



(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)



1-0026599

(51)⁷ A01H 5/00; C12N 15/09

(13) B

(21) 1-2013-02957

(22) 18/03/2011

(86) PCT/JP2011/056551 18/03/2011

(87) WO2012/127559 27/09/2012

(45) 25/12/2020 393

(43) 27/01/2014 310A

(73) HONDA MOTOR CO., LTD. (JP)

1-1, Minami-Aoyama, 2-chome, Minato-ku, Tokyo 107-8556, Japan

(72) LIN Shaoyang (CN).

(74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

(54) CÂY LÚA CHUYÊN GEN, PHƯƠNG PHÁP PHÂN BIỆT CÂY LÚA VÀ
PHƯƠNG PHÁP LÀM CHO CÁ THỂ CÂY LÚA CHÍN SỚM

(57) Mục đích của sáng chế là tạo ra cây lúa mới chín sớm hơn so với cây trồng ban đầu và phương pháp làm cho cá thể cây lúa chín sớm hơn. Sáng chế đề cập đến cây lúa *Koshihikari kazusa* No. 6 có số đơn đăng ký giống cây trồng 25587, cá thể thế hệ con thu được bằng cách lai chéo hai cá thể được chọn từ nhóm bao gồm cá thể cây lúa này và cá thể thế hệ con của chúng, và phương pháp làm cho cá thể cây lúa chín sớm hơn, bao gồm bước thay thế vùng của nhiễm sắc thể thứ ba của cây lúa tương ứng với vùng từ bazơ số 31.720.064 đến bazơ số 3.724.043 của nhiễm sắc thể thứ ba của cây lúa *Nipponbare* bằng mảnh nhiễm sắc thể tạo thành từ vùng tương ứng của cây lúa *Koshihikari kazusa* No. 6 hoặc cây lúa *Habataki*.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến cây trồng mới được tạo ra bằng phương pháp khác với phương pháp tái tổ hợp di truyền, phương pháp phân biệt cây trồng mới này, và phương pháp làm cho cá thể cây lúa chín sớm hơn.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Một quần thể thuộc cùng một loài, nhưng khác với quần thể khác về một tính trạng nhất định vì có đặc điểm di truyền khác nhau, được gọi là giống cây trồng. Nói cách khác, ngay cả với cùng một loài thực vật, thì độ khó trồng, tính đề kháng chống lại sự phá hủy do bệnh tật và côn trùng gây ra, năng suất, chất lượng và các điều kiện tương tự thay đổi phụ thuộc vào cây trồng cụ thể. Do đó, đối với cây nông sản và đặc biệt là các cây trồng quan trọng như cây lúa, cây lúa mạch hoặc lúa mì, người ta đã tập trung nghiên cứu để cải thiện cây trồng tốt hơn, và trong những năm gần đây, việc cải thiện cây trồng được tiến hành bởi nỗ lực không chỉ của các công ty giống cây trồng và hãng tư nhân khác, mà còn được thực hiện bởi các cơ quan chính phủ ở quy mô quốc gia và tỉnh/thành phố.

Cùng với tiến bộ gần đây trong các lĩnh vực như công nghệ phân tích axit nucleic, gen của các thực vật khác nhau như loài cỏ có tên thale cress, cây lúa và lúa mì đã được phân tích, và thông tin di truyền thu được đã được công bố. Việc cải thiện cây trồng bằng cách nhập gen từ loài khác nhờ sử dụng phương pháp tái tổ hợp di truyền đang được thực hiện rộng rãi dựa vào các thông tin di truyền đã biết này. Ví dụ, gen Hd1, mã hoá protein có nguồn gốc từ thực vật có chức năng làm tăng plant độ nhạy với ánh sáng, và phương pháp tạo ra thực vật chuyển gen đã nhập gen Hd1, đã được bộc lộ (xem, ví dụ, Tài liệu patent 1). Tuy nhiên, mặc dù việc cải thiện cây trồng bằng công nghệ tái tổ hợp di truyền tuy có ưu điểm là có thể nhập được tính trạng của loài có quan hệ xa, điều mà việc lai chéo thường là không thực hiện được, nhưng nó lại có nhược điểm là không thể kiểm soát một cách đầy đủ độ an toàn của cây trồng thu được.

Do vậy, đối với cây trồng dùng làm thực phẩm bao gồm cây lúa, nhiều loại cây trồng mới đang được tạo ra bằng phương pháp không phải tái tổ hợp di truyền. Ví dụ, tài liệu patent 2 bộc lộ phương pháp tạo ra cây trồng mới có tính trạng đích, mà không làm biến đổi các tính trạng tốt của cây trồng ban đầu, bằng cách khống chế vùng thay thế bằng mảnh nhiễm sắc thể lấy từ cây trồng cho gen chuyển, đây là cách thay thế bằng mảnh nhiễm sắc thể ngoại sinh hữu ích theo phương pháp không phải là phương pháp tái tổ hợp di truyền. Tương tự, tài liệu patent 2 còn bộc lộ cây lúa mới là cây *Koshihikari eichi* No. 3 mà trong đó chỉ vùng chứa gen Hd1 của Habataki được đưa vào Koshihikari theo phương pháp này để tạo ra cây trồng mới.

Đặc biệt là ở cây lúa, mong muốn là có thể trồng Koshihikari ở nhiều vùng. Koshihikari có hương vị tốt hơn các cây trồng khác và được người tiêu dùng ưa thích. Kết quả là, người nông dân trồng lúa có xu hướng trồng cây Koshihikari ngay cả ở vùng mà không thể luôn nói là thích hợp để trồng Koshihikari. Tuy nhiên, trong trường hợp trồng Koshihikari ở vùng phía Nam, không thể có được năng suất tối ưu do thời gian trổ bông là quá sớm. Hơn nữa, hương vị cuối cùng bị giảm đi do nhiệt độ thường xuyên cao trong thời gian trổ bông. Mặt khác, trong trường hợp trồng Koshihikari ở vùng miền bắc, cây chín muộn, và ngay cả khi bông cờ đã xuất hiện, ví dụ, cây lúa vẫn chưa chín do nhiệt độ thấp, do đó không thể thu hoạch cây lúa.

Các tài liệu đã biết

Tài liệu patent

Tài liệu patent 1: JP 3660967

Tài liệu patent 2: JP 4409610

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo nghiên cứu được thực hiện bởi các tác giả sáng chế, phát hiện được rằng Koshihikari chỉ thích hợp để trồng ở Nhật trong khoảng từ 35,5 độ biên độ bắc đến 38,5 độ biên độ bắc. Nếu như cây trồng Koshihikari có thể được trồng ngay cả ở vùng nằm xa hơn phía bắc từ biên độ bắc 38,5 độ, thì có thể thu hoạch cây Koshihikari ngay cả ở vùng như Hokkaido là vùng trong đó trước đây không thể trồng cây Koshihikari.

Mục đích của sáng chế là tạo ra cây lúa mới mà có thể được trồng ngay cả ở vùng nằm xa phía bắc hơn so với giống cây trước đây, và phương pháp làm cho các cá thể

cây lúa chín sớm hơn.

Phương án giải quyết vấn đề

Nhờ việc thực hiện nhiều nghiên cứu kỹ lưỡng nhằm giải quyết vấn đề nêu trên, các tác giả sáng chế đã phát hiện được rằng có thể làm cho cây lúa Koshihikari chín đủ sớm để có thể trồng ngay cả ở vùng xa hơn về phía bắc so với trước đây bằng cách thay thế mảnh nhiễm sắc thể của một vùng nhất định có mặt ở nhiễm sắc thể thứ ba của cây lúa Habataki và mảnh nhiễm sắc thể của một vùng nhất định có mặt ở nhiễm sắc thể thứ sáu của cây lúa Habataki vào cây lúa Koshihikari.

Cụ thể là, sáng chế đề xuất các nội dung sau:

(1) cây lúa *Koshihikari kazusa* No. 6 (cây trồng *Oryza sativa* L. là *Koshihikari kazusa* No. 6) có số đơn đăng ký cây trồng 25587;

(2) cá thể thế hệ con thu được bằng cách lai chéo hai cá thể được chọn từ nhóm bao gồm cá thể cây trồng như được mô tả trong mục (1) nêu trên và cá thể thế hệ con của cá thể cây trồng như được mô tả trong mục (1) nêu trên;

(3) phương pháp phân biệt cây lúa bao gồm việc xác định xem cá thể cây lúa cụ thể có phải là cây trồng đặc thù hay không, trong đó:

SNP (đa hình đơn nucleotit) tương ứng với SNP thứ 31.521.442 trên nhiễm sắc thể thứ ba của cây lúa Nipponbare (A ở cây lúa Koshihikari và C ở cây lúa Habataki) được chọn làm dấu chuẩn ADN M1,

SNP tương ứng với SNP thứ 31.689.690 của nhiễm sắc thể thứ ba của cây lúa Nipponbare (C ở cây lúa Koshihikari và T ở cây lúa Habataki) được chọn làm dấu chuẩn ADN M2,

SNP tương ứng với SNP thứ 3.208.924 của nhiễm sắc thể thứ ba của cây lúa Nipponbare (A ở cây lúa Koshihikari và G ở cây lúa Habataki) được chọn làm dấu chuẩn ADN M3,

SNP tương ứng với SNP thứ 32.298.686 của nhiễm sắc thể thứ ba của cây lúa Nipponbare (G ở cây lúa Koshihikari và C ở cây lúa Habataki) được chọn làm dấu chuẩn ADN M4,

SNP tương ứng với SNP thứ 32.363.157 của nhiễm sắc thể thứ ba của cây lúa

Nipponbare (A ở cây lúa Koshihikari và T ở cây lúa Habataki) được chọn làm dấu chuẩn ADN M5,

một hoặc nhiều dấu chuẩn ADN được chọn từ nhóm bao gồm các dấu chuẩn ADN M1 đến M5 được định typ bằng cách phân tích hệ gen của cá thể cây lúa, và

trong trường hợp kết quả định typ thu được phù hợp với kết quả cho cây lúa *Koshihikari kazusa* No. 6 (cây trồng *Oryza sativa* L. là *Koshihikari kazusa* No. 6) hoặc cây lúa *Koshihikari eichi* No. 5 (cây trồng *Oryza sativa* L. là *Koshihikari eichi* No. 5), cá thể cây lúa này được nhận diện là cây lúa *Koshihikari kazusa* No. 6 hoặc cây lúa *Koshihikari eichi* No. 5;

(4) phương pháp phân biệt cây lúa bao gồm việc xác định xem cá thể cây lúa cụ thể có phải là cây trồng đặc thù hay không, trong đó:

SNP tương ứng với SNP thứ 8.757.818 của nhiễm sắc thể thứ sáu của cây lúa Nipponbare (C ở cây lúa Koshihikari và T ở cây lúa Habataki) được chọn làm dấu chuẩn ADN M1,

SNP tương ứng với SNP thứ 8.940.503 của nhiễm sắc thể thứ sáu của cây lúa Nipponbare (A ở cây lúa Koshihikari và G ở cây lúa Habataki) được chọn làm dấu chuẩn ADN M2,

SNP tương ứng với SNP thứ 9.325.062 của nhiễm sắc thể thứ sáu của cây lúa Nipponbare (C ở cây lúa Koshihikari và G ở cây lúa Habataki) được chọn làm dấu chuẩn ADN M3,

SNP tương ứng với SNP thứ 9.533.057 của nhiễm sắc thể thứ sáu của cây lúa Nipponbare (G ở cây lúa Koshihikari và C ở cây lúa Habataki) được chọn làm dấu chuẩn ADN M4,

SNP tương ứng với SNP thứ 9.777.196 của nhiễm sắc thể thứ sáu của cây lúa Nipponbare (A ở cây lúa Koshihikari và T ở cây lúa Habataki) được chọn làm dấu chuẩn ADN M5,

một hoặc nhiều dấu chuẩn ADN được chọn từ nhóm bao gồm các dấu chuẩn ADN M1 đến M5 được định typ bằng cách phân tích hệ gen của cá thể cây lúa, và

trong trường hợp kết quả định typ thu được phù hợp với kết quả cho cây lúa

Koshihikari kazusa No. 6 (cây trồng *Oryza sativa* L. là *Koshihikari kazusa* No. 6) hoặc cây lúa *Koshihikari eichi* No. 3 (cây trồng *Oryza sativa* L. là *Koshihikari eichi* No. 3), cả thể cây lúa này được nhận diện là cây lúa *Koshihikari kazusa* No. 6 hoặc cây lúa *Koshihikari eichi* No. 3;

(5) phương pháp làm cho cá thể cây lúa chín sớm hơn, trong đó phương pháp này bao gồm việc thay thế vùng tương ứng với vùng từ bazơ số 31.720.064 đến bazơ số 3.724.043 của nhiễm sắc thể thứ ba của cây lúa Nipponbare bằng mảnh nhiễm sắc thể tạo thành từ vùng tương ứng của cây lúa *Koshihikari kazusa* No. 6 hoặc cây lúa Habataki trên nhiễm sắc thể thứ ba của cá thể cây lúa;

(6) phương pháp làm cho cá thể cây lúa chín sớm hơn như được mô tả trong mục (5) nêu trên, trong đó mảnh nhiễm sắc thể này được thay thế sao cho đầu tận phía trước của mảnh nhiễm sắc thể này có mặt trong vùng tương ứng với vùng từ bazơ số 31.689.691 đến bazơ số 31.720.064 của nhiễm sắc thể thứ ba của cây lúa Nipponbare, và đầu tận phía sau của mảnh nhiễm sắc thể này có mặt trong vùng tương ứng với vùng từ bazơ số 3.724.043 đến bazơ số 32.298.685 của nhiễm sắc thể thứ ba của cây lúa Nipponbare;

(7) phương pháp làm cho cá thể cây lúa chín sớm hơn bao gồm việc thay thế vùng tương ứng với vùng từ bazơ số 31.689.690 đến bazơ số 32.298.686 của nhiễm sắc thể thứ ba của cây lúa Nipponbare bằng mảnh nhiễm sắc thể tạo thành từ vùng tương ứng của cây lúa *Koshihikari kazusa* No. 6 hoặc cây lúa Habataki trên nhiễm sắc thể thứ ba của cá thể cây lúa;

(8) phương pháp làm cho cá thể cây lúa chín sớm hơn như được mô tả trong mục (7) nêu trên, trong đó mảnh nhiễm sắc thể này được thay thế sao cho đầu tận phía trước của mảnh nhiễm sắc thể này có mặt trong vùng tương ứng với vùng từ bazơ số 31.521.443 đến bazơ số 31.689.690 của nhiễm sắc thể thứ ba của cây lúa Nipponbare, và đầu tận phía sau của mảnh nhiễm sắc thể này có mặt trong vùng tương ứng với vùng từ bazơ số 32.298.686 đến bazơ số 32.363.156 của nhiễm sắc thể thứ ba của cây lúa Nipponbare;

(9) cây lúa được tạo ra bằng phương pháp làm cho cá thể cây lúa chín sớm hơn như được mô tả trong mục bất kỳ từ mục (5) đến mục (8) nêu trên;

(10) cá thể thế hệ con thu được bằng cách lai chéo hai cá thể được chọn từ nhóm bao gồm cá thể cây trồng như được mô tả trong mục (9) nêu trên và cá thể thế hệ con của cá thể cây trồng như được mô tả trong mục (9) nêu trên; và,

(11) phương pháp trồng cây lúa bao gồm việc trồng trong vùng, nằm xa hơn phía bắc so với biên độ bắc 38,5 độ, một hoặc nhiều loại cá thể cây lúa được chọn từ nhóm bao gồm cá thể cây lúa mà trong đó vùng tương ứng với vùng từ bazơ số 8.940.503 đến bazơ số 9.533.057 của nhiễm sắc thể thứ sáu của cây lúa *Nipponbare* được thay bằng mảnh nhiễm sắc thể tạo thành từ vùng tương ứng của cây lúa *Koshihikari kazusa* No. 6, cây lúa *Koshihikari eichi* No. 3 hoặc cây lúa Habataki trên nhiễm sắc thể thứ sáu của cá thể cây lúa, cá thể cây lúa của cây lúa *Koshihikari kazusa* No. 6, và cá thể cây lúa của cây lúa *Koshihikari eichi* No. 3.

Hiệu quả của sáng chế

Cây trồng mới theo sáng chế ở dạng cây lúa *Koshihikari kazusa* No. 6 chín sớm hơn nhiều so với *Koshihikari* và có thể trồng và thu hoạch được cây lúa ngay cả ở vùng nằm xa hơn về phía bắc với biên độ bắc 38,5 độ. Ngoài ra, cây lúa *Koshihikari kazusa* No. 6 là cây trồng mới có các đặc tính ngoài thời gian thu hoạch, như chất lượng và năng suất, là gần giống như các đặc tính của cây *Koshihikari*.

Ngoài ra, phương pháp phân biệt cây lúa theo sáng chế có thể phân biệt cây lúa *Koshihikari kazusa* No. 6.

Ngoài ra, phương pháp làm cho chín sớm cá thể cây lúa theo sáng chế có thể làm cho cá thể cây lúa chín sớm hơn so với cây trồng ban đầu.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 là hình vẽ thể hiện vùng đích T trên nhiễm sắc thể G của cây trồng ban đầu, mảnh nhiễm sắc thể L thu được từ cây trồng cho gen chuyển đã được được thay vào trong đó, và các dấu chuẩn ADN M1 đến M5.

Fig. 2 là hình vẽ thể hiện sơ đồ hệ gen của *Koshihikari* và *Koshihikari eichi* No. 5.

Fig. 3 là hình vẽ thể hiện kết quả khảo sát thời gian trổ bông của *Koshihikari* và *Koshihikari eichi* No. 5 ở quận Chiba.

Fig. 4 là hình vẽ thể hiện kết quả khảo sát thời gian trở bông của *Koshihikari* và *Koshihikari eichi* No. 5 ở Hokkaido.

Fig. 5 là hình vẽ thể hiện sơ đồ hệ gen của *Koshihikari eichi* No. 3.

Fig. 6 là hình vẽ thể hiện kết quả khảo sát thời gian trở bông của *Koshihikari* và *Koshihikari eichi* No. 3 ở quận Chiba.

Fig. 7 là hình vẽ thể hiện kết quả khảo sát thời gian trở bông của *Koshihikari* và *Koshihikari eichi* No. 3 ở Hokkaido.

Fig. 8 là hình vẽ thể hiện sơ đồ hệ gen của *Koshihikari kazusa* No. 6.

Fig. 9 là hình vẽ thể hiện kết quả khảo sát thời gian trở bông của *Koshihikari kazusa* No. 6 ở quận Chiba cùng với kết quả cho *Koshihikari*, *Koshihikari eichi* No. 5 và *Koshihikari eichi* No. 3.

Fig. 10 là hình vẽ thể hiện kết quả khảo sát thời gian trở bông của *Koshihikari kazusa* No. 6 ở Hokkaido cùng với các kết quả cho *Koshihikari*, *Koshihikari eichi* No. 5 và *Koshihikari eichi* No. 3.

Mô tả chi tiết sáng chế

Giống có mảnh nhiễm sắc thể cải biến theo sáng chế chỉ giống mà trong đó chỉ một phần của nhiễm sắc thể của cây trồng ban đầu được thay bằng mảnh nhiễm sắc thể thu được từ cây trồng cho gen chuyển. Ở đây, không có giới hạn cụ thể nào về cây trồng cho gen chuyển miễn là nó là cây trồng khác cây trồng ban đầu, và có thể là cây trồng thuộc thực vật của cùng một loài như cây trồng ban đầu, có thể là cây trồng thuộc thực vật thuộc loài khác cây trồng ban đầu, hoặc có thể là cây trồng không phải là cây trồng thực vật như của động vật. Ngoài ra, theo sáng chế, cây trồng dùng để chỉ quần thể thuộc vào cùng một loài thực vật và có thể được phân biệt một cách rõ ràng so với các cây trồng của cùng một loài về một tính trạng nhất định do có thành phần di truyền khác nhau.

Theo sáng chế, không có giới hạn cụ thể nào về các dấu chuẩn ADN miễn là chúng cho phép phát hiện sự khác biệt trình tự ADN trên nhiễm sắc thể mà có thể phân biệt giữa nhiễm sắc thể thu được từ cây trồng ban đầu và nhiễm sắc thể thu được từ cây trồng cho gen chuyển, và có thể sử dụng các dấu chuẩn ADN thường được sử dụng trong lĩnh vực di truyền phân tích. Các dấu chuẩn ADN này có thể là các dấu chuẩn

ADN có khả năng phát hiện hiện tượng đa hình di truyền như sự khác biệt ở một số đoạn lặp của đa hình đơn nucleotit (SNP: single nucleotide hiện tượng đa hình) hoặc đoạn lặp trình tự đơn giản (SSR: simple sequence repeat), hoặc có thể là đa hình độ dài các đoạn giới hạn (RFLP: restrictive fragment chiều dài hiện tượng đa hình) các dấu chuẩn ADN. Ngoài ra, sự phân biệt giữa alen thu được từ cây trồng ban đầu và alen thu được từ cây trồng cho gen chuyển bởi các dấu chuẩn ADN này có thể được thực hiện theo các phương pháp thông thường. Ví dụ, với mỗi hiện tượng đa hình có thể được phân biệt bằng cách tiến hành PCR bằng cách sử dụng ADN chiết từ mỗi cá thể làm khuôn mẫu và sử dụng đoạn mồi và các đoạn tương tự có khả năng lai đặc hiệu với SNP hoặc SSR đặc trưng, và sau đó phát hiện sự có mặt hoặc vắng mặt của sản phẩm PCR bằng cách sử dụng điện di và các phương pháp tương tự. Ngoài ra, mỗi hiện tượng đa hình có thể được phân biệt bằng cách xử lý bằng ADN chiết từ mỗi cá thể bằng restrictaza và sau đó phát hiện kiểu mẫu của ảnh ADN bằng cách sử dụng điện di và các phương pháp tương tự. Ngoài ra, đoạn mồi và các đoạn tương tự có khả năng lai đặc hiệu với SNP hoặc SSR đặc trưng có thể được tạo ra theo phương pháp thông thường bằng cách sử dụng công cụ thiết kế đoạn mồi thường được sử dụng và các đoạn tương tự tương ứng với trình tự bazơ của SNP hoặc SSR. Ngoài ra, đoạn mồi và các đoạn tương tự được thiết kế này có thể được tổng hợp bằng cách sử dụng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật liên quan.

Các dấu chuẩn ADN đã biết có thể được sử dụng thích hợp cho các dấu chuẩn ADN này. Ngoài ra, các dấu chuẩn ADN này cũng có thể là các dấu chuẩn ADN mới được tạo ra. Ví dụ về các dấu chuẩn ADN đã biết mà có thể được sử dụng ở cây lúa bao gồm các dấu chuẩn ADN SNP được bộc lộ trong công bố đơn quốc tế số WO 2003/070934 và các dấu chuẩn ADN được Rice Genome Research Program công bố (RGP: <http://rgp.dna.affrc.go.jp/publicdata.html>).

Ngoài ra, thông tin di truyền ở mỗi cây trồng có thể được thu nhận từ dữ liệu trình tự bazơ quốc tế của National Center for Biotechnology Information (NCBI) hoặc DNA Data Bank of Japan (DDBJ). Thông tin di truyền trên mỗi cây lúa đặc biệt là có thể được thu nhận từ Knowledge-based Oryza Molecular biological Encyclopedia (KOME: <http://cdna0.1.dna.affrc.go.jp/cDNA/>).

Theo sáng chế và phần mô tả của đơn này, “vùng từ bazơ số X đến bazơ số Y của

nhiễm sắc thể của cây lúa Nipponbare” là vùng được xác định dựa trên trình tự bazơ của ADN của hệ gen của cây lúa Nipponbare được RGB công bố (Phiên bản 4: IRGSP-build4-06/04/21).

Ngoài ra, theo sáng chế và phần mô tả của đơn này, “vùng tương ứng với vùng từ bazơ số X đến bazơ số Y của nhiễm sắc thể của cây lúa Nipponbare” là vùng trong nhiễm sắc thể của cá thể cây lúa có độ tương đồng cao với trình tự tương ứng trong nhiễm sắc thể của cây lúa Nipponbare, và có thể được xác định bằng cách sắp hàng trình tự bazơ của ADN hệ gen của cây lúa Nipponbare đã biết và ADN của hệ gen của cá thể cây lúa sao cho có thể thể hiện tính tương đồng cao nhất. Ngoài ra, “SNP tương ứng với SNP của cây lúa Nipponbare” ở cá thể cây lúa không phải là cây lúa Nipponbare dùng để chỉ bazơ ở vị trí tương ứng với SNP trong vùng chứa SNP trong trường hợp trình tự bazơ của ADN hệ gen của cây lúa Nipponbare đã biết và ADN hệ gen của cá thể cây lúa đã được sắp hàng để thể hiện tính tương đồng cao nhất.

Để trồng được cây trồng mới mà có thể trồng ở vùng xa phía bắc hơn vùng thường trồng cây trồng bình thường, trước hết các tác giả sáng chế thực hiện phân tích locus tính trạng số lượng (QTL) của thời gian trổ bông trong quần thể được phân lập bằng cách lai chéo cây lúa Habataki và cây lúa Koshihikari. Kết quả là, QTL mà gây ra sự chín sớm do thời gian trổ bông xảy ra trước được xác định là nằm ở vùng QTS14 của nhánh cánh tay dài của nhiễm sắc thể thứ ba của cây lúa Habataki (vùng tương ứng với vùng từ bazơ số 31.720.064 đến bazơ số 3.724.043 của nhiễm sắc thể thứ ba của cây lúa Nipponbare). Do đó, các tác giả sáng chế tạo ra cây trồng mới mà trong đó gen nằm trong vùng tương ứng của Koshihikari được thay bằng gen thu được từ Habataki. Cây trồng mới này được dự đoán là cây lúa chín sớm hơn cây trồng Koshihikari ban đầu.

Trong trường hợp thực hiện phương pháp lai giống thực vật chọn lọc không phải bằng phương pháp tái tổ hợp di truyền, nếu như mảnh nhiễm sắc thể đưa vào thu được từ cây trồng cho gen chuyển là quá lớn, thì có nguy cơ đưa một số lượng lớn các gen khác có chức năng không rõ ràng không phải là gen cho tính trạng đích, cũng như nguy cơ làm suy giảm các tính trạng được ưu tiên có ở cây trồng ban đầu. Do đó, các tác giả sáng chế tạo ra cây trồng mới theo phương pháp như được mô tả trong Tài liệu patent 2 để tạo ra cây trồng mới mang tính trạng đích, mà không biến đổi các tính

trạng được ưu tiên có ở cây trồng ban đầu, bằng cách không chế vùng thay thế bằng cách đưa vào mảnh nhiễm sắc thể thu được từ cây trồng cho gen chuyển.

Cụ thể hơn, phương pháp được dùng để tạo ra cây trồng mới như được mô tả trong Tài liệu patent 2 là như mô tả sau đây. Trước hết, năm typ dấu chuẩn ADN bằng mối liên hệ vị trí như được thể hiện ở Fig. 1 được đưa ra dựa trên thông tin di truyền đã biết của cây lúa. Cụ thể là, dấu chuẩn ADN M2 được thiết lập nằm ở đầu tận phía trước của vùng đích T hoặc ở phía trước của nó, dấu chuẩn ADN M1 được thiết lập ở phía trước dấu chuẩn ADN M2, dấu chuẩn ADN M4 được thiết lập nằm ở đầu tận phía sau của vùng đích T hoặc vùng nằm sau đó, dấu chuẩn ADN M5 được thiết lập nằm sau dấu chuẩn ADN M4, và dấu chuẩn ADN M3 được thiết lập trong vùng đích T. Tiếp theo, thực hiện lai chéo ngược lại trên giống có mảnh nhiễm sắc thể cải biến mà trong đó chỉ một phần của nhiễm sắc thể Koshihikari chứa vùng đích T được thay bằng mảnh nhiễm sắc thể thu được từ Habataki, và chọn lọc các cá thể ưu tiên dựa trên năm typ dấu chuẩn ADN M1 đến M5 được đề cập trên đây từ thể lai quần thể thu được. Sau đó, bằng lặp lại các bước tương tự một cách thích hợp bước chọn lọc các cá thể ưu tiên dựa trên các dấu chuẩn ADN M1 đến M5 bằng cách tiến hành tự lai chéo hoặc lai chéo ngược lại trên các cá thể này, có thể thu được cá thể thế hệ con sao cho đầu tận phía trước của vùng này được thay bằng mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ Habataki có mặt giữa các dấu chuẩn ADN M1 và M2, và đầu tận phía sau của vùng đó có mặt giữa các dấu chuẩn ADN M4 và M5. Như được thể hiện trên Fig. 1, trong cá thể thế hệ con này, các dấu chuẩn ADN M1 và M5 là thuộc cùng một typ như cây trồng ban đầu, trong khi đó các dấu chuẩn ADN M2, M3 và M4 là cùng một typ như cây trồng cho gen chuyển (Habataki theo sáng chế).

Ở đây, trong phương pháp tạo ra cây trồng mới như được mô tả trong Tài liệu patent 2, nếu như khoảng cách d1 giữa các dấu chuẩn ADN M1 và M2 là dài, khoảng cách mà theo đó đầu tận phía trước của mảnh nhiễm sắc thể L thu được từ cây trồng cho gen chuyển (mảnh nhiễm sắc thể thu được từ Habataki trong đơn này) có thể trở nên lớn, làm cho khó xác định chiều dài của mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ Habataki L được đưa vào. Mặt khác, nếu như khoảng cách d1 là ngắn, khoảng cách mà theo đó đầu tận phía trước của mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ Habataki L có thể có mặt là nhỏ, nhờ đó có thể dễ dàng xác định chiều dài của mảnh nhiễm sắc thể có

nguồn gốc từ Habataki L được đưa vào. Tương tự, nếu như khoảng cách d3 giữa các dấu chuẩn ADN M4 và M5 là dài, khoảng cách mà theo đó đầu tận phía sau của mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ Habataki L có thể trở nên lớn, do đó khó xác định chiều dài của mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ Habataki L được đưa vào, trong khi đó nếu như khoảng cách d3 là ngắn, khoảng cách mà theo đó đầu tận phía sau của mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ Habataki L có thể có mặt là nhỏ, nhờ đó làm cho dễ dàng xác định được chiều dài của mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ Habataki L được đưa vào.

Cụ thể hơn, các tác giả sáng chế tạo ra cây trồng mới theo phương pháp tạo ra cây trồng mới như được mô tả trong Tài liệu patent 2 lần lượt bằng cách sử dụng tập hợp các dấu chuẩn ADN M1 đến M5 như được thể hiện trong Bảng 1, cụ thể là bằng cách sử dụng SNP (đa hình đơn nucleotit) tương ứng với SNP thứ 31.521.442 của nhiễm sắc thể thứ ba của cây lúa Nipponbare (A ở cây lúa Koshihikari và C ở cây lúa Habataki) làm dấu chuẩn ADN M1 (Dấu chuẩn ADN M1-Ac (QTS14)), bằng cách sử dụng SNP tương ứng với SNP thứ 31.689.690 của nhiễm sắc thể thứ ba của cây lúa Nipponbare (C ở cây lúa Koshihikari và T ở cây lúa Habataki) làm dấu chuẩn ADN M2 (Dấu chuẩn ADN M2-Ct (QTS14)), bằng cách sử dụng SNP tương ứng với SNP thứ 3.208.924 của nhiễm sắc thể thứ ba của cây lúa Nipponbare (A ở cây lúa Koshihikari và G ở cây lúa Habataki) làm dấu chuẩn ADN M3 (Dấu chuẩn ADN M3-Ag (QTS14)), bằng cách sử dụng SNP tương ứng với SNP thứ 32.298.686 của nhiễm sắc thể thứ ba của cây lúa Nipponbare (G ở cây lúa Koshihikari và C ở cây lúa Habataki) làm dấu chuẩn ADN M4 (Dấu chuẩn ADN M4-Gc (QTS14)), và bằng cách sử dụng SNP tương ứng với SNP thứ 32.363.157 của nhiễm sắc thể thứ ba của cây lúa Nipponbare (A ở cây lúa Koshihikari và T ở cây lúa Habataki) làm dấu chuẩn ADN M5 (Dấu chuẩn ADN M5-At (QTS14)). Dựa trên các kết quả này, tạo ra cây trồng mới mà trong đó vùng chứa vùng từ dấu chuẩn ADN M2-Ct (QTS14) đến dấu chuẩn ADN M4-Gc (QTS14) (cụ thể là, vùng tương ứng với vùng từ bazơ số 31.689.690 đến bazơ số 32.298.686 của nhiễm sắc thể thứ ba của cây lúa Nipponbare) được thay bằng mảnh nhiễm sắc thể thu được từ Habataki trên nhiễm sắc thể thứ ba của cá thể cây lúa. Trong cây trồng mới này, đầu tận phía trước của mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ Habataki có mặt trong vùng nằm sau dấu chuẩn ADN M1-Ac (QTS14) và kéo dài đến dấu chuẩn ADN M2-Ct (QTS14) (cụ thể là, vùng tương ứng với vùng từ bazơ số

31.521.443 đến bazơ số 31.689.690 của nhiễm sắc thể thứ ba của cây lúa Nipponbare), và đầu tận phía sau của mảnh nhiễm sắc thể này có mặt trong vùng kéo dài từ đầu chuẩn ADN M4-Gc (QTS14) đến phía trước đầu chuẩn ADN M5-At (QTS14) (cụ thể là, vùng tương ứng với vùng từ bazơ số 32.298.686 đến bazơ số 32.363.156 của nhiễm sắc thể thứ ba của cây lúa Nipponbare).

Bảng 1

Dấu chuẩn ADN	Vị trí ở nhiễm sắc thể thứ ba	Typ ở trên Koshihikari	Typ ở trên Habataki	Trình tự
M1-Ac (QTS14)	31.521.442	A	C	Đoạn mỗi xuôi: CATTCAGTTCTCTCAACTGC
				Đoạn mỗi ngược: GAGATTTTCGAAGGTTCTTCGC
				đoạn mỗi SNP: TTCCTAACCCAGCTGTGAT
M2-Ct (QTS14)	31.689.690	C	T	Đoạn mỗi xuôi: AAAACAGCCACACCTGATCG
				Đoạn mỗi ngược: AACATCCTCTGCTTCCTCAG
				đoạn mỗi SNP: TATCGCTAGCCTCCATTTCT
M3-Tc (QTS14)	3.208.924	A	G	Đoạn mỗi xuôi: GAATGGAATGAGCCATACTCC
				Đoạn mỗi ngược: CTGCATCTACACGCTATACC
				đoạn mỗi SNP: GTGATGGAAAAGTTGGAAGTTTGAA
M4-Gc (QTS14)	32.298.686	G	C	Đoạn mỗi xuôi: TCCATCCGATGCAGATATCC
				Đoạn mỗi ngược: GTAGTTATGGTACACTCGCAG
				đoạn mỗi SNP: GCTGGGGAAAGTGATTTCATC
M5-At (QTS14)	32.363.157	A	T	Đoạn mỗi xuôi: ACGTGGGGTACAGCACTTTGA
				Đoạn mỗi ngược: GTCAGGAAAGTTGGAAGAGG
				đoạn mỗi SNP:

				GATCTCTGACAATATCAAGAAGCT
--	--	--	--	--------------------------

Cây trồng mới này được các tác giả sáng chế đặt tên là “*Koshihikari eichi* No. 5”. Fig. 2 là hình vẽ thể hiện sơ đồ hệ gen của *Koshihikari* và *Koshihikari eichi* No. 5. Khi thời gian trổ bông của *Koshihikari eichi* No. 5 được xác định trên cánh đồng ở quận Chiba (ngày gieo mạ 6/5/2010, ngày cấy lúa 1/6/2010), như được thể hiện trên Fig. 3, trong khi thời gian trổ bông của *Koshihikari* là từ 5/8 đến 8/8, thì thời gian trổ bông *Koshihikari eichi* No. 5 là từ 24/7 đến 26/7. Nói cách khác, *Koshihikari eichi* No. 5 được xác định rõ ràng là chín sớm hơn so với cây trồng *Koshihikari* ban đầu.

Hơn nữa, thời gian trổ bông của *Koshihikari eichi* No. 5 được xác định trên cánh đồng nằm ở Hokkaido xa hơn về phía bắc từ biên độ bắc 38,5 độ (ngày gieo mạ 28/4/2010, ngày cấy lúa 7/6/2010). Kết quả là, như được thể hiện trên Fig. 4, trong khi thời gian trổ bông của *Koshihikari* là từ 1/9 đến 2/9, thời gian trổ bông của *Koshihikari eichi* No. 5 là từ 21/8 đến 22/8. Nói cách khác, ngay cả trong trường hợp trồng ở Hokkaido, *Koshihikari eichi* No. 5 được xác định rõ ràng là chín sớm hơn cây trồng *Koshihikari* ban đầu. Tuy nhiên, mặc dù *Koshihikari* và *Koshihikari eichi* No. 5 tạo ra bông cò, nhưng các cây này không đủ chín và không thể thu hoạch được thóc.

Các tác giả sáng chế cho rằng có thể thu được *Koshihikari* mà chín đủ sớm để có thể trồng thậm chí ở vùng miền bắc bằng cách chèn thêm mảnh nhiễm sắc thể đưa vào có chức năng mà gây ra chín sớm ở *Koshihikari eichi* No. 5. Do đó, *Koshihikari eichi* No. 5 được lai chéo với cây lúa *Koshihikari eichi* No. 3.

Koshihikari eichi No. 3 là cây trồng mà trong đó chỉ vùng chứa gen Hd1 của nhiễm sắc thể thứ sáu của nhiễm sắc thể của *Koshihikari* được thay bằng mảnh gen thu được từ Habataki bằng cách sử dụng phương pháp tạo ra cây trồng mới như được mô tả trong Tài liệu patent 2. Bảng 2 biểu thị năm typ dấu chuẩn ADN được dùng để tạo ra *Koshihikari eichi* No. 3. Dấu chuẩn ADN M1-Ct là SNP tương ứng với SNP thứ 8.757.818 của nhiễm sắc thể thứ sáu của cây lúa Nipponbare (C ở cây lúa *Koshihikari* và T ở cây lúa Habataki), dấu chuẩn ADN M2-Ag là SNP tương ứng với SNP thứ 8.940.503 của nhiễm sắc thể thứ sáu của cây lúa Nipponbare (A ở cây lúa *Koshihikari* và G ở cây lúa Habataki), dấu chuẩn ADN M3-Cg là SNP tương ứng với SNP thứ 9.325.062 của nhiễm sắc thể thứ sáu của cây lúa Nipponbare (C ở cây lúa *Koshihikari* và G ở cây lúa Habataki), dấu chuẩn ADN M4-Gc là SNP tương ứng với SNP thứ

9.533.057 của nhiễm sắc thể thứ sáu của cây lúa Nipponbare (G ở cây lúa Koshihikari và C ở cây lúa Habataki), và dấu chuẩn ADN M5-At là SNP tương ứng với SNP thứ 9.777.196 của nhiễm sắc thể thứ sáu của cây lúa Nipponbare (A ở cây lúa Koshihikari và T ở cây lúa Habataki). Cụ thể là, *Koshihikari eichi* No. 3 là cây trồng mới mà trong đó vùng từ dấu chuẩn ADN M2-Ag (Hd1) đến dấu chuẩn ADN M4-Gc (Hd1) của nhiễm sắc thể thứ sáu của cây lúa Koshihikari (cụ thể là, vùng tương ứng với vùng từ bazơ số 8.940.503 đến bazơ số 9.533.057 của nhiễm sắc thể thứ sáu của cây lúa Nipponbare) được thay bằng mảnh nhiễm sắc thể thu được từ Habataki. Trong cây trồng mới này, đầu tận phía trước của mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ Habataki có mặt trong vùng nằm sau dấu chuẩn ADN M1-Ct (Hd1) và kéo dài đến dấu chuẩn ADN M2-Ag (Hd1) (cụ thể là, vùng tương ứng với vùng từ bazơ số 8.757.819 đến bazơ số 8.940.503 của nhiễm sắc thể thứ sáu của cây lúa Koshihikari), và đầu tận phía sau của mảnh nhiễm sắc thể này có mặt trong vùng kéo dài từ dấu chuẩn ADN M4-Gc (Hd1) đến phía trước dấu chuẩn ADN M5-At (Hb1) (cụ thể là, vùng tương ứng với vùng từ bazơ số 9.533.057 đến bazơ số 9.777.195).

Bảng 2

Dấu chuẩn ADN	Vị trí trên nhiễm sắc thể số 6	Typ trên Koshihikari	Typ ở trên Habataki	Trình tự
M1-Ct (Hd1)	8.757.818	C	T	Đoạn mỗi xuôi: GCGAAAAGATGAGGATGTACAC
				Đoạn mỗi ngược: CCGTAGGCCTTTGTCAAGTG
				đoạn mỗi SNP: CTTTAATGGTGGCTTATGTC
M2-Ag (Hd1)	8.940.503	A	G	Đoạn mỗi xuôi: GACCTTCATCTGAGATGTGAC
				Đoạn mỗi ngược: GGAAAGTGAAGCAGCTTCTC
				đoạn mỗi SNP: CAGCAAGCTCCTGTCCATATTT
M3-Cg (Hd1)	9.325.062	C	G	Đoạn mỗi xuôi: AGGCCCTTGTACTGGTAC
				Đoạn mỗi ngược: GTACACAATAGTTGGTGCACC
				đoạn mỗi SNP:

				CATGATAAGGTACTCCTGG
M4-Gc (Hd1)	9.533.057	G	C	Đoạn mỗi xuôi: GTATCAATCATGTGATCAGTGGC
				Đoạn mỗi ngược: CCTAGGAATTAGGAAGCACAG
				đoạn mỗi SNP: CAGCCAACATTGAGGGCTCT
M5-At (Hd1)	9.777.196	A	T	Đoạn mỗi xuôi: CTTCGTACCATGATGCAGGG
				Đoạn mỗi ngược: GCAAGAAACTGATGCGGTAG
				đoạn mỗi SNP: CCAAGAGGTCTCCGCAGCCG

Fig. 5 là hình vẽ thể hiện bằng sơ đồ hệ gen của *Koshihikari* và *Koshihikari eichi* No. 3. Khi thời gian trổ bông của *Koshihikari eichi* No. 3 được xác định trên cánh đồng ở quận Chiba (ngày gieo mạ 6/5/2010, ngày cấy lúa 1/6/2010), như được thể hiện trên Fig. 6, trong khi thời gian trổ bông của *Koshihikari* là từ 5/8 đến 8/8, thời gian trổ bông của *Koshihikari eichi* No. 3 là từ 25/7 đến 26/7. Nói cách khác, trong trường hợp trồng ở quận Chiba, *Koshihikari eichi* No. 3 chín sớm hơn đến cùng một mức độ như *Koshihikari eichi* No. 5.

Hơn nữa, thời gian trổ bông của *Koshihikari eichi* No. 3 được xác định trên cánh đồng nằm ở Hokkaido xa hơn về phía bắc từ biên độ bắc 38,5 độ (ngày gieo mạ 28/4/2010, ngày cấy lúa 7/6/2010). Kết quả là, như được thể hiện trên Fig. 7, thời gian trổ bông của *Koshihikari* là từ 1/9 đến 2/9, và không thể thu hoạch được cây lúa. Ngược lại, thời gian trổ bông của *Koshihikari eichi* No. 3 là từ 10/8 đến 16/8, và khi đó thu hoạch được thóc. Nói cách khác, trong trường hợp trồng trong vùng nằm xa hơn về phía bắc từ biên độ bắc 38,5 độ, rõ ràng có thể trồng *Koshihikari eichi* No. 3 ngay cả ở Hokkaido vì nó chín sớm hơn *Koshihikari eichi* No. 5 một cách đáng kể. Nhận thấy sự khác biệt về mức độ hiệu quả chín sớm tạo ra từ việc thay thế vùng Hd1 bằng mảnh nhiễm sắc thể thu được từ Habataki tùy thuộc vào vị trí trồng, và hiệu quả chín sớm là lớn hơn trong trường hợp trồng ở vùng nằm xa hơn phía bắc, như vùng xa phía bắc hơn biên độ bắc 38,5 độ, hơn là trong trường hợp trồng trong vùng mà *Koshihikari* thường được trồng (35,5 độ đến biên độ bắc 38,5 độ), đây là những phát hiện được phát hiện lần đầu bởi các tác giả sáng chế.

Như được chỉ ra sau đó ở Ví dụ 1, các tác giả sáng chế tạo ra cây trồng mới mà trong đó chỉ vùng QTS14 và vùng Hd1 trong nhiễm sắc thể của *Koshihikari* được thay bằng mảnh nhiễm sắc thể thu được từ Habataki bằng cách lai chéo *Koshihikari eichi* No. 5 và *Koshihikari eichi* No. 3. Các tác giả sáng chế đặt tên cây trồng mới này là “*Koshihikari kazusa* No. 6”. Fig. 8 là hình vẽ thể hiện bằng sơ đồ hệ gen của *Koshihikari kazusa* No. 6. Khi thời gian trổ bông của *Koshihikari kazusa* No. 6 được xác định, nhận thấy rằng nó chín sớm hơn *Koshihikari eichi* No. 3, và có thể thu hoạch được thóc trên ngay cả trong trường hợp trồng ở Hokkaido nằm xa hơn phía bắc hơn biên độ bắc 38,5 độ. Ngoài ra, khi kiểu hình của *Koshihikari kazusa* No. 6 được so với kiểu hình của *Koshihikari*, các tính trạng không phải là thời gian trổ bông là gần giống như các tính trạng của *Koshihikari* ngay cả trong thử nghiệm thực tế trên đồng.

Koshihikari kazusa No. 6 là cây trồng mới được tạo ra theo phương pháp như được mô tả trong tài liệu patent 2, và được thiết kế và lai sao cho 99% cấu trúc hệ gen của chúng hoặc nhiều hơn là giống như cấu trúc hệ gen của *Koshihikari*. Đây là cây trồng, mà tuy rằng chín đủ sớm sao cho có thể trồng nó ngay cả ở Hokkaido mà cây *Koshihikari* thường không thể trồng được, là cây trồng đặc biệt tốt hơn đó là nó duy trì được hương vị và các tính trạng tốt khác có ở cây *Koshihikari*. Do đó, người nộp đơn đã nộp đơn đăng ký giống cây trồng cho *Koshihikari kazusa* No. 6 theo luật “Seed and Seedlings Law” của Nhật Bản (Law No. 83, 29/5/1998) (ngày nộp đơn đăng ký cây trồng 28/01/2011, số đơn đăng ký cây trồng: 25587).

Có thể trồng cây lúa *Koshihikari kazusa* No. 6 theo các kỹ thuật tương tự với các kỹ thuật được sử dụng cho cây trồng *Koshihikari* ban đầu, và có thể thu hoạch cây lúa bằng cách tự lai chéo hoặc lai chéo do người thực hiện. Ngoài ra, cây lúa *Koshihikari kazusa* No. 5 và các cá thể thế hệ con của chúng có thể được sử dụng làm cá thể cha mẹ để phát triển cây trồng mới theo cùng cách như với cây trồng *Koshihikari* ban đầu. Ví dụ, có thể thử phát triển cây trồng mới bằng cách lai chéo cá thể cây lúa *Koshihikari kazusa* No. 6 với cá thể của cây trồng khác, và sau đó lai chéo ngược lại cá thể thế hệ con thu được với cá thể của cây lúa *Koshihikari kazusa* No. 6.

Ngoài ra, năm typ dấu chuẩn ADN như được mô tả trong Bảng 1 (dấu chuẩn ADN M1-Ac (QTS14), dấu chuẩn ADN M2-Ct (QTS14), dấu chuẩn ADN M3-Ag (QTS14) và dấu chuẩn ADN M4-Gc (QTS14) bao gồm thông tin hệ gen độc nhất của

cây lúa *Koshihikari kazusa* No. 6 và cây lúa *Koshihikari eichi* No. 5. Do đó, có thể phân biệt cây lúa *Koshihikari kazusa* No. 6 và cây lúa *Koshihikari eichi* No. 5 bằng cách sử dụng thích hợp năm typ dấu chuẩn ADN này.

Cụ thể hơn, trong trường hợp thực hiện phân tích hệ gen trên cá thể cây lúa nhằm phân biệt cây trồng, một hoặc nhiều dấu chuẩn ADN được chọn từ nhóm bao gồm dấu chuẩn ADN M1-Ac (QTS14), dấu chuẩn ADN M2-Ct (QTS14), dấu chuẩn ADN M3-Ag (QTS14), dấu chuẩn ADN M4-Gc (QTS14) và dấu chuẩn ADN M5-At (QTS14) được định typ, và kết quả định typ thu được phù hợp với kết quả cho cây lúa *Koshihikari kazusa* No. 6, cá thể cây lúa này có thể được xác định là cây lúa *Koshihikari kazusa* No. 6 hoặc cây lúa *Koshihikari eichi* No. 5.

Ngoài ra, năm typ dấu chuẩn ADN như được mô tả trong Bảng 2 (dấu chuẩn ADN M1-Ct (Hd1), dấu chuẩn ADN M2-Ag (Hd1), dấu chuẩn ADN M3-Cg (Hd1), dấu chuẩn ADN M4-Gc (Hd1) và dấu chuẩn ADN M5-At (Hd1) bao gồm thông tin hệ gen độc nhất của cây lúa *Koshihikari kazusa* No. 6 và *Koshihikari eichi* No. 3. Do đó, có thể phân biệt được cây lúa *Koshihikari kazusa* No. 6 và cây lúa *Koshihikari eichi* No. 3 bằng cách sử dụng thích hợp năm typ dấu chuẩn ADN này.

Cụ thể hơn, trong trường hợp thực hiện phân tích hệ gen trên cá thể cây lúa nhằm phân biệt cây trồng, một hoặc nhiều dấu chuẩn ADN được chọn từ nhóm bao gồm dấu chuẩn ADN M1-Ct (Hd1), dấu chuẩn ADN M2-Ag (Hd1), dấu chuẩn ADN M3-Cg (Hd1), dấu chuẩn ADN M4-Gc (Hd1) và dấu chuẩn ADN M5-At (Hd1) được định typ, và kết quả định typ thu được phù hợp với kết quả cho cây lúa *Koshihikari kazusa* No. 6, thì cá thể cây lúa này có thể được xác định là cây lúa *Koshihikari kazusa* No. 6 hoặc cây lúa *Koshihikari eichi* No. 3.

Ở đây, để phân biệt được cây lúa, có thể sử dụng tất cả các dấu chuẩn ADN M1 đến M5 hoặc có thể sử dụng chỉ một số trong số năm dấu chuẩn ADN. Ví dụ, có thể sử dụng chỉ các dấu chuẩn ADN M1 và M2 đóng vai trò như là điểm tái tổ hợp ở phía trên, có thể sử dụng chỉ các dấu chuẩn ADN M4 và M5 đóng vai trò như là điểm tái tổ hợp ở phía dưới, hoặc có thể sử dụng chỉ các dấu chuẩn ADN M2 và M4. Việc kết hợp một cách thích hợp nhiều dấu chuẩn ADN giúp cho có thể phân biệt cây lúa một cách chính xác hơn.

Dựa trên các kết quả này, các cá thể cây lúa rõ ràng là chín sớm hơn cây trồng

ban đầu do thay thế vùng QTS14 ở nhiễm sắc thể thứ ba của cá thể cây lúa, và cụ thể hơn, ít nhất vùng từ dấu chuẩn ADN M2-Ct (QTS14) đến dấu chuẩn ADN M4-Gc (QTS14) (cụ thể là, vùng tương ứng với vùng từ bazơ số 31.689.690 đến bazơ số 32.298.686 của nhiễm sắc thể thứ ba của cây lúa Nipponbare) bằng mảnh nhiễm sắc thể tạo thành từ vùng tương ứng của cây lúa Habataki. Ngoài ra, vì vùng tương ứng của cây lúa *Koshihikari kazusa* No. 6 và cây lúa *Koshihikari eichi* No. 5 bao gồm mảnh nhiễm sắc thể tạo thành từ vùng tương ứng của cây lúa Habataki, các vùng này cũng có thể được thay bằng mảnh nhiễm sắc thể tạo thành từ vùng tương ứng của cây lúa *Koshihikari kazusa* No. 6 hoặc cây lúa *Koshihikari eichi* No. 5. Cá thể cây lúa đã được đã được chuyển thành dạng chín sớm hơn bằng cách đưa mảnh nhiễm sắc thể tạo thành từ vùng tương ứng của cây lúa Habataki là cây trồng mà trong đó vùng tương ứng có trình tự bazơ là đồng nhất hoặc tương tự với cây lúa *Koshihikari*, và mặc dù cây trồng không chỉ giới hạn ở cây lúa *Koshihikari*, xét đến sự ưa thích của người tiêu thụ và các yếu tố tương tự, tốt hơn nếu cây trồng này là cây lúa *Koshihikari* hoặc cây trồng mới tạo ra bằng cách sử dụng cây lúa *Koshihikari* là cây trồng bố-mẹ.

Ngoài ra, cá thể cây lúa có thể được làm chín sớm hơn cây trồng ban đầu mà không có ảnh hưởng đáng kể đến các tính trạng không phải là thời gian trổ bông bằng cách đưa mảnh nhiễm sắc thể vào nhiễm sắc thể thứ ba của cá thể cây lúa sao cho đầu tận phía trước của mảnh nhiễm sắc thể này thu được từ cây lúa Habataki (hoặc thu được từ cây lúa *Koshihikari kazusa* No. 6) chứa vùng từ dấu chuẩn ADN M2-Ct (QTS14) đến dấu chuẩn ADN M4-Gc (QTS14) có mặt trong vùng nằm sau dấu chuẩn ADN M1-Ac (QTS14) và kéo dài đến dấu chuẩn ADN M2-Ct (QTS14) (cụ thể là, vùng tương ứng với vùng từ bazơ số 31.521.443 đến bazơ số 31.689.690 của nhiễm sắc thể thứ ba của cây lúa Nipponbare), và đầu tận phía sau của mảnh nhiễm sắc thể này có mặt trong vùng kéo dài từ dấu chuẩn ADN M4-Gc (QTS14) đến phía trước dấu chuẩn ADN M5-At (QTS14) (cụ thể là, vùng tương ứng với vùng từ bazơ số 32.298.686 đến bazơ số 32.363.156 của nhiễm sắc thể thứ ba của cây lúa Nipponbare).

Ngoài ra, cá thể cây lúa này có thể được tạo ra thành chín sớm hơn đáng kể đến mức là có thể trồng cá thể cây lúa này ngay cả ở vùng nằm xa hơn phía bắc so với biên độ bắc 38,5 độ bằng cách, ngoài vùng QTS14 của nhiễm sắc thể thứ ba, còn thay thế vùng Hd1 trên nhiễm sắc thể thứ sáu, và cụ thể hơn, ít nhất vùng từ dấu chuẩn ADN

M2-Ag (Hd1) đến dấu chuẩn ADN M4-Gc (Hd1) (cụ thể là, vùng tương ứng với vùng từ bazơ số 8.940.503 đến bazơ số 9.533.057 của nhiễm sắc thể thứ sáu của cây lúa Nipponbare) bằng mảnh nhiễm sắc thể tạo thành từ vùng tương ứng của cây lúa Habataki. Ngoài ra, vì vùng tương ứng của cây lúa *Koshihikari kazusa* No. 6 và cây lúa *Koshihikari eichi* No. 3 bao gồm mảnh nhiễm sắc thể tạo thành từ vùng tương ứng của cây lúa Habataki, nên các vùng này cũng có thể được thay bằng mảnh nhiễm sắc thể tạo thành từ vùng tương ứng của cây lúa *Koshihikari kazusa* No. 6 hoặc cây lúa *Koshihikari eichi* No. 3. Cá thể cây lúa đã được tạo thành dạng chín sớm hơn bằng cách đưa mảnh nhiễm sắc thể tạo thành từ vùng tương ứng của cây lúa Habataki là cây trồng mà trong đó vùng tương ứng có trình tự bazơ đồng nhất hoặc tương tự với cây lúa Koshihikari, và mặc dù cây trồng này không chỉ giới hạn ở cây lúa Koshihikari, xét đến sự ưa thích của người tiêu thụ và các yếu tố tương tự, tốt hơn nếu cây trồng này là cây lúa Koshihikari hoặc cây trồng mới tạo ra bằng cách sử dụng cây trồng này là cây trồng bố-mẹ.

Ngoài ra, cá thể cây lúa này có thể được làm chín sớm hơn cây trồng ban đầu mà không có ảnh hưởng đáng kể đến các tính trạng không phải là thời gian trổ bông bằng cách đưa mảnh nhiễm sắc thể vào nhiễm sắc thể thứ sáu của cá thể cây lúa sao cho đầu tận phía trước của mảnh nhiễm sắc thể thu được từ cây lúa Habataki (hoặc thu được từ cây lúa *Koshihikari kazusa* No. 6) chứa vùng từ dấu chuẩn ADN M2-Ag (Hd1) đến dấu chuẩn ADN M4-Gc (Hd1) có mặt trong vùng nằm sau dấu chuẩn ADN M1-Ct (Hd1) và kéo dài đến dấu chuẩn ADN M2-Ag (Hd1) (cụ thể là, vùng tương ứng với vùng từ bazơ số 8.757.819 đến bazơ số 8.940.503 của nhiễm sắc thể thứ sáu của cây lúa Nipponbare), và đầu tận phía sau của mảnh nhiễm sắc thể này có mặt trong vùng kéo dài từ dấu chuẩn ADN M4-Gc (Hd1) đến phía trước dấu chuẩn ADN M5-At (Hd1) (cụ thể là, vùng tương ứng với vùng từ bazơ số 9.533.057 đến bazơ số 9.777.195 của nhiễm sắc thể thứ sáu của cây lúa Nipponbare).

Ngoài ra, các cá thể cây lúa, bao gồm *Koshihikari eichi* No. 3 và *Koshihikari kazusa* No. 6, mà trong đó vùng Hd1 của nhiễm sắc thể thứ sáu (và cụ thể hơn, ít nhất vùng từ dấu chuẩn ADN M2-Ag (Hd1) đến dấu chuẩn ADN M4-Gc (Hd1)) được thay bằng mảnh nhiễm sắc thể tạo thành từ vùng tương ứng của cây lúa Habataki không chỉ trồng được ở vùng trong đó có thể trồng Koshihikari, mà ngoài ra cũng có thể trồng ở

vùng nằm xa hơn phía bắc hơn biên độ bắc 38,5 độ, và có thể thu hoạch được thóc trên trên các vùng này. Mặc dù còn chịu ảnh hưởng của các điều kiện như nhiệt độ không khí, lượng mưa và các yếu tố tương tự, có thể trồng các cá thể cây lúa này ở vùng kéo dài từ 38,5 độ đến 43,3 độ biên độ bắc.

Dựa trên các nghiên cứu này, gen Hd1 được cho là gen nguyên nhân chịu trách nhiệm cho sự chín sớm trong vùng Hd1. Mặt khác, khi khảo sát gen chứa trong vùng QTS14, nhận thấy rằng vùng mã hoá gen C quy định sắc tố thực vật là nằm trong vùng đó. Gen này đã được báo cáo là chủ yếu tham gia vào việc khống chế thời gian ra hoa của cây (US 7566815). Theo đó, gen nguyên nhân chịu trách nhiệm cho sự chín sớm ở vùng QTS14 được cho là gen C quy định sắc tố thực vật. Ngoài ra, gen Hd1 đã được lập bản đồ ở vùng từ bazơ số 9.335.337 đến bazơ số 9.337.606 của nhiễm sắc thể thứ sáu trong alen của cây lúa Nipponbare, còn gen C quy định sắc tố thực vật đã được lập bản đồ ở vùng này từ bazơ số 31.720.064 đến bazơ số 3.724.043 của nhiễm sắc thể thứ ba.

Nếu như vùng chứa gen nguyên nhân của sự chín sớm ở vùng Hd1 và gen nguyên nhân của sự chín sớm ở vùng QTS14 được thay bằng mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ Habataki, thì sự chín sớm được cho là được tạo ra theo cùng cách như ở cây lúa *Koshihikari kazusa* No. 6 ngay cả trong trường hợp cá thể cây lúa mà trong đó vùng này được thay bằng mảnh nhiễm sắc thể ngắn hơn mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ Habataki được đưa vào *Koshihikari kazusa* No. 6. Do đó, cá thể cây lúa này được cho là có thể tạo ra chín sớm hơn cây trồng ban đầu bằng cách, ví dụ, thay thế vùng tương ứng với vùng từ bazơ số 31.689.691 đến bazơ số 3.724.043 của nhiễm sắc thể thứ ba của cây lúa Nipponbare bằng mảnh nhiễm sắc thể tạo thành từ vùng tương ứng của cây lúa *Koshihikari kazusa* No. 6, cây lúa *Koshihikari eichi* No. 5 hoặc cây lúa Habataki trên nhiễm sắc thể thứ ba của cá thể cây lúa. Ngoài ra, vào thời điểm này, cho rằng cá thể cây lúa này có thể tạo ra chín sớm hơn cây trồng ban đầu, mà không có ảnh hưởng đáng kể đến các tính trạng không phải là thời gian trổ bông, bằng cách đưa mảnh nhiễm sắc thể này vào nhiễm sắc thể thứ ba của cá thể cây lúa sao cho đầu tận phía trước của mảnh nhiễm sắc thể này có mặt trong vùng tương ứng với vùng từ bazơ số 31.689.690 đến bazơ số 31.720.064 của nhiễm sắc thể thứ ba của cây lúa Nipponbare, và đầu tận phía sau của mảnh nhiễm sắc thể này có mặt trong vùng tương

ứng với vùng từ bazơ số 3.724.043 đến bazơ số 32.298.685 của nhiễm sắc thể thứ ba của cây lúa Nipponbare.

Tương tự, cá thể cây lúa này được cho là có thể tạo ra thành dạng chín sớm hơn cây trồng ban đầu bằng cách thay thế vùng tương ứng với vùng từ bazơ số 9.335.337 đến bazơ số 9.337.606 của nhiễm sắc thể thứ sáu của cây lúa Nipponbare bằng mảnh nhiễm sắc thể tạo thành từ vùng tương ứng của cây lúa *Koshihikari kazusa* No. 6, cây lúa *Koshihikari eichi* No. 3 hoặc cây lúa Habataki trên nhiễm sắc thể thứ sáu của cá thể cây lúa. Ngoài ra, vào thời điểm này, cá thể cây lúa này được cho là có thể tạo ra chín sớm hơn cây trồng ban đầu, mà không có ảnh hưởng đáng kể đến các tính trạng không phải là thời gian trổ bông, bằng cách đưa mảnh nhiễm sắc thể này vào nhiễm sắc thể thứ ba của cá thể cây lúa sao cho đầu tận phía trước của mảnh nhiễm sắc thể này có mặt trong vùng tương ứng với vùng từ bazơ số 8.940.504 đến bazơ số 9.335.337 của nhiễm sắc thể thứ sáu của cây lúa Nipponbare, và đầu tận phía sau của mảnh nhiễm sắc thể này có mặt trong vùng tương ứng với vùng từ bazơ số 9.337.606 đến bazơ số 9.533.056 của nhiễm sắc thể thứ ba của cây lúa Nipponbare.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Mặc dù phần sau đây cung cấp giải thích chi tiết hơn sáng chế bằng cách đưa ra các ví dụ, nhưng sáng chế không chỉ giới hạn ở các ví dụ này.

Ví dụ 1

Tạo ra cây trồng mới mà trong đó chỉ vùng QTS14 và vùng Hd1 được thay bằng mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ Habataki trong nhiễm sắc thể của *Koshihikari* bằng cách lai chéo *Koshihikari eichi* No. 5 và *Koshihikari eichi* No. 3.

Cụ thể hơn, *Koshihikari eichi* No. 3 và *Koshihikari eichi* No. 5 được lai chéo, hai cá thể thế hệ con thu được (hạt giống) được trồng tiếp đó là cho phép tự nhân giống (tự lai chéo) để thu được 100 cá thể thế hệ con ở dạng hạt giống. Tất cả 100 hạt giống này được trồng, các dấu chuẩn ADN trong mỗi cá thể thế hệ con này được khảo sát, và chọn lọc từng cá thể được trồng này mà trong đó cả hai dấu chuẩn ADN M3-Cg (Hd1) và dấu chuẩn ADN M3-At (QTS14) là vùng nhiễm sắc thể đồng nhất của alen có nguồn gốc từ Habataki. Các tác giả sáng chế đặt tên cây trồng mới này “*Koshihikari kazusa* No. 5”.

Thời gian trổ bông của *Koshihikari kazusa* No. 6 được xác định trên cánh đồng nằm ở quận Chiba (ngày gieo mạ 6/5/2010, ngày cấy lúa 1/6/2010). Các kết quả đo này được thể hiện ở Fig. 9 cùng với các kết quả cho *Koshihikari*, *Koshihikari eichi* No. 5 và *Koshihikari eichi* No. 3. Trong khi thời gian trổ bông của *Koshihikari* là từ 5 tháng 8 đến 8 tháng 8 và thời gian trổ bông của *Koshihikari eichi* No. 5 và *Koshihikari eichi* No. 3 là từ 24 tháng bảy đến 26 tháng bảy, thời gian trổ bông của *Koshihikari kazusa* No. 6 là từ 18 tháng bảy đến 23 tháng bảy. Dựa trên các kết quả này, trong trường hợp trồng ở quận Chiba, *Koshihikari kazusa* No. 6 rõ ràng là chín sớm hơn *Koshihikari eichi* No. 3 và *Koshihikari eichi* No. 5.

Ngoài ra, xác định thời gian trổ bông của *Koshihikari kazusa* No. 6 trên cánh đồng nằm ở Hokkaido (43,3 độ biên độ bắc) (ngày gieo mạ 28/4/2010, ngày cấy lúa 7/6/2010). Các kết quả đo được thể hiện ở Fig. 10 cùng với các kết quả cho *Koshihikari*, *Koshihikari eichi* No. 5 và *Koshihikari eichi* No. 3. Trong khi thời gian trổ bông của *Koshihikari* là từ 1/9 đến 2/9, thời gian trổ bông của *Koshihikari eichi* No. 5 là từ 21/8 đến 22/8, và thời gian trổ bông của *Koshihikari eichi* No. 3 là từ 10/8 đến 16/8, thời gian trổ bông của *Koshihikari kazusa* No. 6 là từ 7/8 đến 9/8. Ngoài ra, trong khi cây *Koshihikari* và *Koshihikari eichi* No. 5 không chín, có thể thu hoạch *Koshihikari kazusa* No. 6 tương tự như với *Koshihikari eichi* No. 3. Dựa trên các kết quả này, rõ ràng là có thể trồng *Koshihikari kazusa* No. 6 ngay cả ở Hokkaido nằm xa hơn về phía bắc từ biên độ bắc 38,5 độ.

Tiến hành nghiên cứu so sánh giữa các tính trạng của *Koshihikari kazusa* No. 6 và *Koshihikari* (được thực hiện trên cánh đồng nằm ở quận Chiba, năm 2009). Các tính trạng được khảo nghiệm tuân theo khảo nghiệm các đặc tính cho đơn đăng ký cây trồng dựa trên điều Article 5, khoản 1 của “Seed and Seedlings Law” của Nhật Bản (Law No. 83, 1998). Kết quả của nghiên cứu này được trình bày ở các Bảng từ 3 đến 6. Kết quả là, *Koshihikari kazusa* No. 6 chín sớm hơn 2 tuần so với *Koshihikari* về cả thời gian trổ bông và thời gian chín. Ngoài ra, mặc dù chiều dài cọng, chiều dài của trục chính của bông và chiều dài thân chính của *Koshihikari kazusa* No. 6 là hơi ngắn hơn các thông số của *Koshihikari* và số bông và số hạt trên thân chính cũng ít hơn, các tính trạng khác về cơ bản là giống như các tính trạng của *Koshihikari*.

Bảng 3

Giai đoạn	Tình trạng	Giá trị đặc tính cây trồng (So sánh với cây trồng chuẩn)									Chú giải (các giá trị đo được)	Các đặc tính của cây trồng đối chứng	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9		Koshihikari	Nipponbare
40	Lá: Sắc tố anthocyanin	Không có								Có màu	1	1	1
	Lá: Phân bố sắc tố anthocyanin	Chỉ ở phần đầu	Chỉ ở phần cạnh	Có đốm nhỏ	Toàn bộ lá cây						1	1	1
	Lá: Sắc tố anthocyanin ở lông cuối phiến lá	Không có								Có màu	1	1	1
60	Lá dạng cờ: Hướng của phiến lá (ban đầu)	Hướng thẳng góc		Hướng rù		Nằm ngang		Xoay ngược			3	3	3
90	Lá dạng cờ: Hướng của phiến lá (về sau)	Hướng thẳng góc		Hướng rù	—	Nằm ngang		Xoay ngược			4	4	4
55	Thời gian trở bông (trở bông 50%)	Rất sớm		Sớm		Trung bình		Muộn			1 24 tháng bảy	3 7 tháng 8	4 19 tháng 8
65	Mây ngoài: Sắc tố anthocyanin ở đỉnh (ban đầu)	Không có hoặc rất ít		Nhạt		Trung bình		Đậm		Rất đậm	1	1	1

Bảng 4

Giai đoạn	Tình trạng	Giá trị đặc tính cây trồng (So sánh với Cây trồng chuẩn)									Chú giải (các giá trị đo được)	Các đặc tính của cây trồng đối chứng	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9		Koshihikari	Nipponbare
70	Cộng: chiều dài (không kể bông, không kể cây lúa nước)	Rất ngắn		Ngắn	— —	Trung bình		Dài		Rất dài	4 72,9 m	6 92,1 cm	4 74,7 cm
	Cộng: sắc tố anthocyanin ở đốt	<u>Không</u> có								Có màu	1	1	1
72-90	Ngon cây: Chiều dài trục chính			<u>Ngắn</u>		Trung bình		Dài			3 12,1 cm	4 14,4 cm	4 14,2 cm
70	Ngon cây: số lượng			ít		Trung bình		Nhiều			3 6,3	4 8,3	4 8,8
70-80	Ngon cây: Phân bố râu	<u>Chỉ ở phần đầu</u>		Nửa trên		Toàn bộ					1	1	1
60-80	Bông con: Amt. của lông cuối phiến lá ở mày ngoài	Không có hoặc rất ít		ít		Trung bình		Nhiều		Rất nhiều	Giống như Koshihikari		
80-90	Bông con: Màu của đầu mày ngoài	<u>Màu trắng</u>	Màu vàng	Màu nâu	Màu đỏ	Màu tím	Màu đen				1	1	1

Giai đoạn	Tình trạng	Giá trị đặc tính cây trồng (So sánh với Cây trồng chuẩn)									Chủ giải (các giá trị đo được)	Các đặc tính của cây trồng đối chứng	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9		Koshihikari	Nipponbare
	(màu của đầu nhỏ)												
90	Ngon cây: Uốn cong của trục chính	Hướng thẳng góc		Huấn g nghie ng		<u>Độc</u> <u>xuống</u>		Uốn cong			5	5	5
	Ngon cây: hình dạng	Dạng lưỡi trích	<u>Hình</u> <u>thoi</u>	Hình que	Hình cái chổi	Phình ra					2	2	2
	Thời gian chín	Rất sớm		Sớm	—	Trung bình		Muộn		Rất muộn	4 9/2	5 9/17	6 9/29
	Màu của máy ngoài	<u>Màu</u> <u>vàng-</u> <u>màu</u> <u>trắng</u>	Màu vàng	Màu nâu	màu tím hơi đỏ	Màu tím	Màu đen				1	1	1
	Màu của máy ngoài: Kiểu	<u>Không</u> <u>có</u>	Rãnh màu vàng	ảnh màu nâu	đốm màu tím	ảnh màu tím					1	1	1

Bảng 5

Giai đoạn	Tính trạng	Giá trị đặc tính cây trồng (So sánh với cây trồng chuẩn)									Chú giải	Các đặc tính của cây trồng đối chứng				
		1	2	3	4	5	6	7	8	9		Koshihikari	Nipponbare			
92	Mày ngoài: Sắc tố anthocyanin ở đỉnh	Không có hoặc rất nhạt		Nhạt		Trung bình		Sẫm màu		Rất sẫm màu	1	1	1			
	Mày: Chiều dài			Ngắn		Trung bình		Dài			3	1,92 mm	3			
	Mày: Có màu	Màu vàng-màu trắng	Màu vàng	Màu đỏ	Màu tím						1	1	1			
	Vỏ: trọng lượng 1000 hạt (chín)			Nhỏ		Trung bình	—	Lớn			6	23,3 g	6	23,1 g	7	26,4 g
	Vỏ: Phản ứng phenol của mày ngoài	Không có		Nhạt		Trung bình		Sẫm màu		Phản ứng lại	1	1	1	1	1	1
	Hạt thóc không xay : Chiều dài			Ngắn		Trung bình		Dài			5	5,3 mm	5	5,2 mm	6	5,4 mm
	Hạt thóc không xay : Chiều rộng			Hẹp		Trung bình		Dày			5	2,9 mm	5	2,9 mm	5	2,9 mm
	Hạt thóc không xay :	Tròn	Gần tròn	Dạng nửa	Hình thoi	Dài hình					2	1,8 mm	2	1,8 mm	2	1,9 mm

Giai đoạn	Tình trạng	Giá trị đặc tính cây trồng (So sánh với cây trồng chuẩn)									Chú giải (các giá trị đo được)	Các đặc tính của cây trồng đối chứng	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9		Koshihikari	Nipponbare
	hình dạng (từ mặt bên)			hình thoi		thoi							
	Hạt thóc không xay : Có màu	Màu trắng	Nhạt màu nâu	đốm màu nâu	Màu nâu sẫm	Màu đỏ nhạt	Màu đỏ	đốm màu tím	Vio-let	Sẫm màu tím/đen	2	2	2
	Hạt thóc không xay : Hương thơm	Không có hoặc rất kém	Kém	Mạnh							1	1	1

Bảng 6

Giai đoạn	Tình trạng	Giá trị đặc tính cây trồng (So sánh với cây trồng chuẩn)									Chú giải (các giá trị đo được)	Các đặc tính của cây trồng đối chứng	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9		Koshihikari	Nipponbare
GIII	Số hạt trên thân chính	Rất ít		ít	—	Trung bình		Nhiều		Rất nhiều	4 127	5 151	4 123
	Chiều dài giống thân chính 1	Rất ngắn		Ngắn		Trung bình		Dài		Rất dài	7 30,2 cm	8 36,6 cm	8 36,1 cm
	Chiều dài giống thân chính 2	Rất ngắn		Ngắn		Trung bình		Dài		Rất dài	5 17,5 cm	6 22,5 cm	5 17,9 cm
	Chiều dài giống thân chính 3	Rất ngắn		Ngắn		Trung bình		Dài		Rất dài	5 14,4 cm	6 18,0 cm	4 11,1 cm
	Chiều dài giống thân chính 4	Rất ngắn		Ngắn		Trung bình	—	Dài		Rất dài	6 7,4 cm	7 10,5 cm	5 7,5 cm
	Chiều dài giống thân chính 5	Rất ngắn		Ngắn	—	Trung bình		Dài		Rất dài	4 7,4 cm	4 3,9 cm	3 2,0 cm
	Chiều dài giống thân chính 6	Rất ngắn		Ngắn		Trung bình		Dài		Rất dài	--	--	--
	Chiều dày vỏ thân chính	Rất mỏng		Mỏng		Trung bình		Dày		Rất dày	5 2,23 mm	5 2,24 mm	5 2,24 mm
	Chiều dài vỏ thân chính	Rất ngắn		Ngắn		Trung bình		Dài		Rất dài	3 7,35 mm	3 7,39 mm	3 7,69 mm
	Chiều rộng vỏ thân chính	Rất hẹp		Hẹp		Trung bình		Rộng		Rất rộng	5 3,33 mm	5 3,29 mm	5 3,43 mm

Ứng dụng công nghiệp

Vì cây trồng mới theo sáng chế là *Koshihikari kazusa* No. 5 đã được phát triển có chất lượng và năng suất tương tự như Koshihikari chỉ khác là chín sớm hơn Koshihikari, cây này có thể được sử dụng đặc biệt là trong lĩnh vực nông nghiệp. Ngoài ra, theo phương pháp theo sáng chế làm cho các cá thể cây lúa chín sớm hơn, vì các cá thể cây lúa có thể được làm chín sớm hơn cây trồng ban đầu, nên phương pháp có thể được sử dụng đặc biệt là trong lĩnh vực phương pháp lai giống thực vật.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Cây lúa, trong đó trong nhiễm sắc thể của cây lúa Koshihikari này chứa:

vùng tương ứng với vùng từ bazơ số 31.689.690 đến bazơ số 32.298.686 của nhiễm sắc thể thứ ba của cây lúa Nipponbare được thay đồng nhất bằng mảnh nhiễm sắc thể tạo thành từ vùng tương ứng của cây lúa Habataki trên nhiễm sắc thể thứ ba của cá thể cây lúa, và đầu tận phía trước của mảnh nhiễm sắc thể này có mặt trong vùng tương ứng với vùng từ bazơ số 31.521.443 đến bazơ số 31.689.690 của nhiễm sắc thể thứ ba của cây lúa Nipponbare và đầu tận phía sau của mảnh nhiễm sắc thể này có mặt trong vùng tương ứng với vùng từ bazơ số 32.298.686 đến bazơ số 32.363.156 của nhiễm sắc thể thứ ba của cây lúa Nipponbare, và

vùng tương ứng với vùng từ bazơ số 8.940.503 đến bazơ số 9.533.057 của nhiễm sắc thể thứ sáu của cây lúa Nipponbare được thay đồng nhất bằng mảnh nhiễm sắc thể tạo thành từ vùng tương ứng của cây lúa Habataki trên nhiễm sắc thể thứ sáu của cá thể cây lúa, và đầu tận phía trước của mảnh nhiễm sắc thể này có mặt trong vùng tương ứng với vùng từ bazơ số 8.757.819 đến bazơ số 8.940.503 của nhiễm sắc thể thứ sáu của cây lúa Nipponbare và đầu tận phía sau của mảnh nhiễm sắc thể này có mặt trong vùng tương ứng với vùng từ bazơ số 9.533.057 đến bazơ số 9.777.195 của nhiễm sắc thể thứ sáu của cây lúa Nipponbare.

2. Cá thể thế hệ con thu được bằng cách lai chéo hai cá thể được chọn từ nhóm bao gồm cá thể cây lúa theo điểm 1 và cá thể thế hệ con của cá thể cây lúa theo điểm 1.

3. Phương pháp phân biệt cây lúa bao gồm bước xác định xem cá thể cây lúa cụ thể có phải là cây trồng đặc thù hay không, trong đó:

SNP (đa hình đơn nucleotit) tương ứng với SNP thứ 31.521.442 trên nhiễm sắc thể thứ ba của cây lúa Nipponbare (A ở cây lúa Koshihikari và C ở cây lúa Habataki) được chọn làm dấu chuẩn ADN M1,

SNP tương ứng với SNP thứ 31.689.690 của nhiễm sắc thể thứ ba của cây lúa Nipponbare (C ở cây lúa Koshihikari và T ở cây lúa Habataki) được chọn làm dấu chuẩn ADN M2,

SNP tương ứng với SNP thứ 3.208.924 của nhiễm sắc thể thứ ba của cây lúa Nipponbare (A ở cây lúa Koshihikari và G ở cây lúa Habataki) được chọn làm dấu

chuẩn ADN M3,

SNP tương ứng với SNP thứ 32.298.686 của nhiễm sắc thể thứ ba của cây lúa Nipponbare (G ở cây lúa Koshihikari và C ở cây lúa Habataki) được chọn làm dấu chuẩn ADN M4,

SNP tương ứng với SNP thứ 32.363.157 của nhiễm sắc thể thứ ba của cây lúa Nipponbare (A ở cây lúa Koshihikari và T ở cây lúa Habataki) được chọn làm dấu chuẩn ADN M5, và

các dấu chuẩn ADN M1 đến M5 được định typ bằng cách phân tích hệ gen của cá thể cây lúa, và

trong trường hợp kết quả định typ thu được sao cho dấu chuẩn ADN M1 là A (adenin), dấu chuẩn ADN M2 là T (thymin), dấu chuẩn ADN M3 là guanin (G), dấu chuẩn ADN M4 là C (xytosin) và dấu chuẩn ADN M5 là A, cá thể cây lúa này được nhận diện là cây lúa *Koshihikari kazusa* No. 6 hoặc cây lúa *Koshihikari eichi* No. 5.

4. Phương pháp phân biệt cây lúa bao gồm bước xác định xem cá thể cây lúa cụ thể có phải là cây trồng đặc thù hay không, trong đó:

SNP tương ứng với SNP thứ 8.757.818 của nhiễm sắc thể thứ sáu của cây lúa Nipponbare (C ở cây lúa Koshihikari và T ở cây lúa Habataki) được chọn làm dấu chuẩn ADN M1,

SNP tương ứng với SNP thứ 8.940.503 của nhiễm sắc thể thứ sáu của cây lúa Nipponbare (A ở cây lúa Koshihikari và G ở cây lúa Habataki) được chọn làm dấu chuẩn ADN M2,

SNP tương ứng với SNP thứ 9.325.062 của nhiễm sắc thể thứ sáu của cây lúa Nipponbare (C ở cây lúa Koshihikari và G ở cây lúa Habataki) được chọn làm dấu chuẩn ADN M3,

SNP tương ứng với SNP thứ 9.533.057 của nhiễm sắc thể thứ sáu của cây lúa Nipponbare (G ở cây lúa Koshihikari và C ở cây lúa Habataki) được chọn làm dấu chuẩn ADN M4,

SNP tương ứng với SNP thứ 9.777.196 của nhiễm sắc thể thứ sáu của cây lúa Nipponbare (A ở cây lúa Koshihikari và T ở cây lúa Habataki) được chọn làm dấu chuẩn ADN M5, và

các dấu chuẩn ADN M1 đến M5 được định typ bằng cách phân tích hệ gen của cá thể cây lúa, và

trong trường hợp kết quả định typ thu được sao cho dấu chuẩn ADN M1 là C (xytosin), dấu chuẩn ADN M2 là G (guanin), dấu chuẩn ADN M3 là guanin (G), dấu chuẩn ADN M4 là C và dấu chuẩn ADN M5 là A (adenin), cá thể cây lúa này được nhận diện là cây lúa *Koshihikari kazusa* No. 6 hoặc cây lúa *Koshihikari eichi* No. 3.

5. Phương pháp làm cho cá thể cây lúa chín sớm hơn, trong đó phương pháp này bao gồm bước thay thế đồng nhất vùng tương ứng với vùng từ bazơ số 31.720.064 đến bazơ số 3.724.043 của nhiễm sắc thể thứ ba của cây lúa Nipponbare bằng mảnh nhiễm sắc thể tạo thành từ vùng tương ứng của cây lúa theo điểm 1 nằm trên nhiễm sắc thể thứ ba của cá thể cây lúa này.

6. Phương pháp làm cho cá thể cây lúa chín sớm hơn theo điểm 5, trong đó mảnh nhiễm sắc thể này được thay thế sao cho đầu tận phía trước của mảnh nhiễm sắc thể này có mặt trong vùng tương ứng với vùng từ bazơ số 31.689.691 đến bazơ số 31.720.064 của nhiễm sắc thể thứ ba của cây lúa Nipponbare, và đầu tận phía sau của mảnh nhiễm sắc thể này có mặt trong vùng tương ứng với vùng từ bazơ số 3.724.043 đến bazơ số 32.298.685 của nhiễm sắc thể thứ ba của cây lúa Nipponbare.

7. Phương pháp làm cho cá thể cây lúa chín sớm hơn bao gồm bước thay thế đồng nhất vùng tương ứng với vùng từ bazơ số 31.689.690 đến bazơ số 32.298.686 của nhiễm sắc thể thứ ba của cây lúa Nipponbare bằng mảnh nhiễm sắc thể tạo thành từ vùng tương ứng của cây lúa theo điểm 1 hoặc cây lúa Habataki nằm trên nhiễm sắc thể thứ ba của cá thể cây lúa này.

8. Phương pháp làm cho cá thể cây lúa chín sớm hơn theo điểm 7, trong đó mảnh nhiễm sắc thể này được thay thế sao cho đầu tận phía trước của mảnh nhiễm sắc thể này có mặt trong vùng tương ứng với vùng từ bazơ số 31.521.443 đến bazơ số 31.689.690 của nhiễm sắc thể thứ ba của cây lúa Nipponbare, và đầu tận phía sau của mảnh nhiễm sắc thể này có mặt trong vùng tương ứng với vùng từ bazơ số 32.298.686 đến bazơ số 32.363.156 của nhiễm sắc thể thứ ba của cây lúa Nipponbare.

9. Cây lúa được tạo ra bằng phương pháp làm cho cá thể cây lúa chín sớm hơn theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 5 đến 8.

10. Cá thể thế hệ con thu được bằng cách lai chéo hai cá thể được chọn từ nhóm bao gồm cá thể cây lúa theo điểm 9 và cá thể thế hệ con của cá thể cây lúa theo điểm 9.

11. Phương pháp trồng cây lúa bao gồm việc trồng, ở vùng nằm xa hơn phía bắc từ biên độ bắc 38,5 độ, một hoặc nhiều loại cá thể cây lúa được chọn từ nhóm bao gồm cá thể cây lúa mà trong đó vùng tương ứng với vùng từ bazơ số 8.940.503 đến bazơ số 9.533.057 của nhiễm sắc thể thứ sáu của cây lúa Nipponbare được thay đồng nhất bằng mảnh nhiễm sắc thể tạo thành từ vùng tương ứng của cây lúa theo điểm 1 hoặc cây lúa Habataki nằm trên nhiễm sắc thể thứ sáu của cá thể cây lúa này, và cá thể cây lúa của cây lúa theo điểm 1.

FIG. 1

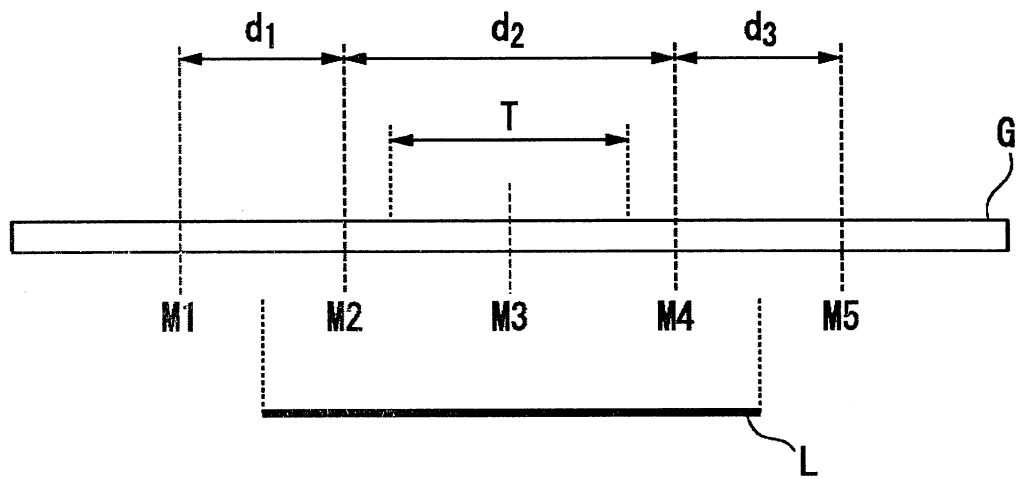


FIG. 2

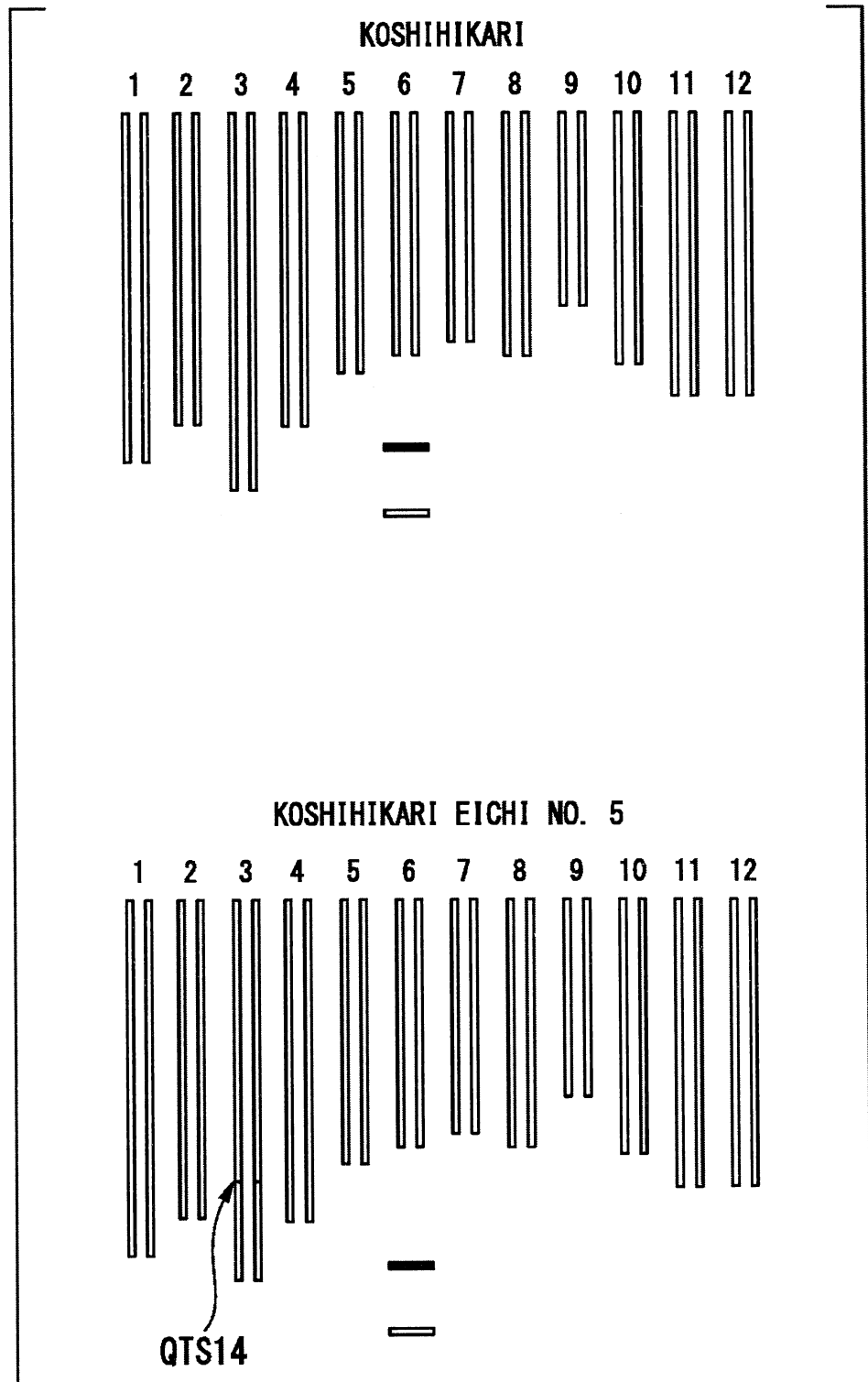


FIG. 3

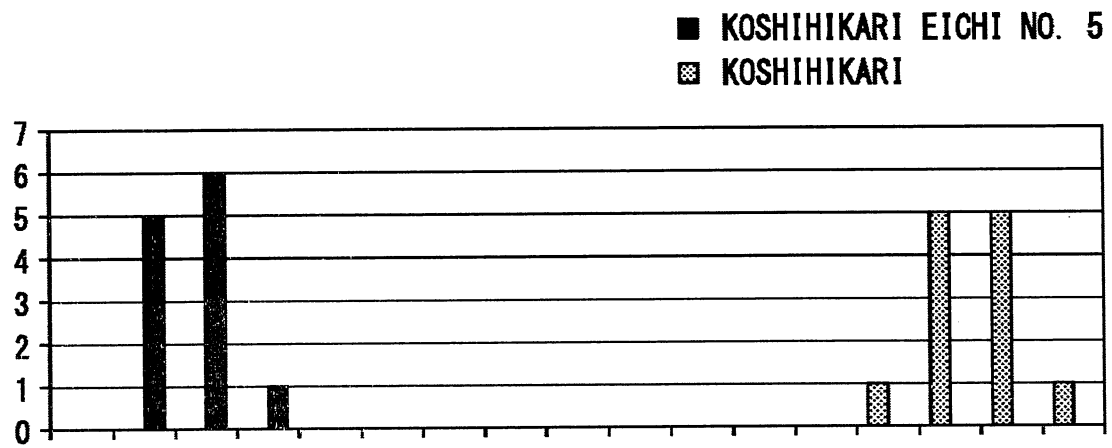


FIG. 4

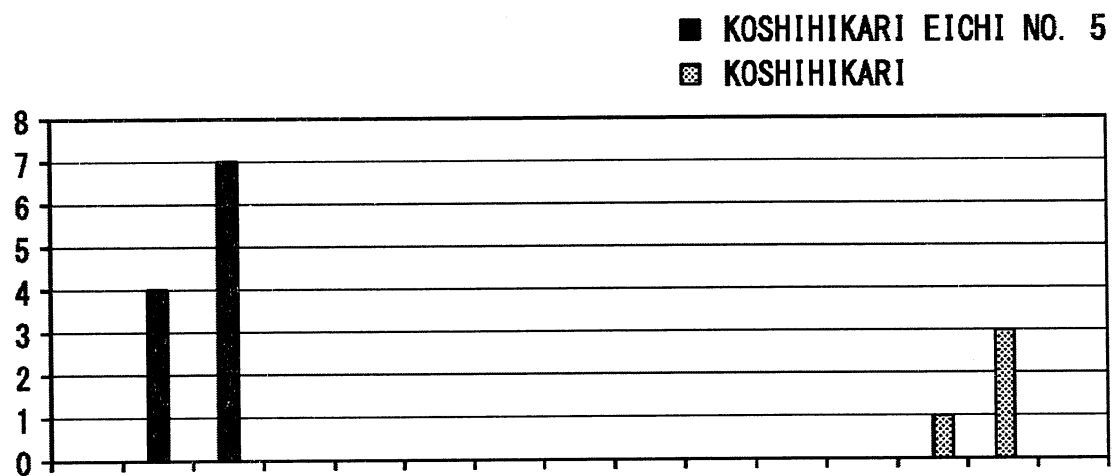


FIG. 5
KOSHIHIKARI EICHI NO. 3

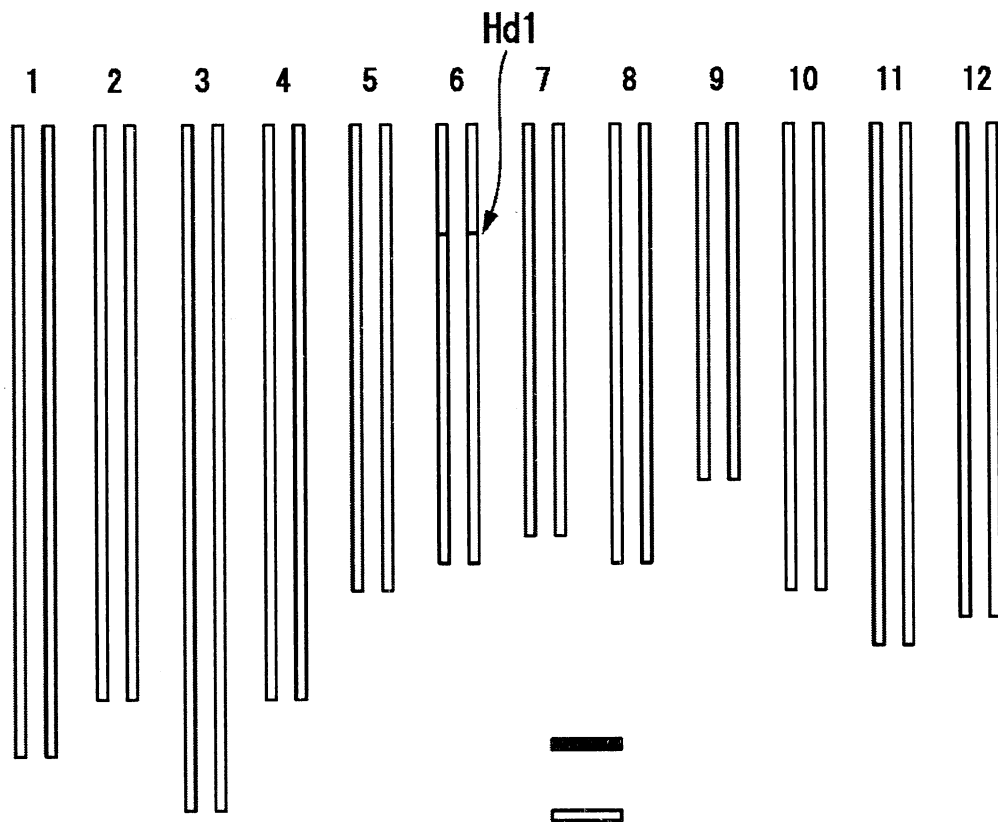


FIG. 6

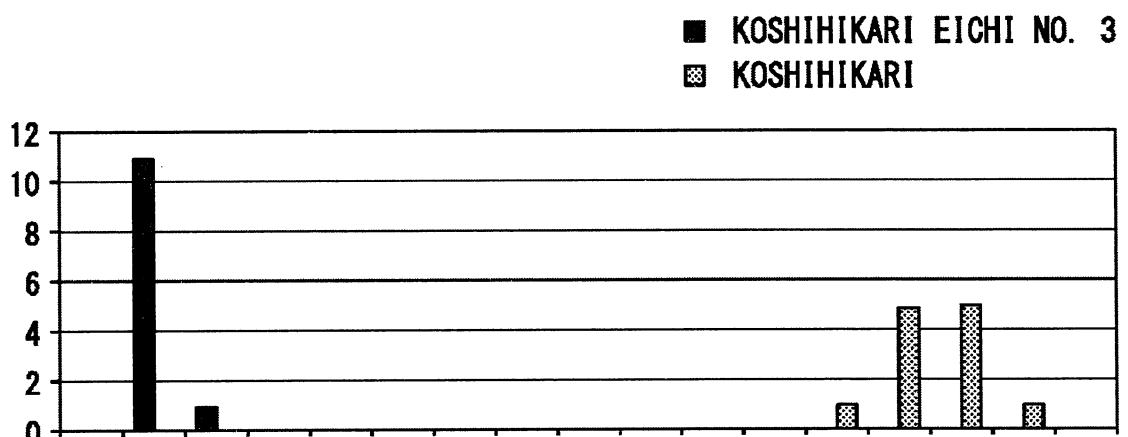


FIG. 7

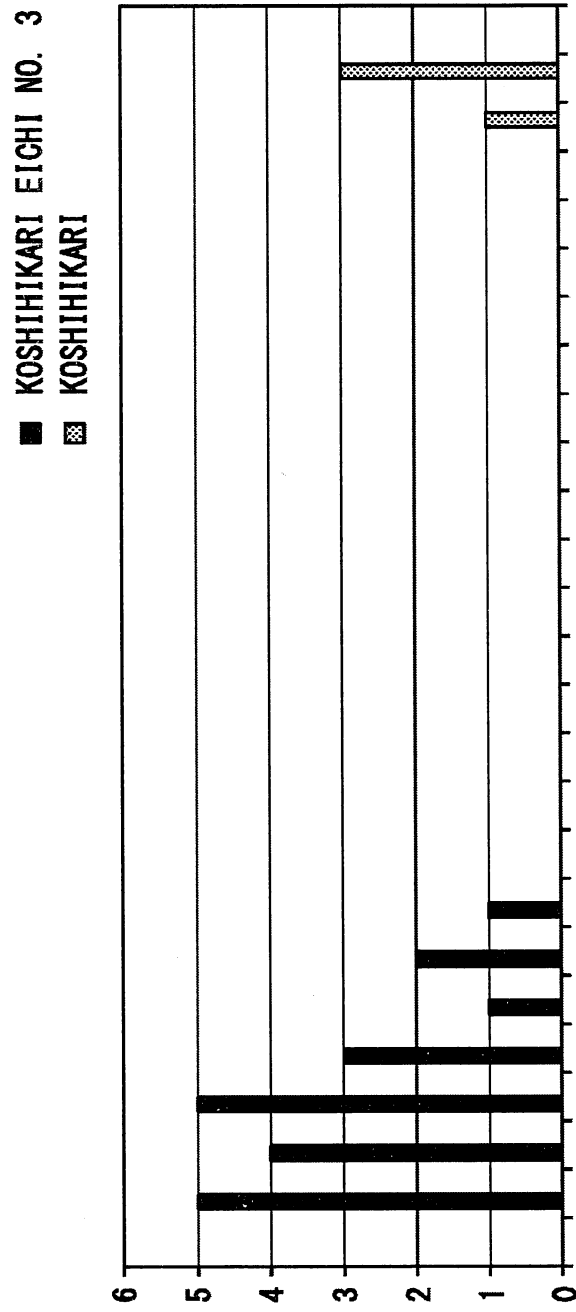


FIG. 8

KOSHIHIKARI KAZUSA NO. 6

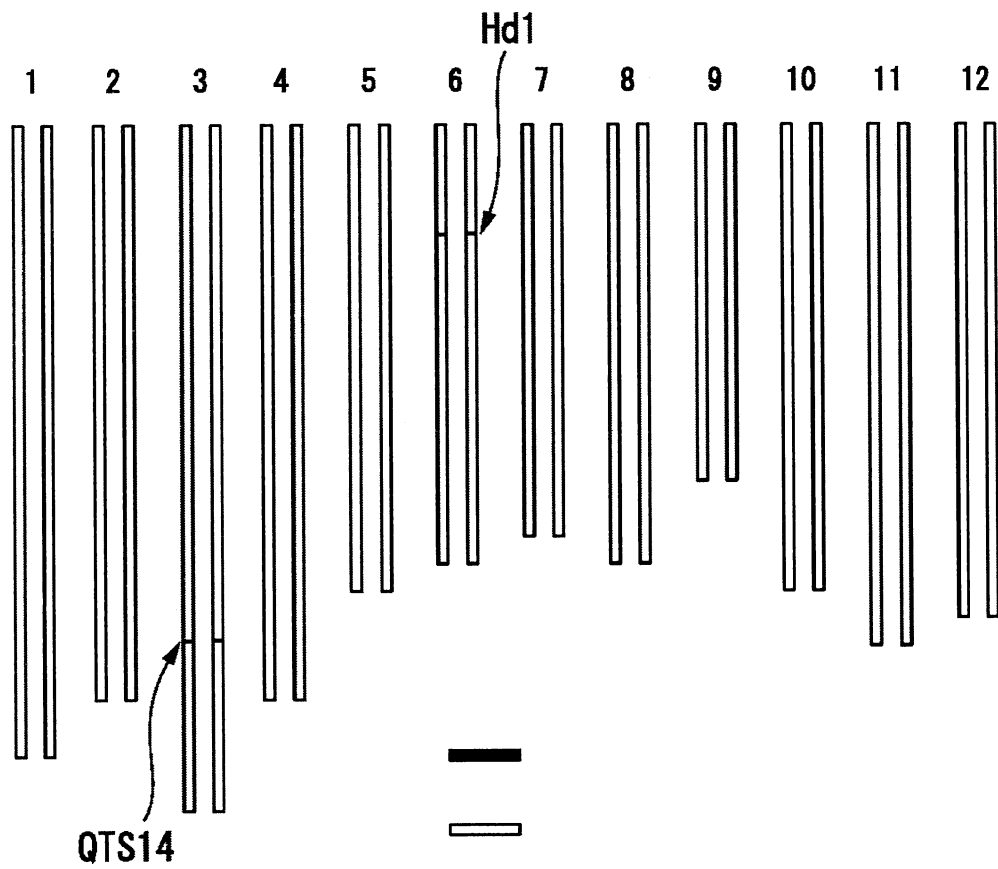


FIG. 9

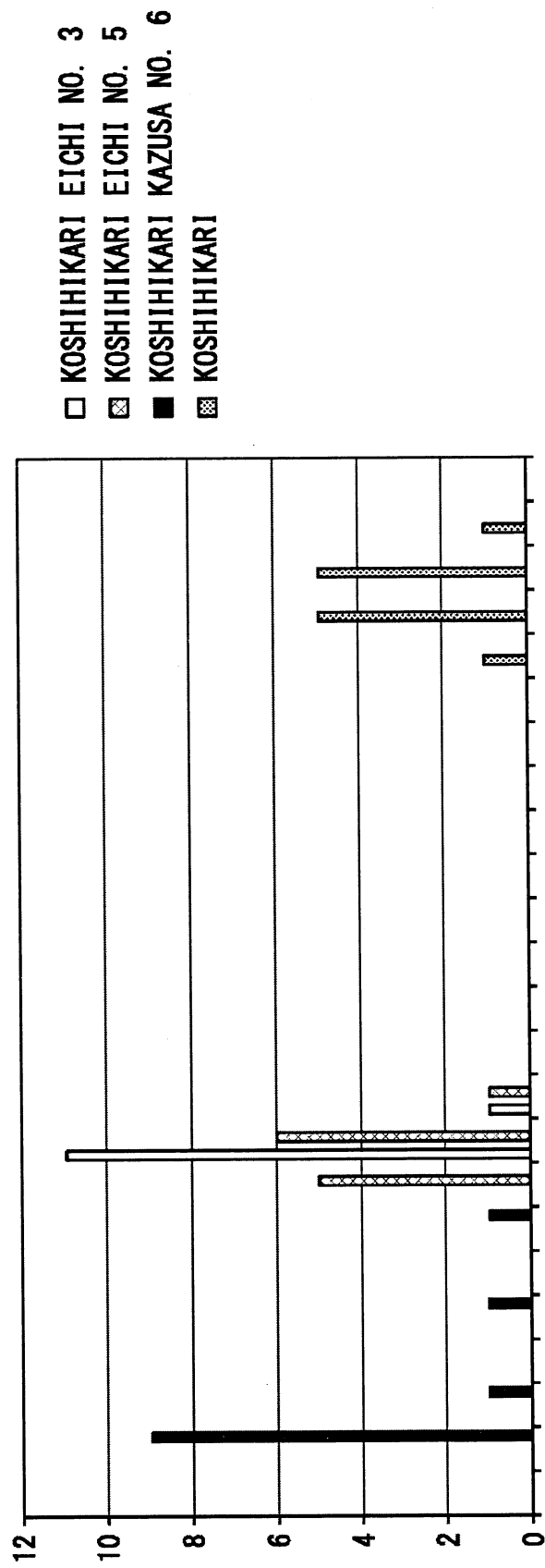
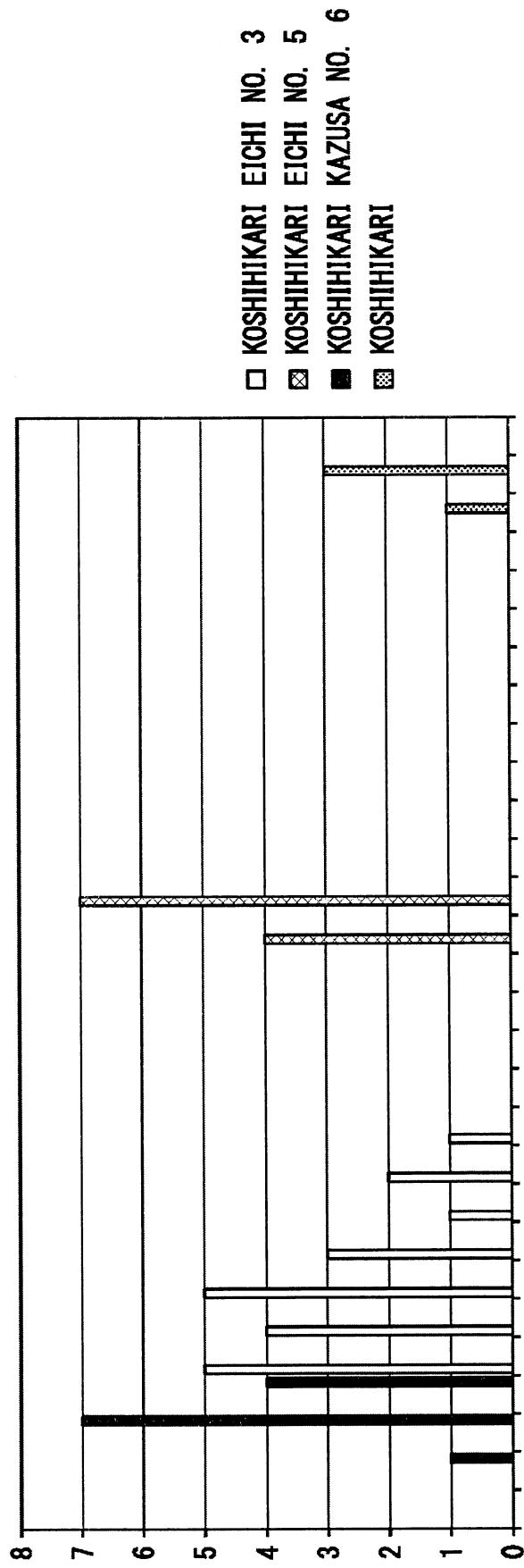


FIG. 10



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Honda Motor Co., Ltd.

<120> Cây lúa chuyển gen, phương pháp phân biệt cây lúa và phương pháp làm cho cá thể cây lúa chín sớm

<130> OSP-48664

<160> 30

<170> PatentIn phiên bản 3.1

<210> 1

<211> 20

<212> ADN

<213> Oryza sativa

<220>

<223> Dấu chuẩn ADN: Đoạn mỗi xuôi của M1-Ac (QTS14)

<400> 1

cattcagttc tctcaactgc

20

<210> 2

<211> 22

<212> ADN

<213> Oryza sativa

<220>

<223> Dấu chuẩn ADN: Đoạn mỗi ngược của M1-Ac (QTS14)

<400> 2

gagatttttcg aaggttcttc gc

22

<210> 3

<211> 19

<212> ADN

<213> Oryza sativa

<220>

<223> Dấu chuẩn ADN: Đoạn mỗi SNP của M1-Ac (QTS14)

<400> 3

ttcctaaccc agctgtgat

19

<210> 4

<211> 20

<212> ADN

<213> Oryza sativa

<220>

<223> Dấu chuẩn ADN: Đoạn mỗi xuôi của M2-Ct (QTS14)

<400> 4

aaaacagcca cacctgatcg

20

<210> 5

<211> 20

<212> ADN

<213> Oryza sativa

<220>

<223> Dấu chuẩn ADN: Đoạn mỗi ngược của M2-Ct (QTS14)
 <400> 5
 aacatcctct gcttcctcag 20

<210> 6
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Oryza sativa
 <220>
 <223> Dấu chuẩn ADN: Đoạn mỗi SNP của M2-Ct (QTS14)
 <400> 6
 tatcgctagc ctccatttct 20

<210> 7
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Oryza sativa
 <220>
 <223> Dấu chuẩn ADN: Đoạn mỗi xuôi của M3-Ag (QTS14)
 <400> 7
 gaatggaatg agccatactc c 21

<210> 8
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Oryza sativa
 <220>
 <223> Dấu chuẩn ADN: Đoạn mỗi ngược của M3-Ag (QTS14)
 <400> 8
 ctgcatctac acgctataacc 20

<210> 9
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Oryza sativa
 <220>
 <223> Dấu chuẩn ADN: Đoạn mỗi SNP của M3-Ag (QTS14)
 <400> 9
 gtgatggaaa agttggaagt ttgaa 25

<210> 10
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Oryza sativa
 <220>
 <223> Dấu chuẩn ADN: Đoạn mỗi xuôi của M4-Gc (QTS14)
 <400> 10
 tccatccgat gcagatatcc 20

<210> 11
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Oryza sativa

<220>
 <223> Dấu chuẩn ADN: Đoạn mỗi ngược của M4-Gc (QTS14)
 <400> 11
 gtagttatgg tacactcgca g 21

<210> 12
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Oryza sativa
 <220>
 <223> Dấu chuẩn ADN: Đoạn mỗi SNP của M4-Gc (QTS14)
 <400> 12
 gctggggaaa gtgatttcac c 21

<210> 13
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Oryza sativa
 <220>
 <223> Dấu chuẩn ADN: Đoạn mỗi xuôi của M5-At (QTS14)
 <400> 13
 acgtggggta cagcactttg a 21

<210> 14
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Oryza sativa
 <220>
 <223> Dấu chuẩn ADN: Đoạn mỗi ngược của M5-At (QTS14)
 <400> 14
 gtcaggaaag ttggaagagg 20

<210> 15
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Oryza sativa
 <220>
 <223> Dấu chuẩn ADN: Đoạn mỗi SNP của M5-At (QTS14)
 <400> 15
 gatctctgac aatatcaaga agct 24

<210> 16
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Oryza sativa
 <220>
 <223> Dấu chuẩn ADN: Đoạn mỗi xuôi của M1-Ct (Hd1)
 <400> 16
 gcgaaaagat gaggatgtac ac 22

<210> 17
 <211> 20
 <212> ADN

<213> Oryza sativa
 <220>
 <223> Dấu chuẩn ADN: Đoạn mỗi ngược của M1-Ct (Hd1)
 <400> 17
 ccgtaggcct ttgtcaagtg 20

<210> 18
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Oryza sativa
 <220>
 <223> Dấu chuẩn ADN: Đoạn mỗi SNP của M1-Ct (Hd1)
 <400> 18
 ctttaatggg ggcttatgtc 20

<210> 19
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Oryza sativa
 <220>
 <223> Dấu chuẩn ADN: Đoạn mỗi xuôi của M2-Ag (Hd1)
 <400> 19
 gaccttcac tgagatgtga c 21

<210> 20
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Oryza sativa
 <220>
 <223> Dấu chuẩn ADN: Đoạn mỗi ngược của M2-Ag (Hd1)
 <400> 20
 ggaaagtga gcagcttctc 20

<210> 21
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Oryza sativa
 <220>
 <223> Dấu chuẩn ADN: Đoạn mỗi SNP của M2-Ag (Hd1)
 <400> 21
 cagcaagctc ctgtccatat tt 22

<210> 22
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Oryza sativa
 <220>
 <223> Dấu chuẩn ADN: Đoạn mỗi xuôi của M3-Cg (Hd1)
 <400> 22
 aggcccttgt actggtac 18

<210> 23
 <211> 21

<212> ADN
 <213> Oryza sativa
 <220>
 <223> Dấu chuẩn ADN: Đoạn mỗi ngược của M3-Cg (Hd1)
 <400> 23
 gtacacaata gttggtgcac c 21

<210> 24
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Oryza sativa
 <220>
 <223> Dấu chuẩn ADN: Đoạn mỗi SNP của M3-Cg (Hd1)
 <400> 24
 catgataagg tactcctgg 19

<210> 25
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Oryza sativa
 <220>
 <223> Dấu chuẩn ADN: Đoạn mỗi xuôi của M4-Gc (Hd1)
 <400> 25
 gtatcaatca tgtgatcagt ggc 23

<210> 26
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Oryza sativa
 <220>
 <223> Dấu chuẩn ADN: Đoạn mỗi ngược của M4-Gc (Hd1)
 <400> 26
 cctaggaatt aggaagcaca g 21

<210> 27
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Oryza sativa
 <220>
 <223> Dấu chuẩn ADN: Đoạn mỗi SNP của M4-Gc (Hd1)
 <400> 19
 cagccaacat tgagggtctt 20

<210> 28
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Oryza sativa
 <220>
 <223> Dấu chuẩn ADN: Đoạn mỗi xuôi của M5-At (Hd1)
 <400> 28
 cttegtacca tgatgcagg 20

<210> 29

<211> 20
<212> ADN
<213> Oryza sativa
<220>
<223> Dấu chuẩn ADN: Đoạn mỗi ngược của M5-At (Hd1)
<400> 29
gcaagaaact gatgcggtag 20

<210> 30
<211> 20
<212> ADN
<213> Oryza sativa
<220>
<223> Dấu chuẩn ADN: Đoạn mỗi SNP của M5-At (Hd1)
<400> 30
ccaagaggtc tccgcagccg 20