sakata Seed Corporation là cây bố để thu được hạt giống con (thế hệ F2BC1; được dùng để chỉ các Nhóm B, C, D, và E, tương ứng). Các thế hệ được chỉ ra bởi BC1, BC2, v.v., với nhiều giống lai ngược thành *E. grandiflorum* với dòng CMS (Tính bất dục đực tế bào chất) để tránh nhầm lẫn.

Hạt giống thế hệ sau (thế hệ F2BC1) này được gieo và đặc tính của 12 cá thể cho mỗi dòng được kiểm tra. Kết quả là, tất cả các dòng và cá thể được biểu hiện là đặc tính bất dục đực mà không có nhị hoa hoặc có nhị hoa được phát triển chưa hoàn chỉnh. Bốn cá thể thế hệ F2BC1 có nguồn gốc từ Nhóm C (dưới đây, được dùng để chỉ ms-1), hai cá thể thế hệ F2BC1 có nguồn gốc từ Nhóm D (dưới đây, được dùng để chỉ ms-2), ba và bốn cá thể thế hệ F2BC1 có nguồn gốc từ Nhóm E (dưới đây, được dùng để chỉ ms-3 và ms-4) được lựa chọn và lai với cây bố, tức là, dòng bố mẹ G-3 và G-6 đối với ms-1, dòng cây mẹ G-4 và G-7 đối với ms-2, dòng cây mẹ G-5 và G-8 đối với ms-3, và dòng cây mẹ G-5 và G-9 đối với ms-4 để thu được cây giống thế hệ sau tương ứng của chúng (thế hệ F2BC2).

Cây giống thế hệ sau (thế hệ F2BC2) được gieo, và các đặc tính kiểu hình của thế hệ sau được kiểm tra. Kết quả là, quần thể thế hệ sau có các dòng thu được bằng cách lai ms-1 với G-3 và G-6 có một số cá thể bất dục đực có nhị hoa được phát triển chưa hoàn chỉnh, trong khi các quần thể khác biểu hiện đặc tính bất dục đực khi không có nhị hoa. Các cá thể bất dục đực này được lai với khoảng 100 dòng bố mẹ để thu được hạt giống thế hệ sau (thế hệ F2BC3).

Hạt giống thế hệ con (thế hệ F2BC3) được gieo và đặc tính kiểu hình của thế hệ sau được thử nghiệm. Kết quả là, thế hệ sau được xác nhận có đặc tính bất dục đực. Điều này chứng minh rằng dòng bất dục đực tế bào chất biểu hiện tính di truyền từ mẹ

ổn định được sản xuất thành công. Do đó, tế bào chất của nó được thiết kế dưới dạng tế bào chất SSE-CMS. Hạt giống F2BC1 biểu hiện tính bất dục được ổn định của tế bào chất được lưu trữ bởi National Institute of Technology and Evaluation (NITE) International Patent Organisms Depositary (Tsukuba Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki, Japan) vào ngày 20 tháng 07, 2012 (số chỉ dẫn được đưa ra bởi kho lưu giữ để nhận biết: 08P-81S; Số nộp lưu FERM BP-11506).

Ví dụ 2: Sự công nhận khả năng sinh sản của cây bất dục được

Để xác nhận sự xuất hiện ổn định của đặc tính bất dục được, cây mẹ là cây *Eustoma* E-1 được lai với dòng bố mẹ G-10 (*E. grandiflorum*) để tạo ra hạt giống F1 (dưới đây, được dùng để chỉ Nhóm F). Hạt giống thuộc Nhóm A và F được gieo, và 6 cá thể mỗi nhóm được chọn và dựa vào phương pháp lai theo khối. Kết quả là, các cá thể có nguồn gốc từ Nhóm A tạo ra hạt giống thế hệ F2 ở hiệu suất bằng 0,22g cho 56 quả đậu, trong khi các cá thể có nguồn gốc từ Nhóm F tạo ra hạt giống thế hệ F2 ở hiệu suất bằng 0,47g cho 59 quả đậu. Hạt giống thế hệ F2 của mỗi nhóm được gieo và được thử nghiệm về tốc độ nảy mầm của các cá thể bất dục được. Kết quả là, 19 trong số 92 cá thể thế hệ F2 có nguồn gốc từ Nhóm A và 14 trong số 88 cá thể thế hệ F2 có nguồn gốc từ Nhóm F có biểu hiện đặc tính bất dục được.

Các kết quả này chỉ ra rằng đặc tính bất dục được xuất hiện khá ổn định.

Ví dụ 3: thử nghiệm độ bền của hoa đối với giống *Eustoma* có tính bất dục được

Các dòng bất dục và dòng hữu dục được phụ thuộc vào thử nghiệm độ bền của hoa.

(1) Vật liệu thử nghiệm

Hai loại cây *Eustoma* được sử dụng làm vật liệu thử nghiệm bao gồm: cá thể F1 của cây *Eustoma* hữu dục được bình thường và cá thể F1 của cây *Eustoma* bất dục được tế bào chất. Hoa (tất cả đều bắt đầu nở hoa) thuộc hai loại cá thể *Eustoma* này thu được từ cánh đồng trồng *Eustoma* cùng với cuống của chúng. Cuống hoa được điều chỉnh đến chiều dài bằng 4cm. Đầu nhụy của các cá thể *Eustoma* hữu dục được được thụ phấn bằng tay với giả thuyết rằng các cá thể này sẽ được vận chuyển. Ngoài ra, các cá thể *Eustoma* bất dục được tế bào chất cũng được hoặc không được thụ phấn thủ công

hoặc không được thụ phấn bằng tay bằng phấn hoa của dòng bất dục đực, và cả hai cá thể này đều phụ thuộc vào thử nghiệm.

(2) Phương pháp thử nghiệm

Thử nghiệm độ bền của hoa được thực hiện cho mỗi vật liệu thử nghiệm được đặt vào ống thử nghiệm đổ đầy nước vôi và được thực hiện trong phòng được điều chỉnh nhiệt độ mà có nhiệt độ bằng khoảng 20°C, độ ẩm bằng 60% ($\pm 5\%$), và chu trình 12 giờ mở/12 giờ tắt của đèn huỳnh quang chung (I-line White Rapid 40W). Trong thử nghiệm này, nước không được thay do sự nhiễm tạp, v.v..., mà không nhìn thấy được trong nước.

(3) Phương pháp đánh giá và xác định

"Thời điểm bắt đầu nở hoa" được định nghĩa là thời điểm khi các cánh hoa mở ra. "Thời điểm ngừng nở hoa" được xác định trên cơ sở xuất hiện cánh hoa (thời điểm héo quắt hoặc teo lại của hoa) bởi người gây giống.

(4) Các kết quả thử nghiệm

Cây *Eustoma* bất dục đực tế bào chất được thụ phấn bằng phấn hoa của dòng hữu dục có độ bền của hoa không khác nhiều so với độ bền của hoa từ cây *Eustoma* bất dục đực. Điều này chứng minh rằng các điều kiện thử nghiệm là điều kiện trong bối cảnh di truyền của dòng được sử dụng mà không ảnh hưởng đến độ bền của hoa. Do cây *Eustoma* bất dục đực tế bào chất không tạo ra phấn hoa, do đó độ bền của hoa về trung bình bằng 7 ngày lâu hơn so với độ bền của hoa của dòng hữu dục đực (Bảng 1).

Bảng 1 Thử nghiệm độ bền của hoa

Vật liệu	Phương pháp xử lý	Số lượng cá thể ở thời điểm ngừng nở hoa							
		4 ngày sau đó	5 ngày sau đó	6 ngày sau đó	7 ngày sau đó	8 ngày sau đó	9 ngày sau đó	10 ngày sau đó	11 ngày sau đó
Dòng hữu dục đực	Thụ phấn bằng tay	12	17	15	9	5	2	1	
Dòng bất dục đực	Thụ phấn bằng tay phấn hoa có nguồn gốc từ dòng hữu dục	3	11	14	10	11	8	3	

Dòng bất dục đực	Không cần thụ phấn				3	3	4	6	7
------------------------	-----------------------	--	--	--	---	---	---	---	---

Vật liệu	Phương pháp xử lý	Số lượng cá thể ở thời điểm ngừng nở hoa							Tổng số các cá thể được thử nghiệm	Số ngày trung bình cho đến thời điểm ngừng nở hoa
		12 ngày sau đó	13 ngày sau đó	14 ngày sau đó	15 ngày sau đó	16 ngày sau đó	17 ngày sau đó	18 ngày sau đó		
Dòng hữu dục đực	Thụ phấn bằng tay								61	5,8
Dòng bất dục đực	Thụ phấn bằng tay phấn hoa có nguồn gốc từ dòng hữu dục								60	6,9
Dòng bất dục đực	Không cần thụ phấn	6	8	5	5	2	4	7	60	12,8

Ví dụ 4: Phát triển các chỉ thị phân tử để phân biệt dòng SSE-CMS *Eustoma*

Dòng SSE-CMS *Eustoma* được tạo ra theo sáng chế biểu hiện đặc điểm kiểu hình mà không được tìm thấy ở các cây trồng thông thường hoặc loại dại. Trong khi đó, chỉ thị phân tử để phân biệt dòng SSE-CMS *Eustoma* được tạo ra để chứng minh rằng dòng này cũng khác với các cây *Eustoma* đã biết thông thường từ quan điểm inh học phân tử.

Các môi liên ứng với ADN ty thể được mô tả trong Tài liệu phi sáng chế 5 được sử dụng để thực hiện phương pháp phân tích PCR với dòng SSE-CMS *Eustoma* và dòng *Eustoma* hiện tại là các khuôn. Kết quả là, các chỉ thị khác nhau về kích thước của các đoạn ADN đã được phóng đại được tìm thấy. Hai loại chỉ thị, tức là, nad4L/orf25 và nad7/4-5, được chọn trong số các chỉ thị nhiều dạng này, và trình tự nucleotit của đoạn đã phóng đại được phân tích. Kết quả là, các vùng đặc hiệu với dòng SSE-CMS *Eustoma* được nhận biết. Để sử dụng các vùng này làm yếu tố phân

biệt, các môi được thể hiện trong Bảng 2 được thiết kế, và phương pháp phân tích PCR (30 chu trình lặp, mỗi chu trình bao gồm sự biến tính nhiệt ở nhiệt độ 94°C trong thời gian 1 phút, gắn ở nhiệt độ 65°C trong thời gian 1 phút, và phản ứng kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong thời gian 1 phút) được thực hiện. Kết quả là, 2 dạng chỉ thị phân tử, "Chỉ thị 1" và "Chỉ thị 2", chỉ cho phép phóng đại đoạn ADN từ dòng SSE-CMS *Eustoma* được tạo ra thành công. Chỉ thị 1 là chỉ thị cho phép phóng đại đoạn ADN 323-bp được nêu trong SEQ ID NO: 1 sử dụng các môi orf25-F và orf25-R (Fig. 3). Chỉ thị 2 là chỉ thị chỉ cho phép phóng đại đoạn ADN 492-bp được nêu trong SEQ ID NO: 2 sử dụng các môi nad7-F và nad7-R (Fig. 3).

Các chỉ thị được chuẩn bị bằng các phương pháp được mô tả ở trên được sử dụng để thực hiện thử nghiệm PCR, sử dụng làm khuôn, 190 dòng *Eustoma* hiện tại (*E. grandiflorum*) được nhân giống bởi Sakata Seed Corporation và 34 dòng loài *Eustoma* đại được lưu giữ bởi Sakata Seed Corporation. Kết quả là, dòng mang hai loại trình tự nucleotit này được xác nhận chỉ là dòng SSE-CMS *Eustoma*. Phần kết quả thử nghiệm được thể hiện trong Fig. 2. Các thử nghiệm trong các hình vẽ từ Fig. 2(A) đến 2(C) được thực hiện theo các điều kiện dưới đây:

Fig. 2(A): Chỉ thị 1: Chỉ thị đặc hiệu cho dòng SSE-CMS *Eustoma*

Trình tự nucleotit (323 bp) được nêu trong SEQ ID NO: 1 được phóng đại bằng PCR (30 chu trình, mỗi chu trình bao gồm bước làm biến tính nhiệt ở nhiệt độ 94°C trong thời gian 1 phút, gắn ở nhiệt độ 65°C trong thời gian 1 phút, và phản ứng kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong thời gian 1 phút) sử dụng các môi orf25-F và orf25-R.

Fig. 2(B): Chỉ thị 2: Chỉ thị đặc hiệu cho dòng SSE-CMS *Eustoma*

Trình tự nucleotit (492 bp) được nêu trong SEQ ID NO: 2 được phóng đại bằng PCR (30 chu trình, mỗi chu trình bao gồm bước biến tính nhiệt ở nhiệt độ 94°C trong thời gian 1 phút, gắn ở nhiệt độ 65°C trong thời gian 1 phút, và phản ứng kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong thời gian 1 phút) sử dụng các môi nad7-F và nad7-R.

Fig. 2(C): nad5/4-5: Chỉ thị chung cho tất cả các cây *Eustoma*

Đoạn ADN bằng khoảng 1,5kb được phóng đại từ tất cả các dòng bằng phương pháp PCR (30 chu trình, mỗi chu trình bao gồm bước biến tính nhiệt ở nhiệt độ 94°C

trong thời gian 1 phút, gắn ở nhiệt độ 60°C trong thời gian 1 phút, và phản ứng kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong thời gian 1 phút) sử dụng các mồi nad5/4 và nad5/5.

Sau đó, dòng SSE-CMS *Eustoma* được tạo ra bởi sáng chế được thể hiện khác với các cây *Eustoma* đã biết thông thường.

Bảng 2 Mồi được sử dụng theo sáng chế và trình tự nucleotit của chúng

Tên chỉ thị	Tên mồi	Trình tự nucleotit (5'→3')
nad4L/orf25	orf25 (SEQ ID NO: 7)	CTGTYTTTTTCGCACTTAGGC
	nad4L (SEQ ID NO: 8)	GTCCGRGGTACTATTGCTGT
nad7/4-5	nad7/4 (SEQ ID NO: 9)	TGTCCTCCATCACGATVTCG
	nad7/5 (SEQ ID NO: 10)	CCAAATTCTCCTTTAGGTGC
Chỉ thị 1 (SEQ ID NO: 1)	orf25-F (SEQ ID NO: 3)	CTACTGAATCCAAGCGAGTGG
	orf25-R (SEQ ID NO: 4)	TAGGTAGAGCTGGGCGAGAA
Chỉ thị 2 (SEQ ID NO: 2)	nad7-F (SEQ ID NO: 5)	AACCACTAACACCTTCCTCGT
	nad7-R (SEQ ID NO: 6)	GCTCTATCTACGTATCTTGAAGTTTC
nad5/4-5	nad5/4 (SEQ ID NO: 11)	CCAATTTTTTGGGCCAATTCC
	nad5/5 (SEQ ID NO: 12)	CATTGCAAAGGCATAATGAT

Ví dụ 5: Kích thích mô sẹo, phát triển, và biệt hóa lại dòng SSE-CMS *Eustoma*

Để nhân giống vô tính, bằng phương pháp nuôi cấy mô, dòng SSE-CMS *Eustoma* được tạo ra theo sáng chế, đĩa lá của dòng SSE-CMS *Eustoma* được trồng trong nhà kính được thu gom. Bề mặt của đĩa lá được vô trùng trong thời gian 10 phút sử dụng dung dịch natri hypoclorit 1% và được rửa bằng nước vô trùng. Đĩa lá đã vô trùng được đặt vào môi trường MS được bổ sung 1,5mg/l NAA để kích thích mô sẹo. Mô sẹo được chuyển vào môi trường B5 được bổ sung 0,5mg/l GA3 và 1,5mg/l BA để kích thích chồi. Chồi đã tạo ra được chuyển vào môi trường B5 không chứa hoóc môn thực vật để ra rễ để tái sinh cây, tiếp đó được xác nhận là bất dục đực.

Mô sẹo được tạo ra bởi phương pháp được mô tả ở trên được lưu trữ quốc tế bởi National Institute of Technology and Evaluation (NITE) International Patent

Organisms Depository (Tsukuba Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki, Japan)
vào ngày 26 tháng 07 năm 2012 (số chỉ dẫn được đưa ra bởi kho lưu giữ để nhận biết:
12S-134C; số nộp lưu FERM BP-11507).

Khả năng ứng dụng trong công nghiệp

Sáng chế đề xuất cây *Eustoma* có tính bất dục đực tế bào chất, nhân giống được cây *Eustoma* và giống F1 của nó có khả năng sinh sản bằng hạt giống, độ bền của hoa, và/hoặc đặc tính trang trí ưu việt và hạt giống sản xuất chất lượng cao của giống F1 của nó.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Cây *Eustoma* có tính bất dục đực tế bào chất hoặc thể hệ sau của nó, trong đó cây *Eustoma* này hoặc thể hệ sau của nó chứa tế bào chất có số nột lưu FERM BP-11506.
2. Cây *Eustoma* có tính bất dục đực tế bào chất hoặc thể hệ sau của nó, trong đó cây *Eustoma* này hoặc thể hệ sau của nó có số nột lưu FERM BP-11506.
3. Bộ phận của cây *Eustoma* hoặc thể hệ sau của nó theo điểm 1 hoặc 2.
4. Hạt giống của cây *Eustoma* hoặc thể hệ sau của nó theo điểm 1 hoặc 2.
5. Tế bào chất chứa trong cây *Eustoma* hoặc thể hệ sau của nó theo điểm 1 hoặc 2, trong bộ phận của cây theo điểm 3 hoặc trong hạt giống theo điểm 4.
6. Ty thể chứa trong cây *Eustoma* hoặc thể hệ sau của nó theo điểm 1 hoặc 2, trong bộ phận của cây theo điểm 3 hoặc trong hạt giống theo điểm 4.
7. Mô sẹo của cây *Eustoma* có tính bất dục đực tế bào chất, trong đó cây *Eustoma* này chứa tế bào chất có số nột lưu FERM BP-11507.
8. Mô sẹo của cây *Eustoma* có tính bất dục đực tế bào chất, có số nột lưu FERM BP-11507.
9. Tế bào chất chứa trong mô sẹo theo điểm 7 hoặc 8.
10. Ty thể chứa trong mô sẹo theo điểm 7 hoặc 8.
11. Phương pháp tạo ra hạt giống thể hệ con thứ nhất bao gồm bước lai cây mẹ là cây *Eustoma* hoặc thể hệ sau của nó theo điểm 1 hoặc 2, với cây bố là cây *Eustoma* có khả năng lai được với cây mẹ này, và do đó tạo ra hạt giống thể hệ con thứ nhất từ cây mẹ được lai này.
12. Phương pháp theo điểm 11, trong đó cây bố là *Eustoma grandiflorum* (*E. grandiflorum*).
13. Phương pháp tạo ra cây *Eustoma*, cây *Eustoma* này có đặc tính hữu ích và biểu hiện tính bất dục đực tế bào chất, trong đó phương pháp này bao gồm bước: lai ngược liên tiếp cây *Eustoma* hoặc thể hệ sau của nó theo điểm 1 hoặc 2 với cây *Eustoma* có đặc tính hữu ích.
14. Phương pháp tạo ra cây *Eustoma*, cây *Eustoma* này có đặc tính hữu ích và biểu hiện tính bất dục đực tế bào chất, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

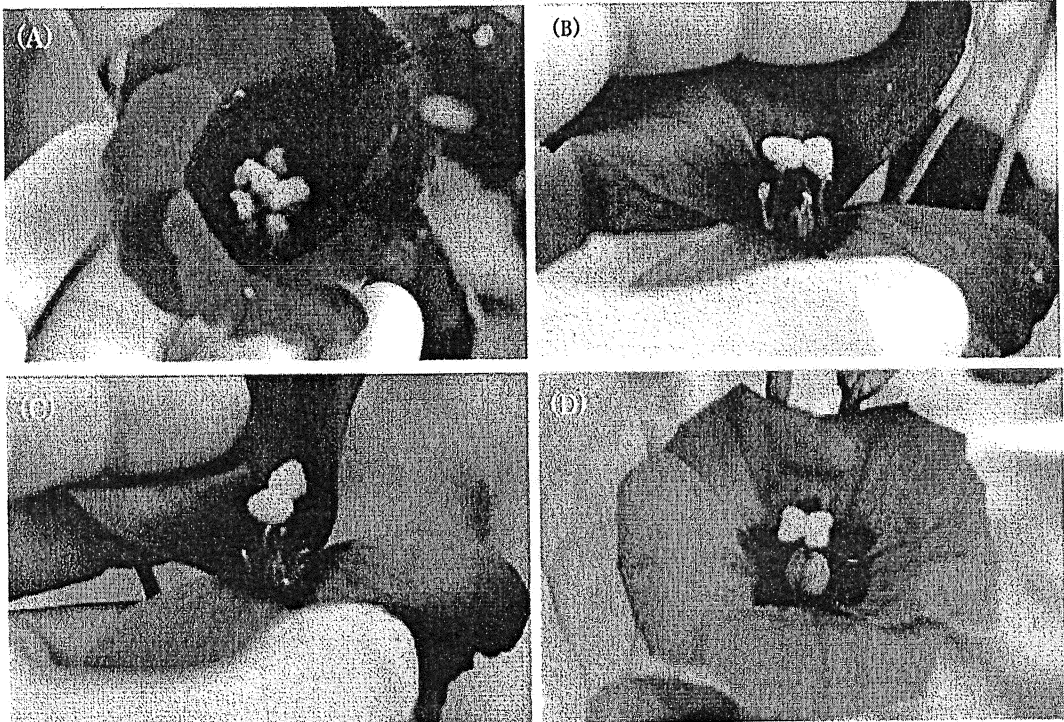
tạo ra cây *Eustoma* hoặc thể hệ sau của nó mà được kích thích từ mô sẹo của cây *Eustoma* chứa tế bào chất có số nộp lưu FERM BP-11507 và được nhân giống vô tính bằng kỹ thuật nuôi cấy mô;

lai ngược liên tiếp cây *Eustoma* đã được tạo ra hoặc thể hệ sau của nó với cây *Eustoma* có đặc tính hữu ích để tạo ra cây *Eustoma* có đặc tính hữu ích và biểu hiện tính bất dục đực tế bào chất.

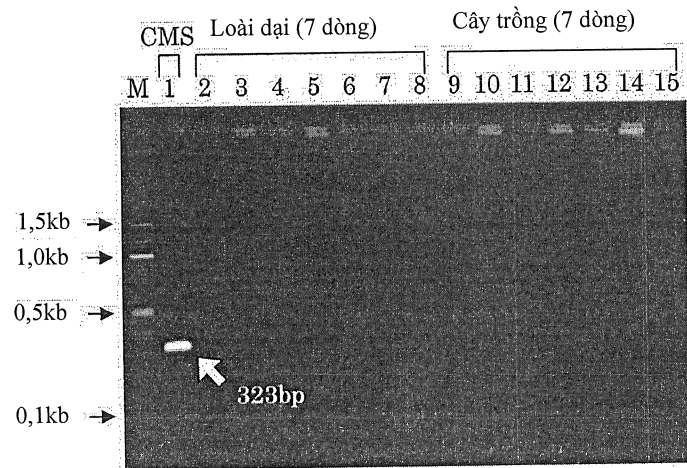
15. Phương pháp tạo ra cây *Eustoma* theo điểm 13 hoặc 14, trong đó cây *Eustoma* có đặc tính hữu ích có nguồn gốc từ *Eustoma grandiflorum* (*E. grandiflorum*).

16. Hệ gen ty thể được chứa trong ty thể theo điểm 6.

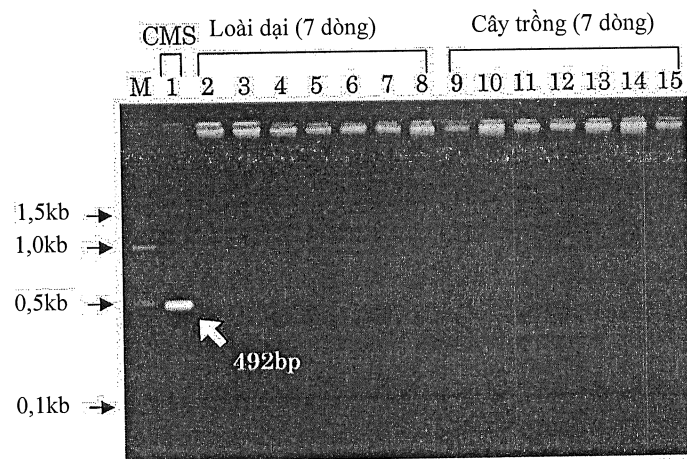
17. Hệ gen ty thể được chứa trong ty thể theo điểm 10.



(A) Chỉ thị 1



(B) Chỉ thị 2



(C) nad5/4-5

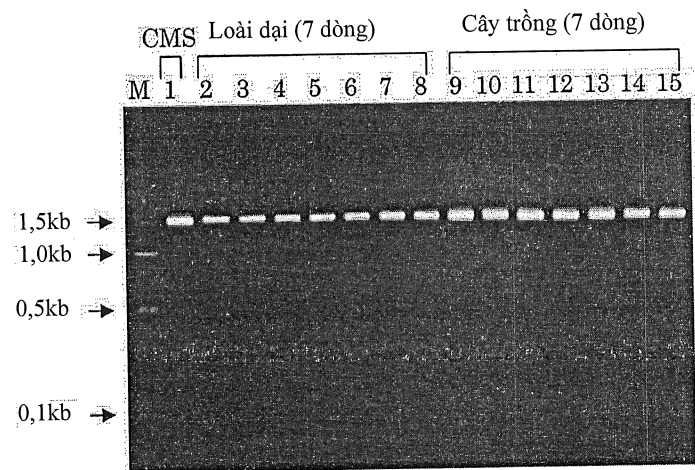


Fig.2

- (A) SEQ ID Số: 1 (chỉ thị 1) Vùng được gạch dưới thể hiện các vị trí môi được thiết kế theo sáng chế.

CTACTGAATCCAAGCGAGTGGAATACTTGGAGCGAGCGAGGAGCGAGTGGAATACTTGGAGCGAGCG
AGGAGCGAGTGGAATACTTGGAGCGAGCGAGGAGCGAGTGGAATACTTGGAGCGAGCGAGGAGCGAG
TGGAATGAACGAAAAACCTAAGAAAATCAACTTCAATCAGTGAGCTAGATGAGAAAGGAGACTGAAG
AAACTGAAAGAGTAGTAGGAGGATGAAAAAGGAAGCAAGTGGAGTAGGAGCGAACGTGGGAGTAGGA
AACCCGCTTCCTTTCTTACCCTAAACCCACTTCCTTTCTCGCCCAGCTCTACCTA

- (B) SEQ ID Số: 2 (chỉ thị 2) Vùng được gạch dưới thể hiện các vị trí môi được thiết kế theo sáng chế.

AACCACTAACACCTTCCTCGTTGGGGCTCCGTGCACTGGGAAAACGCTAACGCGACGTTTTTAACTA
GAGTTACAAAGCTCCAATAAGGTATCGAGAGGGCTATCATCGAGAGGAAGCGAGTTCCTACTTGAA
ACGAGCATGGGAGCGAGCGGAGTACTTTCAGCGAGCCTAAAAAGCGAGTTCCTACTCCCATGTTTCG
CTCCAGGTGTTCCGCTCACTTGGAACGAAAAACCTAAGAAAATCAACTTCAATCAGTGAGCTAGATG
AGAAAGGAGACTGAATCAACATCAAGAGTAGTAGGTTTGAGAGGATGAGAAGGTAACCGAAGAAAAG
AAAAAAAATCAGTGAGCTAGATGAGAATTAGGAAAAGAGACTTGATCTTATTCAATCAGTGATGAGA
AAGGAGCAAGTGGAGAATCAACATAAATCGAAGTAGAGTGAGCTAGATGAGAAAGGAGACTGAAGAA
ACTTCAAGATACGTAGATAGAGC

Fig.3

DANH MỤC TRÌNH TỰ

- <110> Sakata Seed Corporation
- <120> Cây Eustoma có tính bất dục dục tế bào chất và phương pháp tạo ra cây Eustoma này
- <130> PS38-9001W0
- <150> JP2012-213296
- <151> 2012-09-27
- <160> 12
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 323
- <212> ADN
- <213> chưa biết
- <220>
- <223> chỉ thị 1
- <400> 1
- | | |
|--|-----|
| ctactgaatc caagcgagtg gaatacttgg agcgagcgag gagcgagtgg aatacttgga | 60 |
| gcgagcgagg agcgagtgga atacttggag cgagcgagga gcgagtggaa tacttggagc | 120 |
| gagcgaggag cgagtggaaat gaacgaaaaa cctaagaaaa tcaacttcaa tcagtgagct | 180 |
| agatgagaaa ggagactgaa gaaactgaaa gagtagtagg aggatgaaaa aggaagcaag | 240 |
| tggagtagga gcgaacgtgg gagtaggaaa cccgcttcct ttcttaccct aaaccactt | 300 |
| cctttctcgc ccagctctac cta | 323 |
- <210> 2
- <211> 492
- <212> ADN
- <213> chưa biết
- <220>
- <223> chỉ thị 2
- <400> 2
- | | |
|---|----|
| aaccactaac accttcctcg ttgggggtcc gtgcactggg aaaacgctaa cgcgacgttt | 60 |
|---|----|

ttaactagag ttacaaagct ccaataaggt atcgagaggg ctatcatcga gaggaagcga	120
gttcatact tgaaacgagc atgggagcga gcggagtact ttcagcgagc ctaaaaagcg	180
agttccatac tcccatgttc gctccaggtg ttccgctcac ttggaacgaa aaacctaga	240
aatcaactt caatcagtga gctagatgag aaaggagact gaatcaacat caagagtagt	300
aggtttgaga ggatgagaag gtaaccgaag aaaagaaaaa aatcagtga gctagatgag	360
aattaggaaa agagacttga tcttattcaa tcagtgatga gaaaggagca agtggagaat	420
caacataaat cgaagtagag tgagctagat gagaaaggag actgaagaaa cttcaagata	480
cgtagataga gc	492

<210> 3
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> mỗi

<400> 3	
ctactgaatc caagcgagtg g	21

<210> 4
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> mỗi

<400> 4	
taggtagagc tgggcgagaa	20

<210> 5
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> mỗi

<400> 5 aaccactaac accttcctcg t	21
<210> 6 <211> 26 <212> ADN <213> Trình tự nhân tạo	
<220> <223> mồi	
<400> 6 gctctatcta cgtatcttga agtttc	26
<210> 7 <211> 20 <212> ADN <213> Trình tự nhân tạo	
<220> <223> mồi	
<400> 7 ctgtyttttc gcacttaggc	20
<210> 8 <211> 20 <212> ADN <213> Trình tự nhân tạo	
<220> <223> mồi	
<400> 8 gtccgrggta ctattgctgt	20
<210> 9 <211> 20 <212> ADN <213> Trình tự nhân tạo	
<220> <223> mồi	
<400> 9	

tgtcctccat cacgatvtcg 20

<210> 10
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> mồi

<400> 10
 ccaaattctc ctttaggtgc 20

<210> 11
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> mồi

<400> 11
 ccaatttttg ggccaattcc 20

<210> 12
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> mồi

<400> 12
 cattgcaaag gcataatgat 20