



(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)



1-0023943

(51)⁷ A01H 1/00; C12Q 1/68; A01H 5/00

(13) B

(21) 1-2011-02056

(22) 05/02/2010

(86) PCT/EP2010/051426 05/02/2010

(87) WO2010/089374A1 12/08/2010

(30) 1036531 06/02/2009 NL

(45) 25/06/2020 387

(43) 26/03/2012 288A

(73) BEJO ZADEN B.V. (NL)

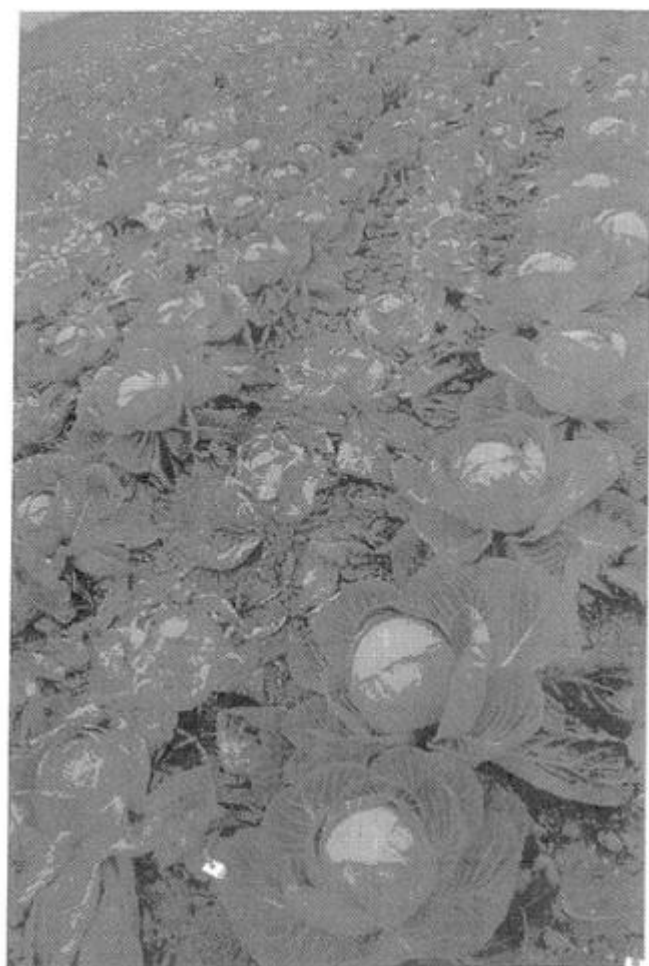
Trambaan 1, 1749 CZ Warmenhuizen, The Netherlands

(72) LIGTHART, Johannes, Theodorus, Wilhelmus (NL); VEENSTRA, Roelof, Marinus (NL); BIERSTEKER, Klaas (NL); DE GEUS, Jan (NL); HUIJS, Hendrikus, Stephanus, Maria (NL); SCHRIJVER, Albertus, Johannes, Maria (NL)

(74) Công ty TNHH một thành viên Sở hữu trí tuệ VCCI (VCCI-IP CO.,LTD)

(54) PHƯƠNG PHÁP TẠO RA THỰC VẬT THỂ NHẬN BRASSICA KHÁNG
XANTHOMONAS CAMPESTRIS PV. CAMPESTRIS

(57) Sáng chế đề cập đến thực vật Brassica kháng Xanthomonas campestris pv. campestris (Xcc), và hạt, quả và/hoặc các phần thực vật của nó, và đề cập đến các phương pháp tạo ra thực vật này. Cụ thể, sáng chế đề cập đến thực vật Brassica oleracea kháng Xcc, và hạt, quả và/hoặc các phần thực vật của nó, và phương pháp tạo ra nó. Hơn nữa, sáng chế đề cập đến các locus tính trạng số lượng (QTL) tạo ra tính kháng Xcc và các gen đánh dấu phân tử, cụ thể là các gen đánh dấu hiện tượng đa hình vệt tinh nhỏ được khuếch đại ngẫu nhiên (RAMP), để nhận dạng các QTL.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến thực vật họ cải bắp *Brassica* kháng *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc), và hạt, quả và/hoặc các phần thực vật của nó, và các phương pháp tạo ra nó. Cụ thể, sáng chế đề cập đến thực vật họ cải bắp *Brassica oleracea* kháng Xcc. Sáng chế cũng đề cập đến hạt, quả và/hoặc các phần thực vật khác từ các thực vật này. Hơn nữa, sáng chế đề cập đến các locus tính trạng số lượng (Quantitative Trait Loci-QTL) tạo ra tính kháng Xcc và gen đánh dấu phân tử, đặc biệt là gen đánh dấu dạng đa hình vệ tinh nhỏ được khuếch đại ngẫu nhiên (Random Amplified Microsatellite Polymorphism-RAMP), để xác nhận các QTL.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Vi sinh vật *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* là tác nhân tiên phát gây bệnh thối đen ở cây túi mực đồng Cruciferae. Trên thế giới, vi sinh vật là tác nhân gây bệnh chính của Cruciferae. Bệnh thối đen thường được phát hiện ở châu Âu, châu Mỹ, châu Phi, châu Á, châu Úc và châu Đại Dương. Thực vật chủ chính đối với bệnh vi khuẩn này là *Brassica oleracea*. Tuy nhiên, bệnh thối đen cũng được phát hiện thấy ở Cruciferae khác, hạt và cây cảnh.

Sự nhiễm *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* nói chung xảy ra thông qua thủy khổng của lá hoặc trong vài trường hợp qua khí khổng hoặc các sự tổn thương. Sau khi nhiễm khuẩn tiên phát, vi sinh vật lan truyền qua các bó mạch bằng cách đó gây ra gân đen và các tổn thương hình chữ V ở lá. Hậu quả là, một phần, hoặc các phần của lá bị héo vàng.

Xanthomonas campestris pv. *campestris* là bệnh truyền cho hạt có khả năng lây nhiễm cho thực vật từ hạt ở các giai đoạn phát triển sớm. Vi sinh vật có khả năng sống sót trên hạt trong thời gian lên đến ba năm. Sự nhiễm vi sinh vật

cũng có thể xảy ra thông qua sự lưu giữ phần thực vật, thực vật chủ thứ cấp và hệ thống tưới tiêu.

Sự phòng trừ bệnh thông qua các tác nhân hóa học là không có khả năng. Các phương pháp có giá trị trị bệnh là sự sử dụng các nguyên liệu khởi đầu không bị bệnh, tức là, không có vi sinh vật, và các phương pháp vệ sinh như sự loại bỏ các thực vật chủ bị nhiễm. Nguyên liệu khởi đầu không có bệnh có thể thu được bằng cách sử dụng hạt không có tác nhân gây bệnh hoặc bằng cách xử lý các hạt bị nhiễm bằng phương thức vật lý. Việc sử dụng, và giá trị của các loài thực vật có tính kháng, cũng duy trì sự không nhiễm Xcc trong suốt mùa sinh trưởng, là được ưu tiên để nuôi trồng các thực vật khỏe mạnh, tức là các thực vật không Xcc.

Brassica là giống thực vật thuộc họ Brassicaceae (trước đây được gọi là Cruciferae). Các thành viên thuộc giống này còn được biết là cây cải hoặc cây cải (mù tạc). Giống *Brassica* bao gồm một số cây trồng nông nghiệp và cây ăn quả quan trọng, bao gồm cây nho, cây súp lơ, cây cải bắp lá đỏ, cây cải xavoa, cây cải trắng, cây cải bắp có đầu hình nón (oxheart cabbage), cây cải bắp cuộn, cây cải hoa brocoli, cây cải bruxen, cây cải thảo, cây củ cải và cây cải Bò Đào Nha (*tranchuda*).

Các phần thực vật khác nhau của cây họ cải *Brassica* được sử dụng để tiêu thụ như gốc rễ cây (cây củ cải), thân cây (cây củ cải), lá (ví dụ, cây cải trắng và cây cải bắp lá đỏ), các chồi nách (chồi), hoa (cây súp lơ, cây cải hoa brocoli). Hơn nữa, quả nho và hạt nho cũng được sử dụng để tạo ra dầu thực vật. Vài loài có hoa màu trắng hoặc hoa màu đỏ tía, hoặc màu khác biệt hoặc hình dạng của lá, được nuôi trồng với mục đích làm cây cảnh.

Xét về tính quan trọng của thực vật họ cải *Brassica* để sản xuất thực phẩm và tổn thất về mặt kinh tế liên quan đến sự nhiễm *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, một trong số các mục đích của sáng chế là đề xuất thực vật họ cải *Brassica* có tính kháng Xcc và các phương pháp tạo ra thực vật này.

Nhu cầu về thực vật họ cải *Brassica* kháng Xcc vẫn cấp thiết bởi thiếu các phương tiện thích hợp, mang lại lợi nhuận và hữu ích để phòng trừ bệnh thối đen. Ví dụ, không có thuốc diệt sinh vật hữu hiệu đối với vi khuẩn.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích nêu trên của sáng chế, trong số các mục đích khác, được đáp ứng bởi phương pháp tạo ra thực vật họ cải *Brassica* kháng Xcc như được nêu ở điểm 1.

Cụ thể, các mục đích nêu trên của sáng chế, trong số các mục đích khác, được đáp ứng bởi phương pháp tạo ra thực vật thể nhận họ cải *Brassica* kháng *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* bao gồm các bước:

- chọn thực vật thể cho *Brassica oleracea* thứ nhất mà gồm locus tính trạng số lượng 1 (QTL1) trong hệ gen của nó;
- chọn thực vật thể cho *Brassica oleracea* thứ hai mà gồm locus tính trạng số lượng 2 (QTL2) trong hệ gen của nó; và
- sự nhập gen, hoặc kết hợp hệ gen, locus tính trạng số lượng 1 (QTL1) từ thực vật thể cho thứ nhất và locus tính trạng số lượng 2 (QTL2) từ thực vật thể cho thứ hai trong thực vật thể nhận *Brassica*;

trong đó,

locus tính trạng số lượng 1 (QTL1) được đặc trưng bởi một hoặc nhiều gen đánh dấu RAMP được chọn từ nhóm bao gồm đoạn có kích cỡ từ 158 đến 162bp với tổ hợp đoạn môi SEQ ID No: 1 và đoạn môi 6; đoạn có kích cỡ từ 283 đến 287bp với tổ hợp đoạn môi SEQ ID No: 2 và đoạn môi 6; đoạn có kích cỡ từ 370 đến 374bp với tổ hợp đoạn môi SEQ ID No: 3 và đoạn môi 6; và đoạn có kích cỡ từ 41 đến 45bp với tổ hợp đoạn môi SEQ ID No: 4 và đoạn môi 6;

locus tính trạng số lượng 2 (QTL2) được đặc trưng bởi một hoặc nhiều gen đánh dấu RAMP được chọn từ nhóm bao gồm đoạn có kích cỡ từ 88 đến 92bp với tổ hợp đoạn môi SEQ ID No: 5 và đoạn môi 6; đoạn có kích cỡ từ 125

đến 129bp với tổ hợp đoạn mồi SEQ ID No: 6 và đoạn mồi 6; đoạn có kích cỡ từ 334 đến 338bp với tổ hợp đoạn mồi SEQ ID No: 7 và đoạn mồi 6; và đoạn có kích cỡ từ 47 đến 51bp với tổ hợp đoạn mồi SEQ ID No: 8 và đoạn mồi 6; và trong đó thực vật thể nhận *Brassica*, liên quan đến hệ gen của nó, không giống với các thực vật thể cho *Brassica* thứ nhất và thứ hai.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện thử nghiệm trên cánh đồng trong đó có mặt thực vật họ cải *Brassica* có tính kháng Xcc và thực vật họ cải *Brassica* dễ mắc Xcc.

Fig.2 thể hiện hình ảnh như hình vẽ Fig.1 có màu.

Mô tả chi tiết sáng chế

Theo khía cạnh thứ nhất này của sáng chế, việc chọn lọc, hoặc xác nhận, thực vật thể cho thứ nhất và thứ hai được đề xuất bằng cách xác định sự có mặt của các locus tính trạng số lượng (QTL) liên quan đến tính kháng Xcc trong hệ gen của các thực vật thể cho tương ứng.

Tốt hơn là, sự xác định có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các kỹ thuật sinh học phân tử chuẩn đã biết thông thường trong lĩnh vực này. Ví dụ về các phương pháp này bao gồm phân lập ADN hệ gen của thực vật thể cho tiềm năng, sau đó xác định sự có mặt của các locus tính trạng số lượng (QTL) thích hợp trong hệ gen được phân lập nhờ, ví dụ, bằng phương pháp PCR, lấy dấu ADN hoặc phương pháp thẩm tách Southern.

Phương pháp được đặc biệt ưu tiên để xác nhận locus trong hệ gen của các thực vật thể cho tương ứng là kỹ thuật lấy dấu ADN được chỉ định trong lĩnh vực này dưới dạng hiện tượng đa hình vệt tinh nhỏ được khuếch đại ngẫu nhiên, hoặc RAMP. Theo kỹ thuật này, phản ứng PCR hoặc phản ứng khuếch đại axit nucleic, được thực hiện trên hệ gen đã phân lập của thực vật thể cho bằng cách sử dụng các đoạn mồi (các SEQ ID No: 1 đến 8) và các đoạn mồi RAPD (Operon RAPD 10-mer kits A-Ol - BH-20).

Tiếp theo phản ứng PCR, các sản phẩm khuếch đại thu được có thể được tách riêng bằng cách, ví dụ, điện di gel và kích cỡ của chúng tính theo cặp bazơ có thể được xác định, ví dụ, bằng cách sử dụng thang cặp bazơ phân tử. Các locus tính trạng số lượng 1 và 2 (QTL1 và QTL2) theo sáng chế ít nhất được đánh trung bởi sự có mặt của dải có kích cỡ cặp bazơ được chỉ định, so với nhiều dải khác với các kích cỡ khác không được chỉ định cho tính kháng.

Sau khi chọn lọc thực vật thể cho thích hợp, các locus (QTL1 và QTL2) được xác nhận trong các thực vật thể cho có thể được nhập nội, hoặc kết hợp hệ gen, trong hệ gen của thực vật thể nhận mong muốn. Điều này có thể, ví dụ, được đề xuất bằng cách sử dụng các phép lai chéo chuẩn, hoặc sự nhập gen, trong đó tính di truyền của các QTL được xác định ở thế hệ sau, tốt hơn là nhờ xác định sự có mặt của các gen đánh dấu như nêu trên. Phương pháp được đặc biệt ưu tiên là sự lai ngược được lặp lại, tốt hơn là kết hợp với sự phân tích gen đánh dấu.

Theo sáng chế, thực vật thể nhận *Brassica*, liên quan đến hệ gen của nó, không giống với các thực vật thể cho *Brassica* thứ nhất và thứ hai. Trong hoàn cảnh hiện tại, điều này có thể được xác định một cách dễ dàng nhờ sự hình thành kiểu hình khác nhau giữa thực vật thể cho và thực vật thể nhận chỉ định hệ gen của thực vật thể cho và thực vật thể nhận hoặc thông qua sự phân tích hệ gen chung.

Do vậy, thuật ngữ "...liên quan đến hệ gen của nó, không giống..." theo sáng chế là để chỉ một hoặc nhiều thực vật không có tính kháng Xcc, khác biệt về kiểu hình giữa các thực vật thể cho và các thực vật thể nhận. Nói cách khác, các thực vật thể nhận liên quan đến lĩnh vực này là thực vật khác nhau.

Theo một phương án ưu tiên của sáng chế, thực vật thể cho *Brassica* thứ nhất và thực vật thể cho *Brassica* thứ hai có hệ gen giống hệt nhau. Điều này có nghĩa là việc chọn thực vật thể cho thứ nhất và thứ hai gồm bước chọn một thực vật thể cho bao gồm cả QTL1 lẫn QTL2 trong hệ gen của nó. Nói cách khác, phương án ưu tiên này gồm bước xác nhận loại thể cho *Brassica* thích hợp có cả

QTL1 lẫn QTL2, sau đó nhập nội QTL1 và QTL2 trong thực vật thể nhận *Brassica* mong muốn nhờ đó tạo ra tính kháng Xcc cho thực vật thể nhận này.

Theo phương án ưu tiên khác của sáng chế, locus tính trạng số lượng 1 (QTL1) được đặc trưng bởi một hoặc nhiều gen đánh dấu RAMP được chọn từ nhóm bao gồm đoạn có kích cỡ 160bp với tổ hợp đoạn môi 1.1 (SEQ ID No: 1) và 6; đoạn có kích cỡ 285bp với tổ hợp đoạn môi 1.2 (SEQ ID No: 2) và 6; đoạn có kích cỡ 372bp với tổ hợp đoạn môi 1.3 (SEQ ID No: 3) và 6; và đoạn có kích cỡ 43bp với tổ hợp đoạn môi 1.4 (SEQ ID No: 4) và 6.

Theo phương án ưu tiên khác nữa của sáng chế, locus tính trạng số lượng 2 (QTL2) được đặc trưng bởi một hoặc nhiều gen đánh dấu RAMP được chọn từ nhóm bao gồm đoạn có kích cỡ 90bp với tổ hợp đoạn môi 2.1 (SEQ ID No: 5) và 6; đoạn có kích cỡ 127bp với tổ hợp đoạn môi 2.2 (SEQ ID No: 6) và 6; đoạn có kích cỡ 336bp với tổ hợp đoạn môi 2.3 (SEQ ID No: 7) và 6; và đoạn có kích cỡ 49bp với tổ hợp đoạn môi 2.4 (SEQ ID No: 8) và 6.

Theo phương án đặc biệt ưu tiên của sáng chế, quá trình chọn thực vật thể cho bao gồm bước xác định, hoặc xác nhận sự có mặt của 1 hoặc nhiều hơn, tốt hơn là 2 hoặc nhiều hơn, tốt hơn nữa là 3 hoặc nhiều hơn, và tốt nhất là 4 gen đánh dấu RAMP cho các QTL tương ứng trong hệ gen của các thực vật thể cho *Brassica* tương ứng, nhờ các phương pháp sinh học phân tử.

Theo phương án được ưu tiên nhất của sáng chế, sự chọn lọc, hoặc nhận dạng, còn bao gồm bước chọn các locus tính trạng số lượng có gen xác định tính trạng 1 và 2 (các QTL 1 và 2) trong thực vật thể cho *Brassica* thứ nhất và thứ hai.

Thực vật thể nhận *Brassica* theo sáng chế tốt hơn là thực vật *Brassica oleracea*, tốt hơn là được chọn từ nhóm bao gồm *Brassica oleracea* convar. *botrytis* var. *botrytis* (cây súp lơ, romanesco), *Brassica oleracea* convar. *botrytis* var. *cymosa* (cây cải hoa brocoli), *Brassica oleracea* convar. *botrytis* var. *asparagoides* (cây cải hoa brocoli đang nảy chồi), *Brassica oleracea* convar. *oleracea* var. *gemnifera* (cây cải bruxen), *Brassica oleracea* convar. *capitata* var.

alba (cây cải trắng, cây cải bắp có đầu hình nón (oxheart cabbage)), *Brassica oleracea* convar. *capitata* var. *rubra* (cây cải bắp lá đỏ), *Brassica oleracea* convar. *capitata* var. *sabauda* (cây cải xavoa), *Brassica oleracea* convar. *acephela* var. *sabellica* (cây cải bắp cuốn), *Brassica oleracea* convar. *acephela* var. *gongyloides* (cây củ cải) và *Brassica oleracea* var. *tranchuda* syn. *costata* (cây cải Bồ Đào Nha).

Xét về các ưu điểm của thực vật họ cải *Brassica* kháng Xcc nêu trên, theo một khía cạnh nữa, sáng chế đề cập đến thực vật thể nhận *Brassica* như nêu trên, và đề cập đến hạt, quả và/hoặc các phần thực vật khác của nó, bao gồm, trong hệ gen của nó, locus tính trạng số lượng 1 (QTL1) và locus tính trạng số lượng 2 (QTL2) như nêu trên.

Theo một phương án được đặc biệt ưu tiên khác theo khía cạnh này, sáng chế đề cập đến thực vật *Brassica* có số lưu giữ NCIMB 41553 cũng như đề cập đến hạt, quả và/hoặc các phần thực vật khác của nó.

Theo khía cạnh tiếp theo, sáng chế đề cập đến việc sử dụng locus tính trạng số lượng 1 (QTL1) và locus tính trạng số lượng 2 (QTL2), như nêu trên, để tạo ra thực vật thể nhận *Brassica* kháng *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến việc sử dụng một hoặc nhiều đoạn môi được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID No: 1 đến 8 (các đoạn môi 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 2.1, 2.2, 2.3, và 2.4) để tạo ra thực vật thể nhận *Brassica* kháng *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.

Sáng chế sẽ được giải thích chi tiết hơn nữa nhờ ví dụ sau đây của phương án ưu tiên. Ví dụ này chỉ mang tính chất minh họa và không giới hạn phạm vi của sáng chế như được nêu trong yêu cầu bảo hộ bởi bất cứ phương thức nào.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sự truyền tính kháng *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) vào trong *Brassica oleracea* là một quy trình phức tạp. Vài loại Xcc được nêu và tính kháng Xcc nói chung là không thấy có trong *Brassica oleracea*. Tính kháng

nêu trên của *Brassica oleracea* đối với Xcc có bản chất định lượng, tức là tính kháng, và mức đề kháng, tùy thuộc vào môi trường di truyền. Điều này cho thấy rằng vài gen không liên quan đến tính kháng này, dẫn đến có thể thấy được các mức độ của tính kháng Xcc.

Để thu được thực vật *Brassica oleracea* có tính kháng định lượng, tức là, tính kháng được quan sát thấy tùy thuộc vào môi trường di truyền, nguồn di truyền được sử dụng trong đó tính kháng này về cơ bản là tính trạng lặn. Thông qua chương trình lai ngược, tính kháng được đưa vào trong các môi trường di truyền khác nhau (các dòng cha mẹ dễ mắc). Mức độ kháng của thực vật được xác định nhờ thử nghiệm trên cánh đồng. Vì tính trạng này liên quan đến tính lặn, mỗi sự lai với thực vật dễ mắc được thực hiện bởi thế hệ lai cận huyết để thu tính trạng ở dạng có đồng hợp tử. Thế hệ con cháu của thế hệ này phải được kiểm tra về tính kháng của chúng trong thử nghiệm trên cánh đồng. Kết quả là, sẽ cần ít nhất hai năm cho thực vật một năm và ít nhất bốn năm cho thực vật hai năm để đánh giá hiệu quả của dòng lai mới.

Vì tính kháng có liên quan có thể được biểu hiện dưới dạng các mức kháng khác nhau, tính kháng được biểu hiện ở dạng giá trị số (ở thang từ 0 đến 9, trong đó 0 là khả năng mắc phải hoàn toàn và 9 là tính đề kháng hoàn toàn). Đã thấy rằng tính kháng trong các môi trường di truyền khác nhau đã thể hiện sự thay đổi kiểu hình trong mức phân bố bình thường, thay vì tính di truyền Mendel đơn giản. Sự phân bố này có thể thay đổi hướng đến tính nhạy cảm cho thấy rằng các thế hệ lai cận huyết, từ các sự lai giữa nguồn có tính kháng và các dòng cha mẹ dễ mắc, cho ra các thực vật có tính đề kháng khác nhau.

Dựa vào các tỷ lệ phân chia và sự chênh lệch về các mức đề kháng, người ta đã giải thích được rằng mức đề kháng của thực vật được xác định bằng vài yếu tố di truyền hoặc locus tính trạng số lượng. Để nhận biết các gen đánh dấu ADN chỉ định, hoặc điển hình, về tính trạng số lượng, các sự phân tích QTL thường được sử dụng. QTL là các vùng nhiễm sắc thể độc lập, được kết cặp với các gen nằm dưới, kết hợp giải thích, hoặc chỉ định, tính trạng di truyền. Bằng

cách sử dụng gen đánh dấu ADN, quá trình phân tích QTL nổi hệ gen được thực hiện trên quần thể *Brassica oleracea* với các môi trường di truyền khác nhau. Với các thực vật của các quần thể khác nhau này, các thử nghiệm trên cánh đồng được tiến hành để xác định mức độ đề kháng của từng thực vật. Dữ liệu phân tích gen đánh dấu và điểm số của thử nghiệm trên cánh đồng cho phép xác nhận QTL tạo ra tính kháng Xcc được quan sát.

Tóm lại, sáu QTL được di truyền độc lập được xác nhận phân bố theo mức nhất định đối với mức đề kháng được quan sát. Sự khác nhau của các mức đề kháng quan sát được ở cánh đồng giữa các thực vật là kết quả của sự có mặt và/hoặc không có mặt các QTL và các dạng tổ hợp khác nhau của chúng. Trong số sáu QTL được nhận biết, hai QTL, ở đây được gọi là QTL 1 và QTL 2, có mặt trong mỗi môi trường di truyền tạo ra tính kháng. Nói cách khác, hai QTL này chỉ thị tính kháng định lượng trong khi bốn QTL khác còn lại là để phân bổ tính kháng định lượng. Một trong số các QTL này, tức là QTL 1, có thể được coi là QTL chính, tức là, QTL góp phần tạo ra tính kháng mạnh nhất.

Mỗi dòng lai cận huyết kháng *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* thu được bằng quy trình nhân giống có QTL chính này. QTL thứ hai có, tương tự với QTL chính, góp phần tạo ra mức tính kháng định lượng. Tuy nhiên, sự đóng góp này là không lớn như QTL chính, mặc dù nó cũng là thành phần độc lập của môi trường di truyền.

Bốn QTL còn lại được tìm thấy trong các môi trường di truyền khác. Bốn QTL này có thể có quy luật cải biến mà dẫn đến sự thay đổi mức đề kháng.

Được lấy ví dụ trong bảng 1 dưới đây, trong đó các thực vật *Brassica oleracea* 1 đến 6 là các ví dụ để giải thích cho các kết luận này.

Bảng 1 Tổng quan về sự ảnh hưởng của vài QTL đối với tính kháng Xcc

	QTL1	QTL2	QTL3	QTL4	QTL5	QTL6	Mức đề kháng
Thực vật 1	+	+	+	+	+	+	Có tính kháng
Thực vật 2	+	+	±	±	±	±	Có tính kháng
Thực vật 3	-	-	-	-	-	-	Dễ mắc
Thực vật 4	-	+	+	+	+	+	Dễ mắc
Thực vật 5	+	-	+	+	+	+	Dễ mắc
Thực vật 6	-	-	+	+	+	+	Dễ mắc

Ghi chú ở bảng này

+ có mặt

± có thể có mặt, tùy thuộc vào môi trường di truyền chính xác,

- không có mặt

Việc sử dụng các gen đánh dấu ADN liên quan đến hai QTL chính, tức là, QTL1 và QTL2, tạo ra cơ hội chọn thực vật kháng Xcc.

Thử nghiệm bệnh riêng biệt sẽ không tạo ra thực vật có cả hai QTL ở dạng có đồng hợp tử. Thử nghiệm bệnh cũng có thể dẫn đến các thực vật có mức kháng cao có một hoặc nhiều QTL ở dạng có đồng hợp tử mà sẽ không tạo ra tính kháng ổn định.

Thực hiện thử nghiệm bệnh với hơn hàng nghìn cây chỉ có thể thực hiện được cho một số dòng lai hạn chế. Tuy nhiên, việc sử dụng các gen đánh dấu ADN tạo ra cơ hội phân tích nhiều quần thể bao gồm một nghìn cây để chọn trước các cây mong muốn.

Bên cạnh đó, sự lựa chọn sử dụng các gen đánh dấu ADN cũng tạo ra cơ hội thực hiện nhiều lần sự lai ngược trong đó hai QTL chính được giữ nguyên.

Nhờ phương pháp mà có thể đạt được kết quả là cứ một hoặc hai năm thì thu được thế hệ lai, điều này có ý nghĩa thúc đẩy chương trình nhân giống khoảng từ mười đến hai mươi năm. Phương pháp này tạo ra sự đa tính kháng Xcc được thúc đẩy vào trong các thế lai.

Yếu tố phức tạp bổ sung trong quá trình tạo ra các thế lai là sự có mặt cần thiết của tính kháng lặn trong cả hai dòng cha mẹ. Tốt hơn là, cả hai dòng cha mẹ, hoặc các thực vật thể cho, có đồng hợp tử cho hai QTL chính. Bằng cách sử dụng các gen đánh dấu ADN, sự nhận dạng các dòng cha mẹ có đồng hợp tử cho hai QTL chính và, do vậy, thích hợp để tạo ra thế lai có tính kháng mới, có thể được thực hiện trong thời gian tương đối ngắn.

Hạt của thế lai được lưu giữ ở NCIMB, Aberdeen, Scotland, AB21, 9YA, UK với số lưu giữ NCIMB 41553.

Hai QTL chính đều được đặc trưng bởi bốn gen đánh dấu ADN mà đặc trưng là sự có mặt của nó trong nguồn. QTL1 là QTL chính, và QTL2 là QTL phụ.

Các gen đánh dấu ADN được tạo ra bằng kỹ thuật RAMP. Kỹ thuật RAMP, trong đó iSSR và đoạn môi - RAPD được kết hợp, tạo ra các mẫu dải bao gồm một hoặc nhiều đoạn ADN trong đó đồng phân tách với tính kháng. Bằng cách tạo bản đồ cho các đoạn RAMP và các điểm kháng kiểu hình, các gen đánh dấu RAMP được liên kết chặt chẽ được nhận dạng để xác nhận QTL (bảng 2). Khoảng cách gen giữa các gen đánh dấu ADN trong QTL được biểu hiện bằng xentimorgan (centimorgan-cM).

Các điều kiện PCR chung được sử dụng để tạo ra các gen đánh dấu ADN là như sau:

Hỗn hợp PCR cho phản ứng RAMP:

Cho mỗi phản ứng

~ 0,2ng/μl ADN hệ gen thực vật

75mM Tris-HCL (độ pH=8,8)

20mM NH_4SO_4

0,01% (thể tích/thể tích) Tween20

2,8mM MgCl_2

0,25mM dNTP

0,15 μM đoạn môi xuôi chiều

0,20 μM đoạn môi đảo

0,04 đơn vị/l Red Hot[®] DNA Polymerase (ABgene, Epsom)

Chương trình PCR RAPD35:

		Chu trình
Bước 1:	2 phút 93°C	1
Bước 2:	30 giây 93°C	
Bước 3:	30 giây 93°C	
Bước 4:	Gia nhiệt với 0,3°C/giây đến 72°C	
Bước 5:	1 phút 30 giây 72°C	40
Các bước lặp 2-5		
Bước 6:	5 phút 72°C	1

PAGE/Licor:

Để phân tích các mẫu RAMP, sử dụng thiết bị "Gene ReadIR 4200 DNA analyzers" (Licor Inc.). Dựa vào nồng độ tối ưu 6,5% acrylamit, các đoạn có thể được tách có sự khác nhau về kích cỡ bazơ đơn. Để đánh giá các đoạn trong hệ thống này, cần sử dụng các đoạn môi được đánh dấu (các nhãn IRDye). Vì mục đích này, một phần ba số lượng đoạn môi xuôi chiều được thay bằng đoạn môi được đánh dấu bằng trình tự giống hệt.

Tổng quan về gen đánh dấu

Trong nghiên cứu dẫn đến sáng chế, các đoạn môi như được thể hiện ở bảng 3 được sử dụng để tạo ra các gen đánh dấu ADN như được thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2: Tổng quan về gen đánh dấu RAMP cho QTL

QTL	Tổ hợp đoạn mồi RAMP	Kích cỡ đoạn (bp)	Vị trí trong QTL (cM)
1	1.1 + 6	160	10.1
1	1.2 + 6	285	18.5
1	1.3 + 6	372	20.9
1	1.4 + 6	43	21.3
2	2.1 + 6	90	28.5
2	2.2 + 6	127	29.4
2	2.3 + 6	336	36.3
2	2.4 + 6	49	37.2

Bảng 3: Tổng quan về các SEQ ID No

SEQ ID No	Đoạn mồi	iSSR/RAPD	Trình tự
1	1.1	iSSR	TTA GCT CTC TCT CTC TC
2	1.2	iSSR	CCA GCA CAC ACA CAC A
3	1.3	iSSR	AGA TTC TCT CTC TCT C
4	1.4	iSSR	CAA CTC TCT CTC TCT
5	2.1	iSSR	TTG TAG AGA GAG AGA G
6	2.2	iSSR	TCT CTT CTT CTT CTT C
7	2.3	iSSR	CAA CTC TCT CTC TCT
8	2.4	iSSR	GAA ATC TCT CTC TCT C
	6	RAPD	Các kit Operon RAPD® 10-mer A-01 đến BH20 (Operon Biotechnologies, Inc., Huntsville, USA)

Các phản ứng PCR có các tổ hợp đoạn mồi khác nhau tạo ra các đoạn axit nucleic với kích cỡ cặp bazơ được chỉ định (xem bảng 2) đại diện cho sự có mặt của QTL tương ứng. Các gen đánh dấu ADN đặc trưng, hoặc chỉ thị, cho các QTL liên quan. Tổ hợp của các gen đánh dấu ADN, đặc trưng cho QTL, tạo ra chứng cứ không thể tranh luận về sự có mặt của sự nhập gen QTL từ nguồn kháng Xcc ở thực vật thể cho.

Các định nghĩa

cM - xentimorgan – đơn vị khoảng cách gen giữa các gen đánh dấu, dựa trên số lượng trao đổi chéo trên hàng trăm cá thể.

Gen đánh dấu ADN – đoạn ADN mà được liên kết với gen hoặc đoạn AND khác với vị trí đã biết trên hệ gen, nó được sử dụng để giám sát tính di truyền của gen này hoặc vị trí này.

Điện di gel – Phương pháp tách các phân tử (ADN, ARN, protein), dựa vào kích cỡ, hình dạng hoặc điện tích của chúng, ở nền (agaroza hoặc polyacrylamit) dưới tác dụng của điện trường.

Thế hệ lai cận huyết (tự thụ phấn) – Sự thụ tinh của từng cá thể với phần hoa của nó.

Sự nhập gen - Đoạn nhiễm sắc thể có kích cỡ của một dòng (cây trồng) được đưa vào, bằng cách lai, vào trong dòng khác (cây trồng) .

Nhãn IRDye – Các nhãn hồng ngoại được sử dụng cho hệ thống tạo hình ảnh Licor, quá trình dò thực hiện ở bước sóng 700nm hoặc 800nm.

Gen đơn – được xác định bằng một gen.

PCR (Polymerase Chain Reaction-Phản ứng chuỗi trùng hợp) – Phương pháp khuếch đại in vitro để khuếch đại nhiều đoạn AND đặc trưng. Phản ứng tổng hợp này gây ra sự sử dụng tối thiểu một đoạn mỗi oligonucleotit lai với đoạn ADN.

sau đó ADN polymeraza khuếch đại vùng sườn nhờ các chu trình nhiệt độ liên tục.

Đoạn mồi - Oligonucleotit (~20-50bp) hỗ trợ cho trình tự của phân tử ADN sợi đơn, đóng vai trò làm điểm khởi đầu của polymeraza.

QTL (Locus tính trạng số lượng) – (các) vùng nhiễm sắc thể độc lập, khi liên kết với gen, cùng giải thích tính trạng.

RAMP (Hiện tượng đa hình vệ tinh nhỏ được khuếch đại ngẫu nhiên) - kỹ thuật lấy dấu vân tay ADN dựa vào các đoạn môi RAPD và iSSR có các hiện tượng đa hình giữa các mẫu ADN khác nhau được phát hiện.

Đoạn môi RAPD (đoạn môi ADN đa hình được khuếch đại ngẫu nhiên) - A 10-mer có trình tự "ngẫu nhiên", trong đó hàm lượng GC nằm trong khoảng từ 60% đến 70% và trong đó các đầu đoạn môi không tự bổ trợ.

iSSR (đoạn lặp trình tự đơn giản trung gian) - Đoạn môi được tạo ra trên đầu 5' của SSR (Single Sequence Repeat- đoạn lặp trình tự đơn); đoạn ADN bao gồm các sự lặp lại của 2 hoặc 3 nucleotit.

BC (Backcrossing- lai ngược) – Quá trình lai cá thể với một trong số các dòng cha mẹ ban đầu.

XCC *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp tạo ra thực vật thể nhận *Brassica* kháng *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, phương pháp này bao gồm bước:

tạo ra thực vật thể cho *Brassica oleracea* gồm locus tính trạng số lượng 1 (QTL1) và locus tính trạng số lượng 2 (QTL2) trong hệ gen của nó; trong đó, thể cho *Brassica oleracea* là thực vật *Brassica* với số lưu giữ NCIMB 41553; và

đưa, hoặc kết hợp locus tính trạng số lượng 1 (QTL1) và locus tính trạng số lượng 2 (QTL2) vào hệ gen thực vật thể nhận *Brassica* từ thực vật thể cho;

trong đó locus tính trạng số lượng 1 (QTL1) gồm một hoặc nhiều gen đánh dấu RAMP được chọn từ nhóm bao gồm đoạn có kích cỡ từ 158 đến 162bp với tổ hợp đoạn mỗi SEQ ID No: 1 và đoạn mỗi 6; đoạn có kích cỡ từ 283 đến 287bp với tổ hợp đoạn mỗi SEQ ID No: 2 và đoạn mỗi 6; đoạn có kích cỡ từ 370 đến 374bp với tổ hợp đoạn mỗi SEQ ID No: 3 và đoạn mỗi 6; đoạn có kích cỡ từ 41 đến 45bp với tổ hợp đoạn mỗi SEQ ID No: 4 và đoạn mỗi 6; và

trong đó locus tính trạng số lượng 2 (QTL2) gồm một hoặc nhiều gen đánh dấu RAMP được chọn từ nhóm bao gồm đoạn có kích cỡ từ 88 đến 92bp với tổ hợp đoạn mỗi SEQ ID No: 5 và đoạn mỗi 6; đoạn có kích cỡ từ 125 đến 129bp với tổ hợp đoạn mỗi SEQ ID No: 6 và đoạn mỗi 6; đoạn có kích cỡ từ 334 đến 338bp với tổ hợp đoạn mỗi SEQ ID No: 7 và đoạn mỗi 6; đoạn có kích cỡ từ 47 đến 51bp với tổ hợp đoạn mỗi SEQ ID No: 8 và đoạn mỗi 6; và

trong đó liên quan đến hệ gen thì thực vật thể nhận *Brassica* là không giống với thực vật thể cho *Brassica oleracea*.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó locus tính trạng số lượng 1 (QTL1) bao gồm một hoặc nhiều gen đánh dấu RAMP được chọn từ nhóm bao gồm đoạn có kích cỡ 160bp với tổ hợp đoạn mỗi SEQ ID No: 1 và đoạn mỗi 6; đoạn có kích cỡ 285bp với tổ hợp đoạn mỗi SEQ ID No: 2 và đoạn mỗi 6; đoạn có kích cỡ 372bp với tổ hợp đoạn mỗi SEQ ID No: 3 và đoạn mỗi 6; và đoạn có kích cỡ 43bp với tổ hợp đoạn mỗi SEQ ID No: 4 và đoạn mỗi 6.

3. Phương pháp theo điểm 1, trong đó locus tính trạng số lượng 2 (QTL2) bao gồm một hoặc nhiều gen đánh dấu RAMP được chọn từ nhóm bao gồm đoạn có kích cỡ 90bp với tổ hợp đoạn mỗi SEQ ID No: 5 và đoạn mỗi 6; đoạn có kích cỡ 127bp với tổ hợp đoạn mỗi SEQ ID No: 6 và đoạn mỗi 6; đoạn có kích cỡ 336bp với tổ hợp đoạn mỗi SEQ ID No: 7 và đoạn mỗi 6; và đoạn có kích cỡ 49bp với tổ hợp đoạn mỗi SEQ ID No: 8 và đoạn mỗi 6.
4. Phương pháp theo điểm 1, trong đó bước chọn lọc bao gồm công đoạn xác định sự có mặt của một hoặc nhiều gen đánh dấu RAMP trong hệ gen của thực vật thể cho *Brassica oleracea* bằng các kỹ thuật sinh học phân tử.
5. Phương pháp theo điểm 1, trong đó locus tính trạng số lượng 1 (QTL1) và/hoặc locus tính trạng số lượng 2 (QTL2) bao gồm hai hoặc nhiều gen đánh dấu RAMP trong hệ gen của thực vật thể cho *Brassica oleracea*.
6. Phương pháp theo điểm 1, trong đó locus tính trạng số lượng 1 (QTL1) và/hoặc locus tính trạng số lượng 2 (QTL2) bao gồm ba hoặc nhiều gen đánh dấu RAMP trong hệ gen của thực vật thể cho *Brassica oleracea*.
7. Phương pháp theo điểm 1, trong đó locus tính trạng số lượng 1 (QTL1) và/hoặc locus tính trạng số lượng 2 (QTL2) bao gồm bốn gen đánh dấu RAMP trong hệ gen của thực vật thể cho *Brassica oleracea* tương ứng.
8. Phương pháp theo điểm 1, trong đó bước chọn lọc bao gồm sự chọn lọc locus tính trạng số lượng 1 và locus tính trạng số lượng 2 (các QTL 1 và 2) trong thực vật thể cho *Brassica oleracea*.
9. Phương pháp theo điểm 1, trong đó thực vật thể nhận *Brassica* là thực vật *Brassica oleracea*.
10. Phương pháp theo điểm 1, trong đó thực vật *Brassica* được chọn từ nhóm bao gồm *Brassica oleracea* convar. *botrytis* var. *botrytis* (cây súp lơ, romanesco), *Brassica oleracea* convar. *botrytis* var. *cymosa* (cây cải hoa broccoli), *Brassica oleracea* convar. *botrytis* var. *asparagoides* (cây cải hoa broccoli đang nảy chồi), *Brassica oleracea* convar. *oleracea* var. *gemnifera* (cây

cải Brussels sprouts), *Brassica oleracea* convar. *capitata* var. *alba* (cây bắp cải trắng, cây cải bắp có đầu hình nón (oxheart cabbage)), *Brassica oleracea* convar. *capitata* var. *rubra* (cây cải bắp lá đỏ), *Brassica oleracea* convar. *capitata* var. *sabauda* (cây cải xavoa), *Brassica oleracea* convar. *acephela* var. *sabellica* (cây cải bắp cuốn), *Brassica oleracea* convar. *acephela* var. *gongyloides* (cây củ cải) và *Brassica oleracea* var. *trunchuda* syn. *costata* (cây cải bắp Bồ Đào Nha).

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> BEJO Zaden B.V.
 LIGTHART, Johannes Theodorus Wilhelmus
 VEENSTRA, Roelof Marinus
 BIERSTEKER, Klaas
 DE GEUS, Jan
 HUIJS, Hendrikus Stephanus Maria
 SCHRIJVER, Albertus Johannes Maria

<120> Phương pháp tạo ra thực vật thể nhận Brassica kháng Xanthomonas
 Campestris PV. Campestris

<130> 4/2FX68/11

<140> NL1036531

<141> 2009-02-06

<160> 8

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 17

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi RAMP 1.1 của Bảng 3

<400> 1

ttagctctct ctctctc

17

<210> 2

<211> 16

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi RAMP 1.2 của Bảng 3

<400> 2

ccagcacaca cacaca

16

<210> 3

<211> 16

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi RAMP 1.3 của Bảng 3

<400> 3

agattctctc tctctc

16

<210> 4

<211> 15

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi RAMP 1.4 của Bảng 3

<400> 4

caactctctc tctct

15

<210> 5

<211> 16

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi RAMP 2.1 của Bảng 3

<400> 5

ttgtagagag agagag

16

<210> 6

<211> 16

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi RAMP 2.2 của Bảng 3

<400> 6

tctcttcttc ttcttc

16

<210> 7

<211> 15

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi RAMP 2.3 của Bảng 3

<400> 7

caactctctc tctct

15

<210> 8

<211> 16

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi RAMP 2.4 của Bảng 3

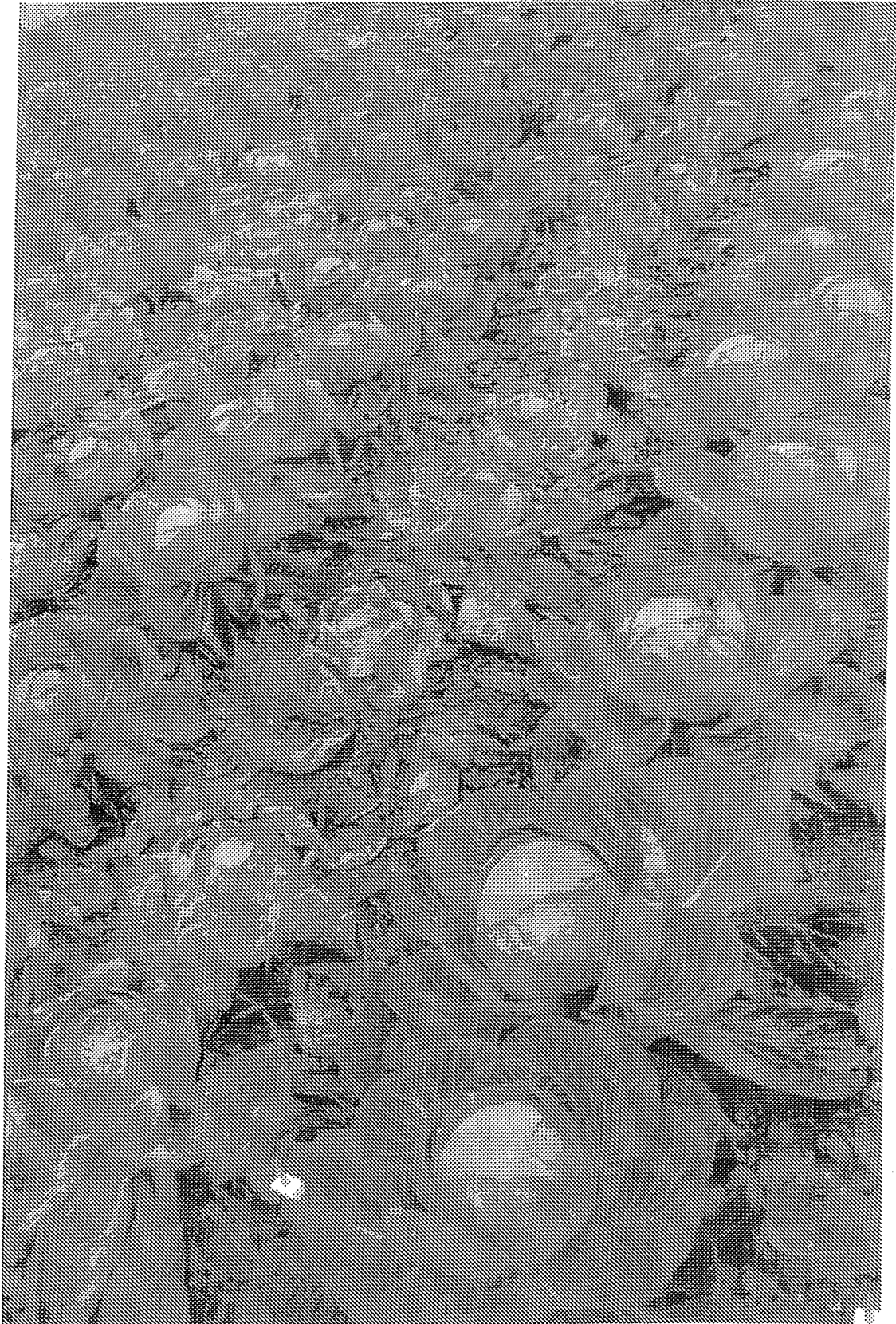
<400> 8

gaaatctctc tctctc

16

23943

FIG. 1



23943

FIG. 2

