



(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)



1-0039002

(51)⁷ A01H 6/14; C12N 15/82; A01H 1/00; (13) B
A01H 5/02

(21) 1-2019-02124

(22) 29/08/2017

(86) PCT/EP2017/071647 29/08/2017

(87) WO 2018/065151 12/04/2018

(30) PCT/EP2016/073672 04/10/2016 EP

(45) 26/02/2024 431

(43) 26/08/2019 377A

(73) DÜMMEN GROUP B.V. (NL)

Coldenhovelaan 6, 2678 PS De Lier, the Netherlands

(72) MARIS, Paulus Cornelis (NL); VAN DEN HEUVEL, Johannes Franciscus Johanna Maria (NL).

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

(54) CÂY CHRYSANTHEMUM KHÁNG GỈ TRẮNG VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN
XUẤT CÂY CHRYSANTHEMUM THỂ HỆ CON KHÁNG GỈ TRẮNG

(57) Sáng chế đề cập đến cây kháng gỉ trắng của chi Chrysanthemum và hạt, phần cây, tế bào cây và thể hệ con của nó. Sáng chế còn đề cập đến phương pháp, và cụ thể là gen đánh dấu phân tử để nhận dạng cây kháng gỉ trắng của chi Chrysanthemum. Cụ thể là, sáng chế đề cập đến cây thuộc chi Chrysanthemum, cây này kháng với gỉ trắng và cây này chứa trong bộ gen của chúng ít nhất một vùng gen, hoặc gen hoặc alen, tạo ra tính kháng gỉ trắng, ít nhất một vùng gen, hoặc gen hoặc alen, tạo ra tính kháng gỉ trắng về mặt di truyền được liên kết với trình tự axit nucleic chứa trong ít nhất một bản sao ở bộ gen của cây kháng và được thể hiện bằng SEQ ID No. 3.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến cây kháng gỉ trắng của chi *Chrysanthemum* và hạt, phần cây, tế bào cây và thể hệ con của nó. Sáng chế còn đề cập đến phương pháp, và cụ thể là gen đánh dấu phân tử, để nhận dạng cây kháng gỉ trắng của chi *Chrysanthemum*.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Chrysanthemum, cũng được gọi là chrysant(h), là cây có hoa của chi *Chrysanthemum* trong họ Asteraceae. Cây này sinh trưởng tự nhiên ở châu Á và phía đông bắc châu Âu và bao gồm một số lớn loại và cây trong vườn.

Một số giống *Chrysanthemum* trong đó *Chrysanthemum* của người trồng hoa quan trọng về mặt kinh tế trước đây được phân loại ở chi *Dendranthema*. Tuy nhiên, hiện tại, *Chrysanthemum* của người trồng hoa được phân loại lại là *Chrysanthemum indicum*, khôi phục vị trí của *Chrysanthemum* này trong chi *Chrysanthemum*.

Loài *Chrysanthemum* có trong tự nhiên là cây có quanh năm dạng cỏ. Loài *Chrysanthemum* này biểu hiện lá sắp xếp xen nhau được chia ra lá non với rìa có răng hoặc đôi khi nhẵn. *Chrysanthemum* được trồng đầu tiên ở Trung Quốc dưới dạng thảo mộc có hoa từ thế kỷ thứ 15 trước công nguyên và hơn 500 cây đã được ghi lại đến năm 1630.

Chrysanthemum được trồng hiện tại biểu hiện việc có hoa rõ rệt và có thẩm mỹ hơn so với họ hàng đại của chúng. Đầu hoa xuất hiện ở nhiều dạng, và có thể giống cúc hoặc để trang trí, như xếp nụ hoa hoặc búp mầm. Chi này chứa nhiều thể lai và hàng nghìn cây được phát triển cho mục đích trong vườn. Ngoài màu vàng truyền thống, các màu khác cũng có thể có, như trắng, tím, và đỏ. Thể lai quan trọng nhất là *Chrysanthemum x morifolium*, cũng được gọi là *Chrysanthemum x grandiflorum*, chủ yếu có nguồn gốc từ *Chrysanthemum indicum*.

Chrysanthemum có thể được chia thành hai nhóm cơ bản, chịu đựng được rét trong vườn và trưng bày. *Chrysanthemum* trong vườn là loại có quanh năm có khả năng qua đông ở hầu hết vĩ độ bắc. Loại trưng bày thông thường không có khả năng vẫn còn sống sau mùa đông. *Chrysanthemum* trong vườn có thể được định nghĩa bằng khả năng tạo ra nhiều hoa nhỏ với một ít sự hỗ trợ máy móc bất kỳ nếu có, như đóng cọc, và có

thể chịu đựng gió và mưa. Loại trung bày thông thường cần đóng cọc, qua đông trong môi trường tương đối khô, mát, và thỉnh thoảng bỏ sung đèn vào ban đêm.

Gỉ trắng là bệnh ở cây gây ra bởi Basidiomycota. Basidiomycota tạo ra chuỗi thể hệ huyết thống riêng của vi sinh vật có nhân điển hình giống nấm. Chúng là sinh vật dạng sợi, quan sát dưới kính hiển vi, hấp thụ mà tái tạo bằng cả sinh sản hữu tính và vô tính. Basidiomycete chiếm cả lối sống hoại sinh và gây bệnh, và bao gồm một số thể gây bệnh khét tiếng nhất của cây, gây bệnh tàn phá chẳng hạn như thối nâu có hạch của khoai tây, cà chua và phạm vi rộng cây cảnh và rỉ sắt của lúa mì. Basidiomycete được biết đến để sản xuất thể quả lớn như nấm, nấm trùn và mốc và là sinh vật quan trọng trong sự phân rã của gỗ và lá.

Ở *Chrysanthemum*, gỉ trắng là bệnh thông thường gây ra bởi basidiomycete gây bệnh hoặc nấm *Puccinia horiana*. Triệu chứng đặc biệt ở *Chrysanthemum* bao gồm đốm gỉ trắng trên bề mặt trên của lá. Các đốm này ban đầu có màu xanh nhạt đến màu vàng và đường kính lên tới 5 mm, nhưng có thể chuyển sang màu nâu khi mô bị hoại tử. Ở mặt dưới của lá, các đốm phát triển thành nốt mủ màu hồng hoặc trắng mà trở nên lồi khi bào tử mùa đông phát triển. Bệnh thông thường tiếp tục ở các đoạn cắt và cây bị nhiễm, bao gồm hoa đã cắt, của *Chrysanthemum* nhà kính.

Cho tới năm 1963, *Puccinia horiana* được giới hạn ở Trung Quốc và Nhật Bản. Tuy nhiên, do nó lan nhanh trên các đoạn cắt nhập khẩu bị nhiễm và hiện là bệnh đáng sợ và nghiêm trọng trong các vườn ươm ở châu Âu. Một số lớn dạng bệnh *P. horiana* đã được biết, và sự khác biệt lớn về tính độc của dạng bệnh *P. horiana* sau khi cấy trên nhiều cây *Chrysanthemum* được chứng minh (De Backer, 2012). *P. horiana* dạng bệnh NL1, thu được năm 2006 ở The Netherlands thể hiện là dạng độc nhất.

Việc phun ngăn ngừa với thuốc diệt nấm hiệu quả nhưng tốn tiền. Khi khí hậu rất thích hợp với gỉ trắng thậm chí phun ngăn ngừa không đủ hiệu quả và loại mẫn cảm có khả năng bị nhiễm cao. Thành phần hoạt động được phát hiện ra hữu ích bao gồm oxycarboxin, triforin, benodanil, triadimefon, diclobutrazol, bitertanol và propiconazol. *Verticillium lecanii* đã được gợi ý để điều tiết hệ sinh thái bằng biện pháp sinh học trên *Chrysanthemum* nhà kính.

Xem xét thiệt hại đáng kể với việc trồng *Chrysanthemum* bởi gỉ trắng, có nhu cầu trong lĩnh vực kỹ thuật này để tạo ra nguồn kháng di truyền mới, tức là trong lĩnh vực

kỹ thuật này cần gen kháng mới tạo ra tính kháng gỉ trắng độ bền cao cho cây của chi *Chrysanthemum*.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế, trong các mục đích khác, đáp ứng nhu cầu trên của lĩnh vực kỹ thuật này.

Theo sáng chế, mục đích này được đáp ứng bởi sáng chế bằng phương pháp đề xuất cây, phần cây, hạt và phương pháp như đã nêu ở các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

- Fig. 1: thể hiện dưới dạng biểu đồ mối tương quan giữa tỷ lệ ước tính giữa bản sao của alen kháng và alen mẫn cảm và kiểu gen KASP ở hai locut có tính kháng (SNP 115 và SNP 123). Đối với cả tỷ lệ GBS và tỷ lệ KASP, giá trị lớn hơn chỉ bản sao của alen kháng nhiều hơn.
- Fig. 2: thể hiện dưới dạng biểu đồ mối liên quan giữa điểm số liệu theo trình tự kiểu gen và profin tính kháng tại hai gen đánh dấu SNP trong các cá thể F1 (lai lựa chọn 08041 x lựa chọn 02033). Tại cả hai gen đánh dấu mỗi liên quan rất đáng kể khi các cá thể mang nhiều bản sao của alen kháng hơn thông thường kháng hơn.
- Fig. 3: thể hiện dưới dạng biểu đồ mối liên quan giữa điểm số kiểu gen KASP và profin tính kháng tại hai gen đánh dấu SNP trong các cá thể F1 (lai lựa chọn 08041 x lựa chọn 02033). Tại cả hai gen đánh dấu mỗi liên quan rất đáng kể.
- Fig. 4: thể hiện biểu đồ thể hiện phân bố của tỷ lệ liệu GBS đa hợp ở đời con F1. Tỷ lệ GBS lớn hơn chỉ ra cá thể đó mang nhiều bản sao “kháng” của kiểu đơn được mô tả hơn.

Mô tả chi tiết sáng chế

Cụ thể là, theo khía cạnh đầu tiên, đối tượng này của sáng chế, trong số nhiều đối tượng khác, được đáp ứng bằng cách đề xuất cây thuộc chi *Chrysanthemum*, cây này kháng với gỉ trắng và cây chứa trong bộ gen của chúng ít nhất một vùng gen, hoặc gen hoặc alen, tạo ra tính kháng gỉ trắng, ít nhất một vùng gen hoặc gen, tạo ra tính kháng gỉ trắng về mặt di truyền liên kết với trình tự axit nucleic bao gồm với ít nhất một bản sao trong bộ gen của cây kháng này và được đại diện bởi SEQ ID No. 3. Xem xét tính

chất lục bội của cây thuộc chi *Chrysanthemum*, SEQ ID No. 3 tốt hơn là có mặt trong bộ gen của cây kháng với ít nhất một bản sao, như 2, 3, 4, 5 hoặc 6 bản sao mỗi cây kháng.

Trong bối cảnh sáng chế, các thuật ngữ “vùng gen” hoặc “các vùng gen” chỉ trình tự hạt nhân riêng mã hóa một hoặc nhiều gen tạo ra tính kháng gỉ trắng như một gen.

Trình tự SEQ ID No. 3 về mặt di truyền được liên kết với các vùng gen hoặc gen tạo ra tính kháng gỉ trắng, hoặc được tạo ra khác biệt, SEQ ID No. 3 là gen đánh dấu phân tử chỉ dẫn cho sự có mặt của các vùng gen hoặc gen tạo ra tính kháng gỉ trắng. SEQ ID No. 3, và các trình tự khác trình bày ở đây, có thể thu được bằng cách gửi mẫu chứa gen ADN của cây kháng gỉ trắng của chi *Chrysanthemum*, như mẫu nộp lưu được xác định ở đây, để phân hủy giới hạn với các enzym giới hạn *Mse*I và *Eco*RI tùy ý kết hợp khuếch đại axit nucleic bằng cặp mồi được phát triển dựa trên các trình tự được tạo ra trong bản mô tả này.

Mặc dù phát hiện sự có mặt của SEQ ID No. 3 đủ để thiết lập xem liệu cây của chi *Chrysanthemum* có kháng với gỉ trắng hay không, tính kháng ngoài ra có thể được xác nhận bởi xét nghiệm bệnh như xét nghiệm bệnh được nêu dưới đây.

Xét nghiệm bệnh có thể được tiến hành trên các đoạn cắt hoặc cây nhỏ bên trong vật chứa nhựa kín dài 125cm x rộng 80cm x cao 35cm sử dụng nắp nhựa. Cây có chất cấy bị nhiễm gỉ trắng được đặt trong các vật chứa (36 cây có chất cấy với mỗi vật chứa phân bố đồng đều giữa 265 đoạn cắt). Thẻ phân lập có nguồn gốc từ *P. horiana* dạng bệnh NL1 có thể được sử dụng (dạng bệnh NL1 gốc được lấy từ Plantenziektenkundige Dienst, Wageningen, NL).

Bởi vì gỉ trắng cần độ ẩm tương đối cao và màng nước trên lá, cây nhỏ hoặc các đoạn cắt, mặt trong của vật chứa nhựa và nắp đậy tốt nhất là được làm mờ bằng nước khử khoáng kết hợp với miếng vải ướt ở đáy vật chứa nhựa. Sau khi chuẩn bị thiết lập thí nghiệm, hồ chứa được đặt trong buồng sinh trưởng ở 18°C được che bằng nhựa trắng để tạo ra môi trường tối, ẩm ướt trong bốn ngày. Mỗi ngày các vật chứa được thông gió để đảm bảo phân tán tốt các bào tử qua toàn bộ vật chứa. Sau khi loại bỏ nhựa trắng các vật chứa được chiếu sáng kết hợp với thủy ngân và đèn SON-T trong 18 giờ mỗi ngày (6000 Lux).

Thông thường, triệu chứng bệnh có thể được đánh giá sau 21 đến 28 ngày bị nhiễm bệnh. Cây được ghi lại theo thang điểm từ 1 (nhiễm) đến 9 (không bị nhiễm) trong đó điểm 1-3 chỉ cây dễ bị, 4-6 chỉ cây kháng trung bình và 7-9 chỉ cây kháng.

Tốt hơn là, cây theo sáng chế còn chứa trong bộ gen của chúng vùng gen hoặc gen khác, tạo ra tính kháng gỉ trắng, vùng gen, hoặc gen tạo ra tính kháng gỉ trắng khác, về mặt di truyền được liên kết với trình tự axit nucleic bao gồm với ít nhất một bản sao trong bộ gen của cây kháng và được đại diện bởi SEQ ID No. 2 hoặc SEQ ID No. 1. Xem xét tính chất lục bội của cây thuộc chi *Chrysanthemum*, SEQ ID No. 2 và SEQ ID No. 1 tốt hơn là có mặt, độc lập với nhau, trong bộ gen của cây kháng với ít nhất một bản sao, như 2, 3, 4, 5 hoặc 6 bản sao với mỗi cây kháng.

Theo phương án được ưu tiên đặc biệt, cây theo sáng chế còn chứa trong bộ gen của chúng các vùng gen, hoặc gen khác, tạo ra tính kháng gỉ trắng, các vùng gen, hoặc gen tạo ra tính kháng gỉ trắng khác, về mặt di truyền được liên kết với trình tự axit nucleic bao gồm với ít nhất một bản sao trong bộ gen của cây kháng này và được đại diện bởi SEQ ID No. 1 và SEQ ID No. 2, lần lượt. Xem xét tính chất lục bội của cây thuộc chi *Chrysanthemum*, SEQ ID No. 2 và SEQ ID No. 1 tốt hơn là có mặt, độc lập với nhau, trong bộ gen của cây kháng với ít nhất một bản sao, như 2, 3, 4, 5 hoặc 6 bản sao với mỗi cây kháng.

Các tác giả sáng chế đã xác định các trình tự gen khác mặc dù tương tự (nhưng không giống) với SEQ ID No. 3, và có mặt trong vùng gen, locut hoặc gen có tính kháng gỉ trắng không chịu trách nhiệm cho việc trao đổi tính kháng với gỉ trắng. Vì như thế trình tự gen tương tự (nhưng không giống) với SEQ ID No. 3 được gọi là các alen miễn cảm hoặc trình tự gen miễn cảm. Do đó, theo phương án ưu tiên, cây theo sáng chế chứa năm bản sao hoặc ít hơn với mỗi cây của các trình tự axit nucleic tương tự (nhưng không giống) này bao gồm trong bộ gen của cây kháng được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 5, SEQ ID No. 6, SEQ ID No. 7, SEQ ID No. 8 và SEQ ID No. 9. Xem xét tính chất lục bội của cây thuộc chi *Chrysanthemum*, SEQ ID No. 4 đến 9 tốt hơn là có mặt, độc lập với nhau, trong bộ gen của cây kháng có 4 bản sao trở xuống như 3, 2, 1 hoặc 0 bản. Trong trường hợp sau, cây theo sáng chế chứa 6 bản sao của SEQ ID No. 3.

Cây theo sáng chế tốt hơn là cây *Chrysanthemum* đã cắt hoặc cây *Chrysanthemum* trồng trong chậu. Cây *Chrysanthemum* đã cắt và cây *Chrysanthemum*

trồng trong chậu cũng được gọi trong lĩnh vực kỹ thuật này là hoa đã cắt và cây trong chậu, lần lượt. Thỉnh thoảng, cũng tham chiếu đến *Chrysanthemum* trong vườn là phiên bản thử nghiệm ở vườn của cây *Chrysanthemum* trồng trong chậu.

Theo phương án được ưu tiên của sáng chế, cây theo sáng chế thuộc chi *Chrysanthemum* được chọn từ nhóm bao gồm *Chrysanthemum x morifolium*; *Chrysanthemum x grandiflorum*; *Chrysanthemum x rubellum*; *Chrysanthemum abolinii*; *Chrysanthemum achillaea* L.; *Chrysanthemum alabasicum*; *Chrysanthemum brachyanthum*; *Chrysanthemum carinatum*; *Chrysanthemum chalchingolicum*; *Chrysanthemum cinerariifolium*; *Chrysanthemum coccineum*; *Chrysanthemum coreanum*; *Chrysanthemum coronarium*; *Chrysanthemum decaisneanum*; *Chrysanthemum delavayanum*; *Chrysanthemum dichrum*; *Chrysanthemum fastigiatum*; *Chrysanthemum frutescens*; *Chrysanthemum gracile*; *Chrysanthemum grubovii*; *Chrysanthemum horaimontanum*; *Chrysanthemum hypoleucum*; *Chrysanthemum indicum* L.; *Chrysanthemum junnanicum*; *Chrysanthemum kinokuniense*; *Chrysanthemum kokanicum*; *Chrysanthemum konoanum*; *Chrysanthemum majus*; *Chrysanthemum marginatum*; *Chrysanthemum mawei*; *Chrysanthemum maximum* L.; *Chrysanthemum miyatojimense*; *Chrysanthemum morifolium*; *Chrysanthemum multifidum*; *Chrysanthemum nitidum*; *Chrysanthemum parvifolium*; *Chrysanthemum przewalskii*; *Chrysanthemum purpureiflorum*; *Chrysanthemum ramosum*; *Chrysanthemum rhombifolium*; *Chrysanthemum roborowskii*; *Chrysanthemum segetum*; *Chrysanthemum shihchuanum*; *Chrysanthemum shimotomaii*; *Chrysanthemum trilobatum*; *Chrysanthemum tripinnatisectum*; *Chrysanthemum vestitum*; *Chrysanthemum vulgare* (L.); *Chrysanthemum yoshinyanthemum*; và *Chrysanthemum zawadskii*.

Theo phương án được ưu tiên khác của sáng chế, mầm gây bệnh gây bệnh gỉ trắng theo sáng chế là *Puccinia horiana*. *Puccinia horiana* là gỉ tự động. Các bào tử mùa đông hai tế bào nảy mầm tại chỗ để tạo ra bào tử đảm đơn bào được phân tán trong dòng không khí. Các bào tử khác không được biết đến. Độ ẩm cao, và màng ẩm, dường như là cần thiết cho sự nảy mầm của cả bào tử mùa đông và bào tử đảm. Bào tử mùa đông có khả năng nảy mầm ngay khi chúng trưởng thành; việc nảy mầm và phát bào tử đảm xuất hiện trong khoảng từ 4°C đến 23°C và, ở nhiệt độ tối ưu là 17°C, việc phát bào tử đảm được quan sát trong 3 giờ. Bào tử đảm có thể nảy mầm trong phạm vi nhiệt độ rộng

và, ở 17-24°C, một trong hai bề mặt của lá có thể bị xuyên thủng trong vòng 2 giờ. Như vậy, chỉ 5 giờ ẩm là đủ cho nhiễm trùng mới thiết lập. Trong lá, sợi nấm thừa, trong suốt, liên bào được tạo ra với giác mút nội bào. Thời gian ủ bệnh thường là 7-10 ngày, nhưng thời gian ngắn ở nhiệt độ cao (trên 30°C) có thể kéo dài thời gian đến 8 tuần.

Sau khi bị nhiễm trùng, đốm màu xanh nhạt đến màu vàng, đường kính lên đến 5 mm, phát triển trên bề mặt trên của lá. Trung tâm của các điểm này trở nên nâu và hoại tử với lão hóa. Trên bề mặt thấp hơn tương ứng, nốt mủ (telia) nhô lên, màu vàng sẫm hoặc hơi hồng, sắp được phát hiện ra. Vì các đốm trên bề mặt trên trở nên lõm, các nốt mủ này trở nên quá lồi và chuyển sang màu trắng khi bào tử đảm được tạo ra. Telia đôi khi được phát hiện ra ở mặt trên lá. Lá bị tấn công dữ dội héo, rũ xuống thân cây và dần khô hoàn toàn.

Theo phương án được ưu tiên khác nữa, sáng chế đề cập đến cây chứa ít nhất một vùng gen hoặc gen, tạo ra tính kháng gỉ trắng có nguồn gốc từ cây *Chrysanthemum* được nộp lưu dưới số NCIMB 42762 vào ngày 31 tháng 5 năm 2017. Cây *Chrysanthemum* được nộp lưu dưới số NCIMB 42762 có thể thu được thông qua Bộ sưu tập quốc gia về vi khuẩn công nghiệp, thực phẩm và biển (NCIMB), NCIMB Ltd., Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen AB21 9YA, Anh.

Theo phương án được ưu tiên khác nữa, cây theo sáng chế còn chứa ít nhất một vùng gen, hoặc gen hoặc alen, tạo ra tính kháng gỉ trắng có nguồn gốc từ cây *Chrysanthemum* được nộp lưu dưới số NCIMB 42455 vào ngày 14 tháng 3 năm 2016 hoặc cây theo sáng chế còn chứa ít nhất hai vùng gen, hoặc gen hoặc alen, tạo ra tính kháng gỉ trắng có nguồn gốc từ cây *Chrysanthemum* được nộp lưu dưới số NCIMB 42455. Được tạo ra khác biệt, cây theo sáng chế tốt hơn là chồng lên gen có tính kháng với gỉ trắng, tức là chứa một vùng gen, hoặc gen hoặc alen, về mặt di truyền được liên kết với SEQ ID No. 3 có nguồn gốc từ mẫu nộp lưu NCIMB 42762 và một hoặc hai vùng gen, hoặc gen, có nguồn gốc từ NCIMB 42455 về mặt di truyền được liên kết với SEQ No. 1 hoặc 2, lần lượt.

Theo phương án được ưu tiên nhất, sáng chế đề cập đến cây *Chrysanthemum x morifolium* kháng với thể gây bệnh gỉ trắng *Puccinia horiana*.

Xem xét tầm quan trọng của nguồn di truyền kháng gỉ trắng trong lĩnh vực kỹ thuật này, như cây theo sáng chế, sáng chế, theo khía cạnh thứ hai, đề cập đến hạt, phần cây hoặc tế bào cây của cây theo sáng chế. Hạt, phần cây hoặc tế bào cây theo sáng chế

chứa trong bộ gen của chúng SEQ ID No. 3, và tốt hơn là thêm SEQ ID No. 2 hoặc SEQ ID No. 1, tốt nhất là SEQ ID No. 2 và SEQ ID No. 1 và, do đó, có khả năng cung cấp, hoặc được trồng vào, cây kháng với gỉ trắng và cụ thể là gỉ trắng gây ra bởi việc nhiễm *Puccinia horiana*.

Theo khía cạnh thứ ba, sáng chế cũng đề cập đến thể hệ con của cây Chrysanthemum theo sáng chế. Thể hệ con của cây theo sáng chế có thể dễ dàng xác định bằng cách thiết lập sự có mặt của SEQ ID No. 3, và tốt hơn là thêm SEQ ID No. 2 hoặc SEQ ID No. 1, tốt nhất là SEQ ID No. 2 và SEQ ID No. 1 trong bộ gen của chúng.

Theo khía cạnh thứ tư, sáng chế đề cập đến việc sử dụng SEQ ID No. 3 để nhận dạng cây Chrysanthemum kháng gỉ trắng. Phương pháp thích hợp, dựa trên các SEQ ID No. để nhận dạng cây này nói chung đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này như các phương pháp dựa trên sự khuếch đại axit nucleic của ADN bộ gen và hình dung tiếp theo của các mảnh khuếch đại mặc dù các kỹ thuật khác có thể được dự kiến như kỹ thuật dựa trên sự lai.

Sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn trong phần ví dụ được trình bày dưới đây. Trong các ví dụ này, có tham chiếu đến hình vẽ.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1

Lời mở đầu

Martin, P., & Firman, I. (1970). Resistance of Chrysanthemum Cultivars to White Rust (*Puccinia horiana*). *Plant Pathology*, 180–184 bộc lộ một số loại của cây kháng gỉ trắng Chrysanthemum. Để đánh giá xem liệu trình tự bộ gen liên kết gỉ trắng, tức là SEQ ID No 1 và 2, có được phát hiện ra trong cây Chrysanthemum được bộc lộ hay không, các cây này được phân tích đánh dấu và kết quả được trình bày trong bảng 1 dưới đây:

Bảng 1: Kiểu hình sau khi cấy thể phân lập NL1 của *P. horiana* của nhiều loại *Chrysanthemum* báo cáo trước đây bởi Martin (1970) kháng hoặc miễn dịch với *P. horiana*.

Loại	Kiểu hình theo Martin (1970)	Kiểu hình	SEQ ID No. 1 ²	SEQ ID No. 2
Alec Bedser	Miễn dịch	N.t. ¹	—	—
Fred Shoosmith	Miễn dịch	Mẫn cảm	—	—
Marlene	Miễn dịch	Mẫn cảm	—	—
Polaris	Miễn dịch	Mẫn cảm	—	—
Regalia	Miễn dịch	N.t.	+	—
Streamer	Miễn dịch	Mẫn cảm	N.t.	N.t.
Sweetheart	Miễn dịch	Mẫn cảm	—	—
Target	Miễn dịch	N.t.	—	—
Vibrant ⁴	Miễn dịch	N.t.	N.t.	N.t.
Bravo	Kháng trung bình	Mẫn cảm	N.t.	N.t.
Corsair	Thực tế miễn dịch	Mẫn cảm	—	—
Discovery	Thực tế miễn dịch	Mẫn cảm	—	—
Glamour	Thực tế miễn dịch	Kháng	+	—
Rivalry	Thực tế miễn dịch	Mẫn cảm	—	—

1: N.t. = không được thử nghiệm

2: —: SEQ ID không có mặt, + : gen có mặt

Có thể thấy rõ, không có cây nào được bộc lộ trong Martin *et al.* ở trên, chứa trình tự bộ gen đại diện bởi SEQ ID No. 2.

Ví dụ 2

Lời mở đầu

Gỉ trắng là bệnh ở cây gây thiệt hại kinh tế lớn cho nhà trồng cây và hoa toàn thế giới. Gỉ trắng cũng ảnh hưởng đến cây ở chi *Chrysanthemum*, và thông thường gây ra

bởi nấm *Puccinia horiana*. Sau khi bị nhiễm, các đốm màu xanh nhạt đến màu vàng có thể có đường kính lên tới 5 mm, phát triển ở mặt trên. Trung tâm của các đốm này trở nên nâu và hoại tử theo thời gian như tuổi cây. Trên bề mặt thấp hơn của lá, nốt mụn (telia) nhô lên, màu vàng sẫm hoặc hơi hồng phát triển. Bệnh thông thường tiếp tục ở các đoạn cắt và cây bị nhiễm, bao gồm hoa đã cắt, của *Chrysanthemum* nhà kính.

Hai vùng gen, hoặc gen, về mặt di truyền được liên kết với gen đánh dấu phân tử SEQ ID No 1 và 2 ảnh hưởng đến tính kháng được xác định trước đó, và alen tạo ra tính kháng tại mỗi locut này tồn tại trong nhiều loại ví dụ của nó đã được nộp lưu dưới số NCIMB 42455 có thể thu được thông qua Bộ sưu tập quốc gia về vi khuẩn công nghiệp, thực phẩm và biển (NCIMB), Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen AB21 9YA, Anh. Trong khi cả hai locut giải thích lượng lớn biến thể trong thể lai được tạo có nhiều loại kháng, chúng không giải thích được mẫu của tính kháng ở một số giống khác. Ví dụ, một số giống hoàn toàn kháng với gỉ trắng mặc dù thiếu alen tạo ra tính kháng tại locut được xác định trong NCIMB 42455. Điều này cho thấy rằng có, nhưng chưa được biết, gen mà ảnh hưởng đến tính kháng ở *Chrysanthemum*. Ví dụ trình bày ở đây xác định một vùng gen, hoặc gen hoặc alen này. Cây chứa vùng gen hoặc gen theo sáng chế và SEQ ID No. 3 về mặt di truyền được liên kết từ đó đã được nộp lưu dưới số NCIMB 42762 và có thể thu được thông qua Bộ sưu tập quốc gia về vi khuẩn công nghiệp, thực phẩm và biển (NCIMB), Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen AB21 9YA, Anh.

Phương pháp

Sơ đồ lai và thiết lập thử nghiệm

Để kiểm tra các liên kết giữa gen đánh dấu SNP và profin tính kháng, quần thể F1 được tạo ra bằng cách lai cá thể từ lựa chọn santini chrysanthemum kháng 08041 với cá thể từ lựa chọn spray chrysanthemum miễn cảm 02033. Lựa chọn 08041 kháng cao với gỉ trắng. 262 cá thể F1 (CR15-995004) sau đó được tạo kiểu hình cho tính kháng gỉ trắng và đối với mỗi cá thể F1, 6 dòng vô tính được thử nghiệm. Tiến hành cấy *Puccinia horiana* trong kiểu mẫu được phong bế và bốn thử nghiệm được thực hiện (tại các thời điểm khác nhau) trong hai vật chứa như mô tả ở trên. Tính kháng được ghi lại sao cho các giá trị lớn chỉ tính kháng (lớn nhất là 9) và giá trị thấp chỉ tính miễn cảm (nhỏ nhất là 1). Dòng vô tính sinh sản được phân chia ngẫu nhiên giữa các thử nghiệm và vật chứa.

Trong đó, 80 dòng vô tính được chọn để tạo kiểu gen. Tiến hành chọn để tối đa hóa sự biến đổi kiểu hình có trong mẫu được tạo kiểu gen, điều này sẽ tăng sức mạnh để phát hiện liên kết SNP-kiểu hình.

Lựa chọn 08041 locut có tính kháng

Sử dụng mảng Affymetrix SNP với 50000 gen đánh dấu cho *Chrysanthemum*, quần thể F1 được đề cập ở trên được tạo kiểu gen và liên kết đánh dấu đặc điểm được thực hiện trong từng cá thể của quần thể F1. Điều này mang lại 9 đa hình đơn nucleotit (SNP) giải thích lượng phương sai kiểu hình lớn nhất cho tính kháng gỉ trắng ở *Chrysanthemum*: 7 SNP mỗi loại > 50% và 2 SNP mỗi loại trên 70%. Hai SNPs sau, được gọi là SNP115 và SNP123 sau đó được hướng đích cho cách tiếp cận sắp xếp theo kiểu gen (GBS) đa hợp vì chúng thể hiện liên kết mạnh nhất với tính kháng gỉ trắng. Vì *Chrysanthemum* là lục bội, phương pháp được thiết kế để ước tính số bản sao kháng có mặt tại locut trong cá thể. Các cá thể của quần thể F1 trong các loại 08041 và 02033 sau đó được tạo kiểu gen bằng phương pháp này.

Thử nghiệm KASP được thiết kế cho gen đánh dấu SNP115 và SNP 123. Phương pháp KASP là phương pháp hiệu quả về chi phí nhiều hơn GBS. Khuyết điểm tiềm tàng là nó đưa ra biện pháp phá hủy số bản sao kháng nhiều hơn (tỷ lệ KASP chỉ có thể là 0, 1 hoặc 2) tỷ lệ liều lượng ước tính từ dữ liệu GBS. Tính chất lục bội của *Chrysanthemum* làm cho một số alen có tính kháng tại locut đã nêu có thể thay đổi trong khoảng từ 0 đến 6. Kiến thức chính xác về số neo riêng biệt của alen có tính kháng có thể có lợi không chỉ cho mục đích lập bản đồ, mà còn để chọn cá thể trong các giai đoạn trồng trọt tiếp theo. May mắn là, tỷ lệ KASP thể hiện tương quan chặt chẽ với tỷ lệ liều dùng của GBS (Fig. 1) có nghĩa là chúng đưa ra dấu hiệu tốt về số neo ở cây riêng biệt của kiểu đơn kháng. Cả bố mẹ và tất cả con cái F1 đều được tạo kiểu gen bằng phương pháp KASP.

Các đoạn môi KASP được sử dụng cho SNP 115 (thử nghiệm 4) và SNP 123 (thử nghiệm 18) để tạo kiểu gen là:

GxM_WRR_assay4_A (SEQ ID No. 10):

GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCAAGTCTTGTACAAYCAAGGAG

GxM_WRR_assay4_B (SEQ ID No. 11):

GAAGGTCGGAGTCAACGGATTCAAGTCTTGTACAAYCAAGGAC

GxM_WRR_assay4_R (SEQ ID No. 12):

TACACTTAACGAGGATAAATCAC

GxM_WRR_assay18_A (SEQ ID No. 13):

GAAGGTGACCAAGTTCATGCTTACAACCAAGGASCAAAACAT

GxM_WRR_assay18_B (SEQ ID No. 14):

GAAGGTCGGAGTCAACGGATTACCAACCAAGGASCAAAACAG

GxM_WRR_assay18_R (SEQ ID No. 15):

GTCGATTTTCCATACACTTAACG

Kết quả

Cả trong và ngoài dòng vô tính F1 có nguồn gốc từ con cái của sự lai giữa lựa chọn kháng 08041 với lựa chọn miễn cảm 02033 có sự không đồng nhất về tính kháng. Dựa trên sáu lần lặp lại, một số dòng vô tính có giá trị tính kháng trung bình là 9 (hoàn toàn kháng) trong khi các dòng vô tính khác có giá trị tính kháng trung bình là 1 (hoàn toàn miễn cảm). Một số dòng vô tính thể hiện tính không đồng nhất ít (độ lệch chuẩn là 0 giữa các lần lặp) trong khi một số dòng vô tính thể hiện mức độ không đồng nhất lớn hơn (độ lệch chuẩn là 3,7).

Hai SNP được liên kết mạnh mẽ nhất với tính kháng gỉ trắng ở *Chrysanthemum* là 72689_15854_115 (sau đây được gọi là SNP 115) và 72689_15854_123 (sau đây gọi là SNP 123) trên contig 72689, lập bản đồ trên nhiễm sắc thể cà chua 1 (96,77Mb).

Trình tự ADN của kiểu đơn mà được thể hiện để trao tính kháng với gỉ trắng được thể hiện dưới đây. Để thuận tiện cho việc giải thích, SNP115 (G) và SNP 123 (T) được in đậm:

SEQ ID No. 3:

AGCAAAACATGCAGTGATTTATCCTCGTTAAGTGTATGGAAAATCGACAC
CAGGGTGC

Cũng xác định được sáu kiểu đơn có liên quan đến tính miễn cảm trong bộ dữ liệu. SNP 115 và SNP 123 được in đậm và vị trí nơi nucleotit khác được phát hiện ra từ kiểu đơn kháng được gạch dưới.

ACCAAAACAGGCAGTGATTTATCCTCGTTAAGTGTATGGAAGATCGACAC
CAGAGTGC (SEQ 4)

AGCAAAACAGGCAGTGATTTATCCTCGTTAAGTGTATGGAAGATCGACAC
CAGAGTGC (SEQ 5)

ACCAAAACAGGCAGTGATTTATCCTCGTTAAGTGTACGGAAGATCGACAG
CAGGGTGC (SEQ 6)

ACCAAAACAGGCAGTGATTTATCCTCGTTAAGTGTACGGAAGATAGACAG
CAGGGTGC (SEQ 7)

AGCAAAACAGGCAGTGATTTATCCTCGTTAAGTGTATGGAAGATCGACAC
CAGGGTGG (SEQ 8)

ACCAAAACAGGCAGTGATTTATCCTCGTTAAGTGTATGGAAGATCGACAC
CAGGGTGG (SEQ 9)

Có sự liên kết rõ ràng và rất đáng kể (P trong mọi trường hợp $<1 \times 10^{-16}$) giữa dạng liều GBS (Fig. 2) và kiểu gen KASP ở cả hai locut và điểm tính kháng của dòng vô tính (Fig. 3). Trong trường hợp của SNP 123, nơi liên kết giữa kiểu gen và tính kháng thể hiện mẫu có khả năng đề xuất tính trội ở locut này. Cá thể có điểm kiểu gen là 1 kháng bằng cá thể có kiểu gen KASP điểm 2, trong khi cá thể có lớp kiểu gen 0 thông thường rất mẫn cảm (ngoại trừ một ngoại lệ, Fig. 2). Tuy nhiên, cá thể mà được phân loại dưới dạng có kiểu gen KASP bằng 0 cũng có thể chứa bản sao của kiểu đơn kháng, vì vậy, cần nhiều nghiên cứu hơn để làm rõ xem liệu tính kháng tỷ lệ cộng với số bản sao có tính kháng hoặc kiểu đơn kháng chiếm ưu thế hơn kiểu đơn mẫn cảm. Đối với cả hai gen đánh dấu SNP, có một số kiểu gen mà kháng hơn dự đoán dựa trên kiểu gen của chúng, trong khi một số kiểu gen kháng ít hơn (Fig. 2). Các trường hợp này có thể được giải thích bằng việc hoán đổi mẫu trong phòng thí nghiệm hoặc trong thí nghiệm hoặc bằng LD không hoàn toàn giữa alen có tính kháng và gen thực tế (không xác định) tạo ra tính kháng vì nó có khả năng xác định kiểu đơn “kháng” gần với gen (như được xác nhận bởi liên kết rất đáng kể giữa một số bản sao của neo riêng biệt của alen có tính kháng và profin tính kháng) nhưng không được liên kết hoàn hảo. Kết quả là một số bản sao của kiểu đơn kháng không gắn thể hoàn hảo bản sao kháng của gen do các sự kiện tái tổ hợp gần đây và/hoặc lịch sử. Các giải thích bổ sung khác là các biến thể trong các

gen khác có hiệu quả nhỏ có mặt trong loại 08041 hoặc 02033, hoặc sự xâm nhập của các biến thể di truyền không hoàn hảo.

Quan sát thú vị là một số cá thể có kiểu gen KASP là 2 cho SNP 123, trong khi đó cha mẹ kháng hơn (lựa chọn 08041) chỉ có kiểu gen KASP là 1 (Fig. 3). Điều này đáng ngạc nhiên vì điều này cho thấy một số con cái F1 có nhiều bản sao của kiểu đơn kháng ở vùng này hơn lựa chọn 08041, trái với dự đoán. Do đó, các tác giả sáng chế đã điều tra sự phân biệt của tỷ lệ dạng liều GBS trong F1 chi tiết hơn.

Các tác giả sáng chế đã phát hiện ra sự phân bố của tỷ lệ dạng liều ở SNP 123 cao bất thường (Fig. 4). Và vì tỷ lệ dạng liều của cha mẹ không được biết các tác giả sáng chế đã sử dụng mô phỏng để kiểm tra xem họ có thể sao chép các phân bố này không. Các tác giả sáng chế mô phỏng sự lai giữa cha mẹ mỗi người có một trong 7 kiểu gen ở locut được quan tâm (AAAAAA, BAAAAA, BBAAAA, v.v). Sau đó đối với mỗi 49 lai theo cặp, các tác giả sáng chế đã tạo ra các giao tử với sự thừa kế ngẫu nhiên giả định dẫn đến sự di truyền kiểu gen lục bội ở đời con. Quá trình này được lặp lại ngẫu nhiên trong tổng số 50 lần.

Nếu các tác giả sáng chế xem xét các phân bố mô phỏng, họ quan sát được rằng đối với SNP 115, phân bố theo kinh nghiệm của tỷ lệ dạng liều gần giống với kịch bản nhất trong đó cha mẹ kháng nhất có năm bản sao của alen có tính kháng và cha mẹ mẫn cảm đã có bản sao của kiểu đơn kháng. Đối với SNP 123, phân bố quan sát được của tỷ lệ dạng liều không khớp với bất kỳ tổ hợp mô phỏng nào của cặp cha mẹ. Cho dù sự khác biệt này có lời giải thích sinh học hoặc kỹ thuật xứng đáng được nghiên cứu trong tương lai, bắt đầu với việc tạo kiểu gen dòng cha mẹ.

Kết luận

Kiến thức chính xác về gen và biến thể của nó mà ảnh hưởng tới tính kháng gỉ trắng (*Puccinia horiana*.) là mấu chốt cho việc trồng trọt nhiều loại Chrysanthemum kháng. Hai locut hiệu quả chính đã được xác định trước đó (SEQ ID No 1 và 2).

Đã có giả thuyết rằng phải có các gen khác có thể trao tính kháng với gỉ trắng ở Chrysanthemum. Các kết quả trình bày ở đây thể hiện một cách dứt khoát rằng biến thể ở hai gen đánh dấu SNP được liên kết có thể dự đoán mạnh mẽ tính kháng, gợi ý rằng

các SNP này và kiểu đơn chúng được phát hiện ra, liên kết chặt chẽ với gen nguyên nhân.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Cây kháng gỉ trắng thuộc chi *Chrysanthemum*, chứa trong bộ gen của nó ít nhất một vùng gen, gen hoặc alen tạo ra tính kháng gỉ trắng, ít nhất một vùng gen, gen hoặc alen này tạo ra tính kháng gỉ trắng về mặt di truyền được liên kết với axit nucleic có trình tự là SEQ ID No. 3, hạt của cây này được nộp lưu với NCIMB dưới số tiếp cận No. NCIMB 42762.
2. Cây theo điểm 1, trong đó cây này còn chứa trong bộ gen của nó vùng gen, gen hoặc alen khác tạo ra tính kháng gỉ trắng, vùng gen, gen hoặc alen tạo ra tính kháng gỉ trắng khác này về mặt di truyền được liên kết với axit nucleic có trình tự là SEQ ID No. 2.
3. Cây theo điểm 1, trong đó cây này còn chứa trong bộ gen của nó vùng gen, gen hoặc alen khác, tạo ra tính kháng gỉ trắng, vùng gen, gen hoặc alen tạo ra tính kháng gỉ trắng khác này về mặt di truyền được liên kết với axit nucleic có trình tự là SEQ ID No. 1.
4. Cây theo điểm 1, trong đó cây này còn chứa trong bộ gen của nó vùng gen, gen hoặc alen khác tạo ra tính kháng gỉ trắng, vùng gen, gen hoặc alen tạo ra tính kháng gỉ trắng khác này về mặt di truyền được liên kết với axit nucleic có trình tự là SEQ ID No. 2, và trong đó cây này còn chứa trong bộ gen của nó vùng gen, gen hoặc alen thứ hai khác, tạo ra tính kháng gỉ trắng, vùng gen, gen hoặc alen này tạo ra tính kháng gỉ trắng thứ hai khác về mặt di truyền được liên kết với axit nucleic có trình tự là SEQ ID No. 1.
5. Cây theo điểm 1, trong đó cây này chứa năm bản sao axit nucleic hoặc ít hơn có trình tự được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 5, SEQ ID No. 6, SEQ ID No. 7, SEQ ID No. 8 và SEQ ID No. 9.
6. Cây theo điểm 1, trong đó cây này là *Chrysanthemum* đã cắt hoặc cây này là *Chrysanthemum* trồng trong chậu.
7. Cây theo điểm 1, trong đó thể gây bệnh là nguyên nhân của gỉ trắng này là *Puccinia horiana*.
8. Cây theo điểm 1, trong đó cây này chứa trong bộ gen của nó ít nhất ba vùng gen, gen hoặc alen tạo ra tính kháng gỉ trắng, vùng gen, gen hoặc alen đầu tiên tạo ra tính kháng gỉ trắng về mặt di truyền được liên kết với axit nucleic của gen có trình tự là SEQ ID No. 3, vùng gen, gen hoặc alen thứ hai tạo ra tính kháng gỉ trắng về mặt di truyền được liên kết với axit nucleic của gen có trình tự là SEQ ID No. 2, và vùng gen, gen hoặc alen

thứ ba tạo ra tính kháng gỉ trắng về mặt di truyền được liên kết với axit nucleic của gen có trình tự là SEQ ID No. 1.

9. Cây theo điểm 1, trong đó cây này là cây *Chrysanthemum x morifolium*, và trong đó cây này kháng với thể gây bệnh gỉ trắng *Puccinia horiana*.

10. Hạt của cây *Chrysanthemum* theo điểm 1, trong đó hạt này chứa ít nhất một vùng gen, gen hoặc alen tạo ra tính kháng gỉ trắng về mặt di truyền được liên kết với axit nucleic có trình tự là SEQ ID No. 3.

11. Phần cây của cây *Chrysanthemum* theo điểm 1, trong đó phần cây này chứa ít nhất một vùng gen, gen hoặc alen tạo ra tính kháng gỉ trắng về mặt di truyền được liên kết với axit nucleic có trình tự là SEQ ID No. 3.

12. Tế bào cây của cây *Chrysanthemum* theo điểm 1, trong đó tế bào cây này chứa ít nhất một vùng gen, gen hoặc alen tạo ra tính kháng gỉ trắng về mặt di truyền được liên kết với axit nucleic có trình tự là SEQ ID No. 3.

13. Thể hệ con của cây *Chrysanthemum* theo điểm 1, trong đó thể hệ con này chứa ít nhất một vùng gen, gen hoặc alen tạo ra tính kháng gỉ trắng về mặt di truyền được liên kết với axit nucleic có trình tự là SEQ ID No. 3.

14. Thể hệ con của cây *Chrysanthemum* theo điểm 13, trong đó thể hệ con này chứa trong bộ gen của nó vùng gen, gen hoặc alen khác tạo ra tính kháng gỉ trắng, vùng gen, gen hoặc alen tạo ra tính kháng gỉ trắng khác này về mặt di truyền được liên kết với axit nucleic có trình tự là SEQ ID No. 2 hoặc SEQ ID No. 1.

15. Cây *Chrysanthemum* được sinh trưởng từ hạt được nộp lưu dưới số tiếp cận NCIMB 42762, trong đó cây *Chrysanthemum* kháng lại gỉ trắng và chứa trong bộ gen của nó SEQ ID No. 3.

16. Hạt của cây *Chrysanthemum* theo điểm 15, trong đó hạt này kháng lại gỉ trắng và chứa trong bộ gen của nó SEQ ID No. 3.

17. Phần cây của cây *Chrysanthemum* theo điểm 15, trong đó phần cây này kháng lại gỉ trắng và chứa trong bộ gen của nó SEQ ID No. 3.

18. Tế bào cây của cây *Chrysanthemum* theo điểm 15, trong đó tế bào cây này kháng lại gỉ trắng và chứa trong bộ gen của nó SEQ ID No. 3.

19. Phương pháp sản xuất cây *Chrysanthemum* thể hệ con kháng lại gỉ trắng, phương pháp này bao gồm lai cây *Chrysanthemum* thứ nhất kháng lại gỉ trắng, cây thứ nhất này

được sinh trưởng từ hạt được nộp lưu dưới số tiếp cận NCIMB 42762 với cây *Chrysanthemum* thứ hai để tạo ra con cái; và

chọn một hoặc nhiều cây *Chrysanthemum* thể hệ con kháng lại gỉ trắng và chứa trong bộ gen của nó SEQ ID No. 3.

20. Phương pháp theo điểm 19, trong đó thể hệ con này còn chứa trong bộ gen của nó vùng gen, gen hoặc alen khác tạo ra tính kháng gỉ trắng, vùng gen, gen hoặc alen tạo ra tính kháng gỉ trắng khác này về mặt di truyền được liên kết với axit nucleic có trình tự là SEQ ID No. 2 hoặc SEQ ID No. 1.

21. Phương pháp theo điểm 19, trong đó thể hệ con này chứa năm bản sao axit nucleic hoặc ít hơn có trình tự được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 5, SEQ ID No. 6, SEQ ID No. 7, SEQ ID No. 8 và SEQ ID No. 9.

22. Phương pháp theo điểm 19, trong đó thể gây bệnh là nguyên nhân của gỉ trắng này là *Puccinia horiana*.

23. Hạt của cây thể hệ con được sản xuất bằng phương pháp theo điểm 19, trong đó hạt này chứa ít nhất một vùng gen, gen hoặc alen tạo ra tính kháng gỉ trắng về mặt di truyền được liên kết với axit nucleic có trình tự là SEQ ID No. 3.

24. Phần cây của cây thể hệ con được sản xuất bằng phương pháp theo điểm 19, trong đó phần cây này chứa ít nhất một vùng gen, gen hoặc alen tạo ra tính kháng gỉ trắng về mặt di truyền được liên kết với axit nucleic có trình tự là SEQ ID No. 3.

25. Tế bào cây của cây thể hệ con được sản xuất bằng phương pháp theo điểm 19, trong đó tế bào cây này chứa ít nhất một vùng gen, gen hoặc alen tạo ra tính kháng gỉ trắng về mặt di truyền được liên kết với axit nucleic có trình tự là SEQ ID No. 3.

26. Phương pháp theo điểm 19, trong đó cây *Chrysanthemum* thứ hai này được chọn từ nhóm bao gồm *Chrysanthemum x morifolium*; *Chrysanthemum x grandiflorum*; *Chrysanthemum x rubellum*; *Chrysanthemum abolinii*; *Chrysanthemum achillaea* L.; *Chrysanthemum alabasicum*; *Chrysanthemum brachyanthum*; *Chrysanthemum carinatum*; *Chrysanthemum chalingolicum*; *Chrysanthemum cinerariifolium*; *Chrysanthemum coccineum*; *Chrysanthemum coreanum*; *Chrysanthemum coronarium*; *Chrysanthemum decaisneanum*; *Chrysanthemum delavayanum*; *Chrysanthemum dichrum*; *Chrysanthemum fastigiatum*; *Chrysanthemum frutescens*; *Chrysanthemum gracile*; *Chrysanthemum grubovii*; *Chrysanthemum horaimontanum*; *Chrysanthemum hypoleucum*; *Chrysanthemum indicum* L.; *Chrysanthemum junnanicum*;

Chrysanthemum kinokuniense; *Chrysanthemum kokanicum*; *Chrysanthemum konoanum*; *Chrysanthemum majus*; *Chrysanthemum marginatum*; *Chrysanthemum mawei*; *Chrysanthemum maximum* L.; *Chrysanthemum miyatojimense*; *Chrysanthemum morifolium*; *Chrysanthemum multifidum*; *Chrysanthemum nitidum*; *Chrysanthemum parvifolium*; *Chrysanthemum przewalskii*; *Chrysanthemum purpureiflorum*; *Chrysanthemum ramosum*; *Chrysanthemum rhombifolium*; *Chrysanthemum roborowskii*; *Chrysanthemum segetum*; *Chrysanthemum shihchuanum*; *Chrysanthemum shimotomaii*; *Chrysanthemum trilobatum*; *Chrysanthemum tripinnatisectum*; *Chrysanthemum vestitum*; *Chrysanthemum vulgare* (L.); *Chrysanthemum yoshinyanthemum*; và *Chrysanthemum zawadskii*.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> DÜMMEN GROUP B.V.

<120> CÂY CHRYSANTHEMUM KHÁNG GI TRẮNG VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT CÂY
CHRYSANTHEMUM THỂ HỆ CON KHÁNG GI TRẮNG

<130> 4/2VS58/17P

<150> PCT/EP2016/073672

<151> 2016-10-04

<160> 15

<170> BiSSAP 1.3.6

<210> 1

<211> 192

<212> ADN

<213> Chrysanthemum <chi>

<220>

<223> Trình tự quanh 29TgR2

<400> 1

ttaactcaaa aatatgacta caaatcaatt ttcaggactt tttttcgata cttccctctt 60

tggtaccggt accgtattag tggtaccgat ttttttggg ctcaattcat ggtacaggca 120

ccgtaccgtg tattgggagt cggtagcggt togatacggg accggtacgg ttccgattcg 180

ataccggaat tc 192

<210> 2

<211> 180

<212> ADN

<213> Chrysanthemum <chi>

<220>

<223> Trình tự quanh 24Hs1R1

<400> 2

gaattcctat acgaagggtt tgtagatgtg tctccgagcg agtttgatcc taactcacga 60

ctagtaattt atgtccataa aaccgataac ttgaacattc cctcttggtc ttgtagatgg 120

ggatgaattc actgagtctc cattcttctg gcatcttctc actggaaaaa atcttggtta 180

<210> 3

<211> 58

<212> ADN

<213> Chrysanthemum <chi>

<400> 3

agcaaaacat gcagtgattt atcctcggtta agtgtatgga aaatcgacac caggggtgc 58

<210> 4

<211> 58

<212> ADN

<213> Chrysanthemum <chi>

<400> 4

accaaaacag gcagtgattt atcctcggtta agtgtatgga agatcgacac cagagtgcc 58

<210> 5

<211> 58

<212> ADN

<213> Chrysanthemum <chi>

<400> 5

agcaaaacag gcagtgattt atcctcggtta agtgtatgga agatcgacac cagagtgcc 58

<210> 6

<211> 58

<212> ADN

<213> Chrysanthemum <chi>

<400> 6

accaaaacag gcagtgattt atcctcggtta agtgtacgga agatcgacag caggggtgc 58

<210> 7

<211> 58

<212> ADN

<213> Chrysanthemum <chi>

<400> 7
 accaaaacag gcagtgattt atcctcggtta agtgtacgga agatagacag caggggtgc 58

<210> 8
 <211> 58
 <212> ADN
 <213> Chrysanthemum <chi>
 <400> 8
 agcaaaacag gcagtgattt atcctcggtta agtgtatgga agatcgacac caggggtgg 58

<210> 9
 <211> 58
 <212> ADN
 <213> Chrysanthemum <chi>
 <400> 9
 accaaaacag gcagtgattt atcctcggtta agtgtatgga agatcgacac caggggtgg 58

<210> 10
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Chrysanthemum <chi>
 <400> 10
 gaaggtgacc aagttcatgc tcaagtcttg tacaaycaag gag 43

<210> 11
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Chrysanthemum <chi>
 <400> 11
 gaaggtcgga gtcaacggat tcaagtcttg tacaaycaag gac 43

<210> 12
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Chrysanthemum <chi>
 <400> 12
 tacacttaac gaggataaat cac 23

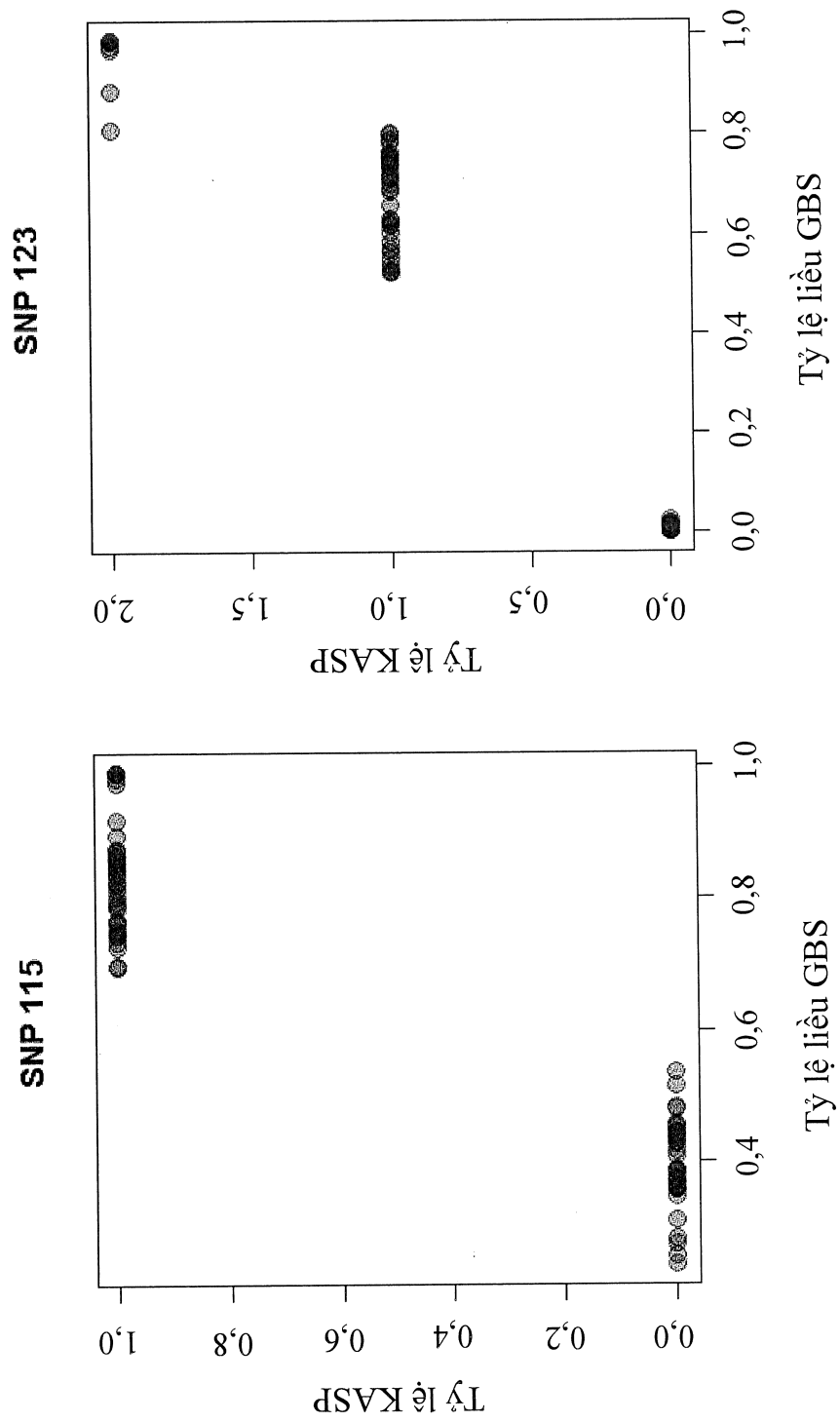
<210> 13
<211> 42
<212> ADN
<213> Chrysanthemum <chi>
<400> 13
gaaggtgacc aagttcatgc ttacaaccaa ggascaaaac at 42

<210> 14
<211> 42
<212> ADN
<213> Chrysanthemum <chi>
<400> 14
gaaggtcgga gtcaacggat ttacaaccaa ggascaaaac ag 42

<210> 15
<211> 23
<212> ADN
<213> Chrysanthemum <chi>
<400> 15
gtcgattttc catacactta acg 23

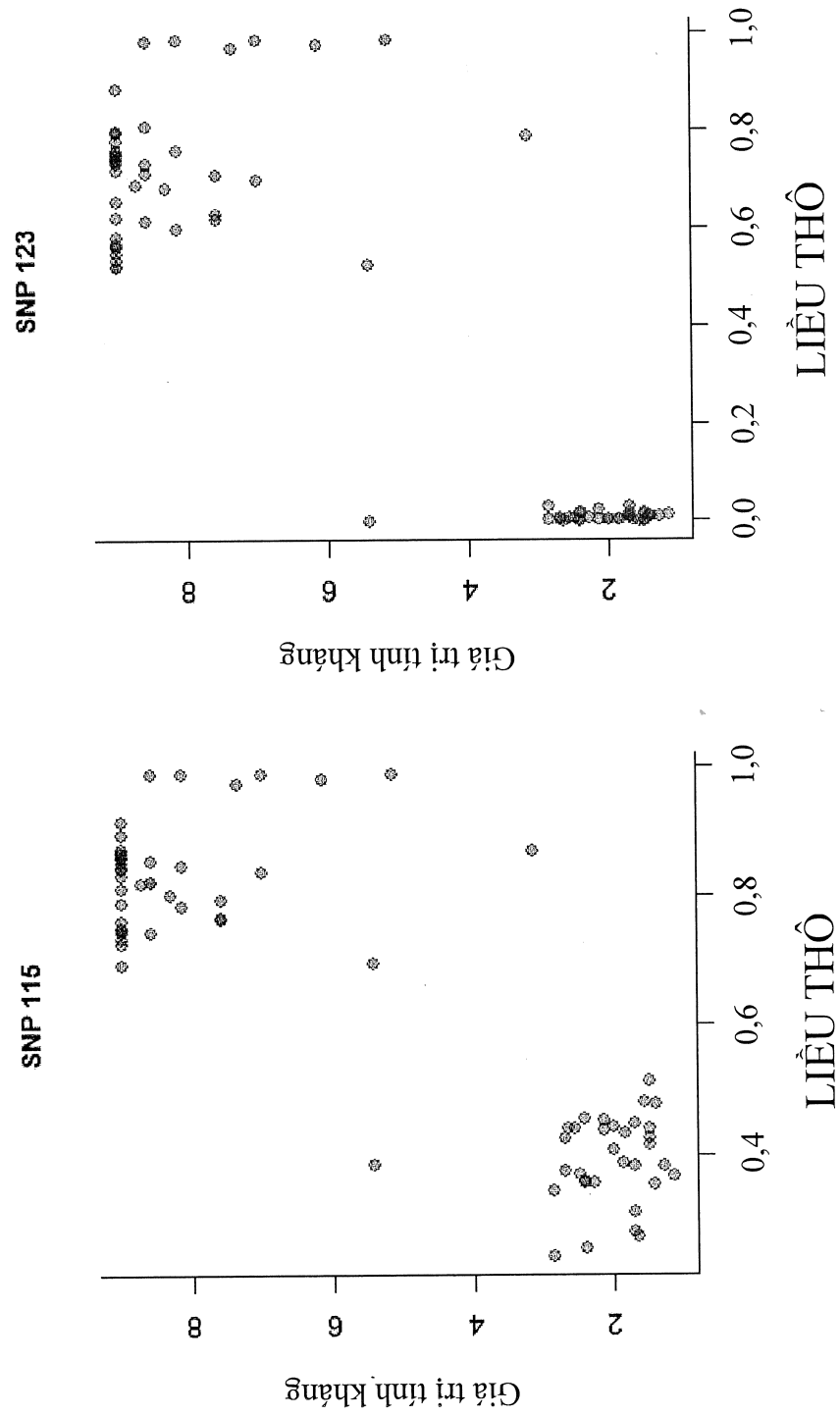
1/4

Fig.1



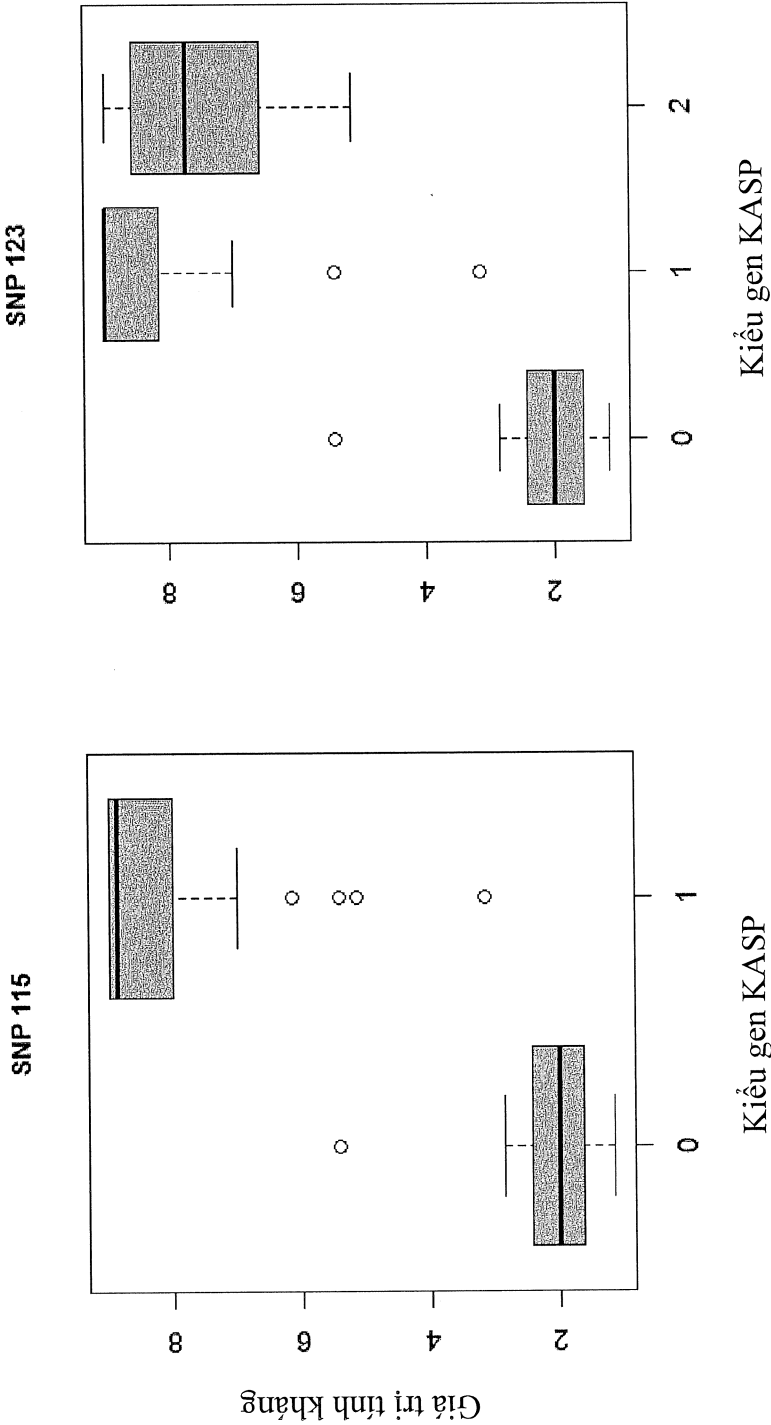
2/4

Fig.2



3/4

Fig.3



4/4

Fig.4

