



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

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

(11)



1-0029362

(51)⁷ C12N 15/09; A01H 1/02; A01H 5/00

(13) B

(21) 1-2014-02513

(22) 07/07/2009

(62) 1-2010-03449

(86) PCT/JP2009/062392 07/07/2009

(87) WO2010/005005 14/01/2010

(30) 2008-176934 07/07/2008 JP

(45) 25/09/2021 402

(43) 25/05/2011 278A

(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 TRỒNG ORYZA SATIVA L. KOSHIHIKARI KAZUSA 4GO VÀ PHƯƠNG
PHÁP PHÂN BIỆT CÂY TRỒNG NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp thiết kế hệ gen thực vật bao gồm bước xác định các dấu chuẩn ADN từ M1 đến M5 sao cho, đối với mỗi một vùng đích, dấu chuẩn ADN M2 được xác định ở đầu mút phía trước của vùng đích, hoặc ở phía trước của vùng đích này, dấu chuẩn ADN M1 được xác định ở trước dấu chuẩn ADN M2, dấu chuẩn ADN M4 được xác định ở đầu mút phía sau vùng đích, hoặc ở phía sau vùng đích này, dấu chuẩn ADN M5 được xác định ở sau dấu chuẩn ADN M4, và dấu chuẩn ADN M3 được xác định trong vùng đích; và bước thiết kế hệ gen sao cho vùng thay thế, chứa vùng đích, ở nhiễm sắc thể của cây trồng nguồn gốc sẽ được thay thế bằng mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ cây trồng lạ sao cho đầu mút phía trước của vùng thay thế nằm giữa dấu chuẩn ADN M1 và dấu chuẩn ADN M2, và đầu mút ở phía sau của vùng thay thế nằm giữa dấu chuẩn ADN M4 và dấu chuẩn ADN M5.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp thiết kế hệ gen thực vật bằng phương pháp không phải là tái tổ hợp gen, thích hợp để cải thiện cây trồng, phương pháp tạo ra cây trồng mới bằng cách sử dụng phương pháp thiết kế hệ gen này, cá thể thực vật và cây trồng mới được tạo ra bằng phương pháp này, và phương pháp phân biệt cây trồng.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Quần thể thuộc cùng loài sinh vật, nhưng có tính trạng khác với quần thể khác về một tính trạng nào đó do khác biệt về cấu trúc di truyền được gọi là giống (cây trồng). Nói cách khác, ngay cùng một loại cây trồng cũng khác nhau về mức độ khó trồng, tính đề kháng dịch hại, sản lượng, chất lượng hoặc các yếu tố tương tự, các tính trạng này tùy thuộc vào cây trồng. Vì lý do này, với các cây trồng nông nghiệp, đặc biệt là các loại cây trồng chính như cây lúa và lúa mì, từ lâu người ta đã luôn tìm cách cải thiện nhằm thu được cây trồng tốt hơn. Trong những năm gần đây, việc cải thiện như vậy đang được thực hiện tích cực không chỉ bởi các nhà cung cấp hạt giống và cây mà còn có sự tham gia của các tổ chức cộng đồng ở nông thôn và quận huyện. Ngoài ra, trong những năm gần đây để đáp ứng sự đa dạng thị hiếu của người tiêu thụ đối với các cây trồng ở vườn như các loài cỏ và hoa ngoài các cây trồng dùng làm thức ăn, người ta đang phát triển mạnh mẽ các loại cây trồng mới có nhiều màu sắc và hình thái.

Ngoài ra, trong những năm gần đây, người ta còn chú ý đến nguồn cây trồng cung cấp chất liệu thô chẳng hạn như etanol sinh khối và các chất liệu tương tự, và tìm cách phát triển cây trồng mới có hiệu quả thu hồi chất liệu quan tâm cao.

Với tiến bộ của các kỹ thuật phân tích axit nucleic hoặc các kỹ thuật tương tự trong những năm gần đây, đã phân tích được hệ gen của nhiều loại thực vật như cây Arabidopsis, cây lúa, lúa mì và các cây trồng tương tự, và thông tin di truyền thu được qua phân tích này đã được công bố. Bằng cách sử dụng thông tin di truyền được công bố này, người ta thường tiến hành cải thiện cây trồng bằng cách đưa gen từ loài lạ vào cây trồng ban đầu bằng phương pháp tái tổ hợp gen. Ví dụ, gen Hdl mã hoá

protein có nguồn gốc từ thực vật có chức năng làm tăng sự nhạy cảm ánh sáng của thực vật, và phương pháp tạo ra thực vật được biến nạp bằng gen Hd1 này, và các phương pháp hay gen tương tự đã được giới thiệu (xem chẳng hạn, tài liệu Patent 1). Tuy nhiên, mặc dù việc cải thiện cây trồng bằng phương pháp tái tổ hợp gen có ưu điểm là có thể đưa vào tính trạng vốn có ở loài xa thường không thể thu được bằng cách ghép đôi, phương pháp này vẫn có nhược điểm là việc nghiên cứu độ an toàn của cây trồng chưa được thực hiện đầy đủ như cần thiết.

Mặt khác, trong số các phương pháp cải thiện cây trồng thực vật bằng phương pháp không phải là tái tổ hợp gen, có phương pháp chọn giống bằng cách ghép đôi và phương pháp tạo đột biến. Phương pháp chọn giống bằng phép ghép đôi thông thường có thể là phương pháp chọn giống theo gia phả, phương pháp chọn giống quần thể, phương pháp chọn giống hồi quy và các phương pháp tương tự. Theo cách khác, bằng cách kết hợp giữa phương pháp chọn giống hồi quy và phương pháp MAS (chọn lọc nhờ dấu chuẩn - Marker Assisted Chọn lọc), việc cải thiện cây trồng bằng cách đưa một gen đích vào cây trồng ban đầu cũng được thực hiện rộng rãi. Trong bản mô tả này, phương pháp MAS là phương pháp chọn lọc một cá thể có tính trạng nhất định từ quần thể thế hệ con lai thu được bằng cách ghép đôi tự nhiên theo phương pháp truyền thống được thực hiện từ thời xưa hoặc ghép đôi nhân tạo bằng cách sử dụng dấu chuẩn ADN được liên kết với gen mã hoá tính trạng mục tiêu. Bằng cách thực hiện phương pháp chọn lọc cá thể sử dụng dấu chuẩn ADN này, có thể chọn lọc cá thể có tính trạng mục tiêu ở giai đoạn phát triển ban đầu chẳng hạn như giai đoạn cây con và các giai đoạn tương tự, nên có thể tiết kiệm công sức và cải thiện hiệu quả. Trong số các phương pháp chọn lọc cá thể có tính trạng nhất định bằng cách sử dụng dấu chuẩn ADN như vậy, ví dụ, đã biết đến phương pháp xác định kiểu gen của thực vật bằng cách sử dụng dấu chuẩn ADN có mặt trong vùng bao quanh gen *sd-1* của cây lúa là gen giống lúa bán lùn, và phương pháp đánh giá tính trạng giống bán lùn bằng cách sử dụng phương pháp này (xem chẳng hạn, tài liệu patent 2).

Các tài liệu liên quan:

Tài liệu patent

Tài liệu patent 1: JP 3,660,967

Tài liệu patent 2: WO 2003/070934

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề được sáng chế giải quyết

Tuy nhiên, phương pháp cải thiện cây trồng bằng phương pháp MAS có một nhược điểm là cá thể thế hệ con được chọn lọc bằng cách sử dụng dấu chuẩn ADN không nhất thiết là cá thể có tính trạng mục tiêu, và vai trò của dấu chuẩn ADN chỉ là trợ giúp cho việc chọn lọc. Điều này được cho là vì dấu chuẩn ADN thường không nằm trên gen tính trạng cần đưa vào, và có khoảng cách với chiều dài và hướng là không rõ giữa gen quyết định tính trạng và dấu chuẩn ADN. Vì lý do này, với phương pháp MAS, có thể làm giảm đi số lượng quần thể cá thể thế hệ con cần được đánh giá về tính trạng liên quan, nhưng vẫn cần đánh giá thêm tính trạng cá thể thế hệ con đã được chọn lọc bằng cách sử dụng dấu chuẩn ADN.

Ngoài ra, phương pháp cải thiện cây trồng bằng cách sử dụng phương pháp MAS còn có nhược điểm là tuy cải thiện được tính trạng mục tiêu, nhưng lại làm giảm đi tính trạng khác. Như đã nêu trên, điều này được cho là vì có khoảng cách với chiều dài và hướng không xác định giữa gen quyết định tính trạng đưa vào và dấu chuẩn ADN, nên không kiểm soát được vùng chứa mảnh nhiễm sắc thể được đưa vào, và có thể đã đưa vào thực vật nhiều gen khác không phải là gen mang tính trạng mục tiêu.

Một mục đích của sáng chế là đề xuất phương pháp thiết kế hệ gen thực vật và phương pháp tạo ra cây trồng mới vùng kiểm soát thay thế có mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai được đưa vào, và tạo ra cây trồng mới có tính trạng mục tiêu mà không làm thay đổi tính trạng được ưa thích của cây trồng ban đầu, trong đó việc cải thiện cây trồng được thực hiện bằng phương pháp không phải là tái tổ hợp gen.

Cách thức thực hiện sáng chế

Để giải quyết vấn đề nêu trên, các tác giả sáng chế đã nghiên cứu kỹ lưỡng và nhận thấy rằng, khi một cây trồng mới, trong đó vùng đích ở nhiễm sắc thể của cây trồng ban đầu được thay thế bằng mảnh đồng nhiễm sắc có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai được tạo ra bằng cách sử dụng dòng có đoạn nhiễm sắc thể thay thế, bằng cách thoả mãn các điều kiện (I) và (II) sau đây, thì có thể kiểm soát được vùng nhiễm sắc thể của cây trồng ban đầu được thay thế bằng mảnh đồng nhiễm sắc này, và hoàn

thành được sáng chế.

(I) Dấu chuẩn ADN M2 được thiết lập ở đầu mút phía trước của vùng đích, hoặc ở phía trước của vùng đích này, dấu chuẩn ADN M1 được thiết lập ở trước dấu chuẩn ADN M2, dấu chuẩn ADN M4 được thiết lập ở đầu mút phía sau vùng đích, hoặc ở phía sau vùng đích này, dấu chuẩn ADN M5 được thiết lập ở sau dấu chuẩn ADN M4, và dấu chuẩn ADN M3 được thiết lập trong vùng đích.

(II) Chọn lọc cá thể thế hệ con trong đó đầu mút phía trước của vùng nhiễm sắc thể của cây trồng ban đầu cần được thay thế bằng mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai được đưa vào nằm giữa các dấu chuẩn ADN M1 và M2, và đầu mút ở phía sau của vùng này nằm giữa các dấu chuẩn ADN M4 và M5.

(1) Phương pháp thiết kế hệ gen thực vật theo sáng chế là phương pháp thiết kế hệ gen thực vật trong đó vùng đích ở nhiễm sắc thể của cây trồng ban đầu được thay thế bằng mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai bằng cách sử dụng dòng có đoạn nhiễm sắc thể thay thế trong đó chỉ một phần của nhiễm sắc thể của cây trồng ban đầu được thay thế bằng mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, phương pháp này bao gồm các bước: thiết kế các dấu chuẩn NA từ M1 đến M5 sao cho, đối với mỗi một vùng đích, dấu chuẩn ADN M2 được thiết lập ở đầu mút phía trước của vùng đích, hoặc ở phía trước của vùng đích này, dấu chuẩn ADN M1 được thiết lập ở trước dấu chuẩn ADN M2, dấu chuẩn ADN M4 được thiết lập ở đầu mút phía sau vùng đích, hoặc ở phía sau của vùng đích này, dấu chuẩn ADN M5 được thiết lập ở sau dấu chuẩn ADN M4, và dấu chuẩn ADN M3 được thiết lập trong vùng đích; và thiết kế hệ gen sao cho vùng thay thế, chứa vùng đích, ở nhiễm sắc thể của cây trồng ban đầu sẽ được thay thế bằng mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai sao cho đầu mút phía trước của vùng thay thế nằm giữa dấu chuẩn ADN M1 và dấu chuẩn ADN M2, và đầu mút ở phía sau của vùng thay thế nằm giữa dấu chuẩn ADN M4 và dấu chuẩn ADN M5.

(2) Phương pháp tạo ra cây trồng mới theo sáng chế là phương pháp tạo ra cây trồng mới bằng cách sử dụng dòng có đoạn nhiễm sắc thể thay thế trong đó chỉ một phần của nhiễm sắc thể của cây trồng ban đầu được thay thế bằng mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, bao gồm các bước: (1-1) bước thiết lập dấu chuẩn ADN M2 ở đầu mút phía trước của vùng đích của nhiễm sắc thể của cây trồng ban

đầu, hoặc ở phía trước của vùng đích này, bước thiết lập dấu chuẩn ADN M1 ở phía trước dấu chuẩn ADN M2, bước thiết lập dấu chuẩn ADN M4 ở đầu mút phía sau vùng đích, hoặc ở phía sau vùng đích này, bước thiết lập dấu chuẩn ADN M5 ở sau dấu chuẩn ADN M4, bước thiết lập dấu chuẩn ADN M3 trong vùng đích; (1-2) bước ghép đôi dòng có đoạn nhiễm sắc thể thay thế và cây trồng ban đầu để thu được cá thể thế hệ con trong đó dấu chuẩn ADN M3 là vùng dị nhiễm sắc gồm một alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu và một alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai; (1-3) bước tự ghép đôi cá thể thế hệ con thu được ở bước (1-2) để thu được cá thể thế hệ con; (1-4) bước chọn lọc cá thể thế hệ con trong đó dấu chuẩn ADN M1 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, và dấu chuẩn ADN M2 và dấu chuẩn ADN M3 là vùng dị nhiễm sắc gồm một alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu và một alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, từ cá thể thế hệ con thu được bằng cách lai ngược cá thể thế hệ con thu được ở bước (1-3), hoặc the cá thể thế hệ con thu được ở bước (1-3); (1-5) bước tự ghép đôi cá thể thế hệ con được chọn lọc ở bước (1-4) để thu được cá thể thế hệ con; (1-6) bước chọn lọc cá thể thế hệ con trong đó dấu chuẩn ADN M1 và dấu chuẩn ADN M5 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, và dấu chuẩn ADN M2, dấu chuẩn ADN M3, và dấu chuẩn ADN M4 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, từ cá thể thế hệ con thu được ở bước (1-5), hoặc cá thể thế hệ con thu được bằng cách tự ghép đôi cá thể thế hệ con thu được ở bước (1-5), trong đó các bước (1-1) đến (1-6) được thực hiện cho từng vùng đích một, trên một hoặc nhiều vùng đích trong nhiễm sắc thể của cây trồng ban đầu.

(3) Phương pháp tạo ra cây trồng mới theo sáng chế là phương pháp tạo ra cây trồng mới bằng cách sử dụng dòng có đoạn nhiễm sắc thể thay thế trong đó chỉ một phần của nhiễm sắc thể của cây trồng ban đầu được thay thế bằng mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, phương pháp này bao gồm các bước: (2-1) bước thiết lập dấu chuẩn ADN M2 ở đầu mút phía trước của vùng đích của nhiễm sắc thể của cây trồng ban đầu, bước thiết lập dấu chuẩn ADN M1 ở phía trước dấu chuẩn ADN M2, bước thiết lập dấu chuẩn ADN M4 ở đầu mút phía sau vùng đích, hoặc ở phía sau .. vùng đích này, bước thiết lập dấu chuẩn ADN M5 ở sau dấu chuẩn ADN M4, bước thiết lập dấu chuẩn ADN M3 trong vùng đích; (2-2) bước ghép đôi dòng có đoạn nhiễm sắc thể thay thế và cây trồng ban đầu để thu được cá thể thế hệ con trong

đó dấu chuẩn ADN M3 là vùng dị nhiễm sắc gồm một alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu và một alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai; (2-3) bước tự ghép đôi cá thể thể hệ con thu được ở bước (2-2) để thu được cá thể thể hệ con; (2-4) bước chọn lọc cá thể thể hệ con trong đó dấu chuẩn ADN M5 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, và dấu chuẩn ADN M3 và dấu chuẩn ADN M4 là vùng dị nhiễm sắc gồm một alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu và một alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, từ cá thể thể hệ con thu được ở bước (2-3), hoặc cá thể thể hệ con thu được bằng cách lai ngược cá thể thể hệ con thu được ở bước (2-3); (2-5) bước tự ghép đôi cá thể thể hệ con được chọn lọc ở bước (2-4) để thu được cá thể thể hệ con; (2-6) bước chọn lọc cá thể thể hệ con trong đó dấu chuẩn ADN M1 và dấu chuẩn ADN M5 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, và dấu chuẩn ADN M2, dấu chuẩn ADN M3, và dấu chuẩn ADN M4 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, từ cá thể thể hệ con thu được ở bước (2-5), hoặc cá thể thể hệ con thu được bằng cách tự ghép đôi cá thể thể hệ con thu được ở bước (2-5), trong đó các bước (2-1) đến (2-6) được thực hiện cho từng vùng đích một trên một hoặc nhiều vùng đích trong nhiễm sắc thể của cây trồng ban đầu.

(4) Phương pháp tạo ra cây trồng mới theo sáng chế là phương pháp tạo ra cây trồng mới bằng cách sử dụng dòng có đoạn nhiễm sắc thể thay thế trong đó chỉ một phần của nhiễm sắc thể của cây trồng ban đầu được thay thế bằng mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, phương pháp này bao gồm (3-1) bước thiết lập dấu chuẩn ADN M2 ở đầu mút phía trước của vùng đích của nhiễm sắc thể của cây trồng ban đầu, bước thiết lập dấu chuẩn ADN M1 ở phía trước dấu chuẩn ADN M2, bước thiết lập ở đầu mút phía sau vùng đích, hoặc ở phía sau vùng đích này, bước thiết lập dấu chuẩn ADN M5 ở sau dấu chuẩn ADN M4, bước thiết lập dấu chuẩn ADN M3 trong vùng đích; (3-2) bước ghép đôi dòng có đoạn nhiễm sắc thể thay thế và cây trồng ban đầu để thu được cá thể thể hệ con trong đó dấu chuẩn ADN M3 là vùng dị nhiễm sắc gồm một alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu và một alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai; (3-3) bước tự ghép đôi cá thể thể hệ con thu được ở bước (3-2) để thu được cá thể thể hệ con; (3-4) bước chọn lọc cá thể thể hệ con trong đó một dấu chuẩn bất kỳ trong số dấu chuẩn ADN M1 và dấu chuẩn ADN M5 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, và dấu chuẩn kia là vùng dị nhiễm sắc gồm một alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu và một alen có nguồn gốc từ cây

trồng ngoại lai, từ cá thể thế hệ con thu được ở bước (3-3), hoặc cá thể thế hệ con thu được bằng cách lai ngược cá thể thế hệ con thu được ở bước (3-3); (3-5) bước tự ghép đôi cá thể thế hệ con thu được chọn lọc ở bước (3-4) để thu được cá thể thế hệ con; (3-6) bước chọn lọc cá thể thế hệ con trong đó dấu chuẩn ADN M1 và dấu chuẩn ADN M5 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu; và dấu chuẩn ADN M2, dấu chuẩn ADN M3, và dấu chuẩn ADN M4 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, từ cá thể thế hệ con thu được ở bước (3-5), hoặc cá thể thế hệ con thu được bằng cách tự ghép đôi cá thể thế hệ con thu được ở bước (3-5), trong đó các bước (3-1) đến (3-6) được thực hiện cho từng vùng đích một trên một hoặc nhiều vùng đích trong nhiễm sắc thể của cây trồng ban đầu.

(5) Phương pháp tạo ra cây trồng mới theo bước (4) sao cho, sau bước (3-4) và trước bước (3-5), có thể có bước (3-7-1) là bước thu nhận cá thể thế hệ con bằng cách tự ghép đôi cá thể thế hệ con thu được ở bước (3-4), và (3-7-2) bước chọn lọc (ii-1) cá thể thế hệ con trong đó dấu chuẩn ADN M1 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, và dấu chuẩn ADN M2 và dấu chuẩn ADN M3 là vùng dị nhiễm sắc gồm một alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu và một alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, hoặc (ii-2) cá thể thế hệ con thu được trong đó dấu chuẩn ADN M5 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, và dấu chuẩn ADN M3 và dấu chuẩn ADN M4 là vùng dị nhiễm sắc gồm một alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu và một alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, từ cá thể thế hệ con ở bước (3-7-1), cá thể thế hệ con thu được bằng cách lai ngược cá thể thế hệ con thu được ở bước (3-7-1), hoặc cá thể thế hệ con thu được bằng cách lai ngược cá thể thế hệ con thu được bằng cách tự ghép đôi cá thể thế hệ con thu được ở bước (3-7-1) được thực hiện; bước (3-5) là (3-5') bước thu nhận cá thể thế hệ con bằng cách tự ghép đôi cá thể thế hệ con thu được chọn lọc ở bước (3-7-2); bước (3-6) là bước (3-6') bước chọn lọc cá thể thế hệ con trong đó dấu chuẩn ADN M1 và dấu chuẩn ADN M5 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, và dấu chuẩn ADN M2, dấu chuẩn ADN M3, và dấu chuẩn ADN M4 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, từ cá thể thế hệ con thu được ở bước (3-5), hoặc cá thể thế hệ con thu được bằng cách tự ghép đôi cá thể thế hệ con thu được ở bước (3-5').

(6) Phương pháp tạo ra cây trồng mới theo phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp từ (2) đến (4) có thể là sao cho dấu chuẩn ADN M2 được thiết lập ở đầu mút phía trước của vùng đích, hoặc vùng kề cận của vùng này; dấu chuẩn ADN M1 được thiết lập nằm kề cận dấu chuẩn ADN M2; dấu chuẩn ADN M4 được thiết lập ở đầu mút phía sau vùng đích, hoặc vùng kề cận của vùng này; dấu chuẩn ADN M5 được thiết lập nằm kề cận dấu chuẩn ADN M4.

(7) Phương pháp tạo ra cây trồng mới theo phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp từ (2) đến (4) có thể sao cho vùng đích là vùng một gen.

(8) Phương pháp tạo ra cây trồng mới theo phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp từ (2) đến (4) có thể sao cho vùng đích là 2 vùng gen hoặc nhiều hơn.

(9) Phương pháp tạo ra cây trồng mới theo phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp từ (2) đến (4) có thể sao cho cây trồng ban đầu là cây tự giao hoặc cây tự thụ phấn.

(10) Phương pháp tạo ra cây trồng mới theo phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp từ (2) đến (4) có thể sao cho cây trồng ban đầu là cây trồng thuộc họ Hoà thảo.

(11) Phương pháp tạo ra cây trồng mới theo phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp từ (2) đến (4) có thể sao cho cây trồng ban đầu là cây lúa.

(12) Phương pháp tạo ra cây trồng mới theo (11) có thể sao cho cây lúa này là cây lúa Koshihikari.

(13) Cây trồng theo sáng chế là cây trồng được tạo ra bằng cách sử dụng phương pháp tạo ra cây trồng mới theo phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp từ (2) đến (4), và vùng đích ở nhiễm sắc thể của cây trồng ban đầu được thay thế bằng mảnh đồng nhiễm sắc có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai.

(14) Cá thể thế hệ con theo sáng chế thu được bằng cách ghép đôi hai cá thể được chọn từ nhóm bao gồm cá thể là cây trồng theo (13) và cá thể thế hệ con của cá thể là cây trồng theo (13).

(15) Cá thể thế hệ con theo (14) có thể sao cho nhiều vùng đích ở nhiễm sắc thể của cây trồng ban đầu được thay thế bằng mảnh đồng nhiễm sắc có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai.

(16) Cá thể thế hệ con theo (14) có thể sao cho các vùng đích tương ứng của hai cá thể này là khác nhau.

(17) Thu nhận cá thể thế hệ con theo sáng chế bằng cách sử dụng, là cây mẹ là cây mang hạt hoặc cây cha là cây cho phấn, cá thể được chọn từ nhóm bao gồm cá thể là cây trồng theo (13) và cá thể thế hệ con của cá thể là cây trồng theo (13), và ghép đôi giữa cây mẹ là cây mang hạt hoặc cây cha là cây cho phấn.

(18) Phương pháp tạo ra cây trồng mới theo sáng chế có bước (4-1) bước sử dụng cây trồng theo (13) hoặc cá thể thế hệ con theo (15) là cây mẹ là cây mang hạt, và cây trồng theo (13) hoặc cá thể thế hệ con theo (15) trong đó vùng đích là khác với vùng đích của cây mẹ là cây mang hạt là cây cha là cây cho phấn, và ghép đôi giữa cây mẹ là cây mang hạt và cây cha là cây cho phấn để thu được cá thể thế hệ con; (4-2) bước thu nhận cá thể thế hệ con bằng cách tự ghép đôi cá thể thế hệ con thu được ở bước (4-1); (4-3) bước chọn lọc cá thể thế hệ con trong đó, ở nhiễm sắc thể của cây trồng ban đầu, cả hai vùng đích mà cây mẹ là cây mang hạt sở hữu và vùng đích mà cây cha là cây cho phấn sở hữu được thay thế bằng mảnh đồng nhiễm sắc có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, từ cá thể thế hệ con thu được ở bước (4-2).

(19) Phương pháp tạo ra cây trồng mới theo (18) có thể còn có, sau bước (4-3), là (4-4) bước chọn lọc hai cá thể trong đó vùng đích là khác nhau giữa cây mẹ là cây mang hạt và cây cha là cây cho phấn, ở nhóm bao gồm cây trồng theo (13) hoặc cá thể thế hệ con theo (15), và cá thể được chọn lọc ở bước (4-3), và ghép đôi giữa chúng để thu được cá thể thế hệ con; (4-5) bước thu nhận cá thể thế hệ con bằng cách tự ghép đôi cá thể thế hệ con thu được ở bước (4-4); (4-6) bước chọn lọc cá thể thế hệ con trong đó, ở nhiễm sắc thể của cây trồng ban đầu, cả hai vùng đích mà cây mẹ là cây mang hạt sở hữu và vùng đích mà cây cha là cây cho phấn sở hữu được thay thế bằng mảnh đồng nhiễm sắc có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, từ cá thể thế hệ con thu được ở bước (4-5); (4-7) bước lặp lại các bước từ (4-4) đến (4-6) một hoặc nhiều.

(20) Phương pháp phân biệt cây trồng thực vật theo sáng chế là phương pháp phân biệt liệu một cá thể thực vật có phải hay không phải là cây trồng cụ thể được tạo ra bằng cách sử dụng phương pháp tạo ra cây trồng mới theo phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp từ (2) đến (4), phương pháp này bao gồm các bước: định typ một hoặc nhiều dấu chuẩn ADN được chọn từ nhóm bao gồm các dấu chuẩn ADN từ

M1 đến M5 bằng cách phân tích hệ gen cá thể thực vật; và phân biệt được rằng cá thể thực vật này là cây trồng cụ thể khi kết quả định typ thu được là phù hợp với kết quả của cây trồng cụ thể.

(21) Cây trồng mới theo sáng chế là cây trồng thể hệ con của dòng có đoạn nhiễm sắc thể thay thế trong đó một phần của nhiễm sắc thể được thay thế bằng mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai; một hoặc nhiều vùng đích của vùng nhiễm sắc thể được thay thế bằng mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai; chiều dài của mảnh nhiễm sắc thể này được kiểm soát bởi dấu chuẩn ADN được thiết lập ở phía trước của vùng đích, và dấu chuẩn ADN được thiết lập ở phía sau vùng đích.

(22) Cây lúa Koshihikari theo sáng chế là cây trồng *Oryza sativa* L. Koshihikari kazusa 4go, có số lưu giữ tại cơ quan lưu giữ quốc tế là FERM ABP-11140.

(23) Cá thể thể hệ con theo sáng chế thu được bằng cách ghép đôi hai cá thể được chọn từ nhóm bao gồm cá thể là cây trồng theo (22) và cá thể thể hệ con theo (17).

(24) Phương pháp phân biệt cây trồng theo sáng chế là phương pháp phân biệt liệu một cá thể thực vật có phải hay không phải là cây trồng cụ thể, phương pháp này bao gồm các bước: thiết lập SP-4009 là dấu chuẩn ADN M1, thiết lập G2003 là dấu chuẩn ADN M2, thiết lập G2002 là dấu chuẩn ADN M3, thiết lập SP-462 là dấu chuẩn ADN M4, và thiết lập SP-1259 là dấu chuẩn ADN M5; định typ một hoặc nhiều dấu chuẩn ADN được chọn từ nhóm bao gồm các dấu chuẩn ADN từ M1 đến M5 bằng cách phân tích hệ gen cá thể thực vật; và phân biệt được rằng cá thể thực vật này là cây trồng *Oryza sativa* L. Koshihikari eichi 4go hoặc cây trồng *Oryza sativa* L. Koshihikari kazusa 4go khi kết quả định typ thu được là phù hợp với kết quả của cây trồng *Oryza sativa* L. Koshihikari eichi 4go hoặc cây trồng *Oryza sativa* L. Koshihikari kazusa 4go.

(25) Phương pháp phân biệt cây trồng theo sáng chế là phương pháp phân biệt liệu một cá thể thực vật có phải hay không phải là cây trồng cụ thể, phương pháp này bao gồm các bước: thiết lập SP-2032 là dấu chuẩn ADN M1, thiết lập SP-170 là dấu chuẩn ADN M2, thiết lập SP-4028 là dấu chuẩn ADN M3, thiết lập SP4038 là dấu chuẩn ADN M4, và thiết lập SP-4030 là dấu chuẩn ADN M5; định typ một hoặc nhiều dấu chuẩn ADN được chọn từ nhóm bao gồm các dấu chuẩn ADN từ M1 đến M5 bằng

cách phân tích hệ gen cá thể thực vật; và phân biệt được rằng cá thể thực vật này là cây trồng *Oryza sativa* L. Koshihikari eichi 2go hoặc cây trồng *Oryza sativa* L. Koshihikari kazusa 4go khi kết quả định typ thu được là phù hợp với kết quả của cây trồng *Oryza sativa* L. Koshihikari eichi 2go hoặc cây trồng *Oryza sativa* L. Koshihikari kazusa 4go.

(26) Phương pháp phân biệt cây trồng theo sáng chế là phương pháp phân biệt liệu một cá thể thực vật có phải hay không phải là cây trồng cụ thể, phương pháp này bao gồm các bước: thiết lập P-2513 là dấu chuẩn ADN M1, thiết lập SP-586 là dấu chuẩn ADN M2, thiết lập SP-2254 là dấu chuẩn ADN M3, thiết lập SP-1603 là dấu chuẩn ADN M4, và thiết lập SP-604 là dấu chuẩn ADN M5; định typ một hoặc nhiều dấu chuẩn ADN được chọn từ nhóm bao gồm các dấu chuẩn ADN từ M1 đến M5 bằng cách phân tích hệ gen cá thể thực vật; và phân biệt được rằng cá thể thực vật này là cây trồng *Oryza sativa* L. Koshihikari eichi 3go hoặc cây trồng *Oryza sativa* L. Koshihikari kazusa 4go khi kết quả định typ thu được là phù hợp với kết quả của cây trồng *Oryza sativa* L. Koshihikari eichi 3go hoặc cây trồng *Oryza sativa* L. Koshihikari kazusa 4go.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Bằng cách sử dụng phương pháp thiết kế hệ gen thực vật theo sáng chế, và phương pháp tạo ra cây trồng mới theo sáng chế bằng cách sử dụng phương pháp thiết kế hệ gen này, có thể kiểm soát được vùng nhiễm sắc thể của cây trồng ban đầu sẽ được thay thế bằng mảnh đồng nhiễm sắc có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai. Vì lý do này, tính trạng mục tiêu có thể được đưa vào cây trồng ban đầu trong khi đó có khả năng là nhiều gen khác có chức năng không biết không phải là gen tính trạng mục tiêu được đưa vào trong nhiễm sắc thể của cây trồng ban đầu, và có khả năng là sự phá hủy tính trạng được ưa thích có trong cây trồng ban đầu được giữ ở mức nhỏ nhất.

Ngoài ra, bằng cách sử dụng cây trồng mới được tạo ra bằng phương pháp tạo ra cây trồng mới theo sáng chế hoặc cá thể thế hệ con của chúng là cá thể cha mẹ và nhờ đó tạo ra cây trồng mới, có thể cá thể thế hệ con thu được trong đó tất cả mảnh đồng nhiễm sắc có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai có trong cây mẹ là cây mang hạt và cây cha là cây cho phấn, một cách tương ứng, được tích lũy. Kết quả là, nhiều dạng tính trạng của cây trồng ban đầu có thể được cải thiện một cách đơn giản và an toàn, trong

khi đó có khả năng là một tính trạng được ưa thích có trong cây trồng ban đầu bị phá huỷ được giữ ở mức nhỏ nhất.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

FIG. 1 là hình ảnh thể hiện vùng đích T trên nhiễm sắc thể G của cây trồng ban đầu, mảnh nhiễm sắc thể G có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai sẽ được đưa vào nhiễm sắc thể G này, và các dấu chuẩn ADN từ M1 đến M5.

FIG. 2A là hình ảnh thể hiện vùng nhiễm sắc thể của cá thể thế hệ con được ưu tiên trong bước (1-4), trong số những cá thể thế hệ con thu được ở bước (1-3) trong phương pháp thứ nhất tạo ra cây trồng mới theo sáng chế. Trong hình này, phần đường kẻ đậm không tô màu thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, và phần đường kẻ đậm tô màu đen thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, một cách tương ứng.

FIG. 2B là hình ảnh thể hiện vùng nhiễm sắc thể của cá thể thế hệ con được ưu tiên trong bước (1-4), trong số những cá thể thế hệ con thu được ở bước (1-3) trong cùng phương pháp. Trong hình này, phần đường kẻ đậm không tô màu thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, và phần đường kẻ đậm tô màu đen thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, một cách tương ứng.

FIG. 2C là hình ảnh thể hiện vùng nhiễm sắc thể của cá thể thế hệ con được ưu tiên trong bước (1-4), trong số những cá thể thế hệ con thu được ở bước (1-3) trong cùng phương pháp. Trong hình này, phần đường kẻ đậm không tô màu thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, và phần đường kẻ đậm tô màu đen thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, một cách tương ứng.

FIG. 2D là hình ảnh thể hiện vùng nhiễm sắc thể của cá thể thế hệ con được ưu tiên trong bước (1-6), trong số những cá thể thế hệ con thu được ở bước (1-5) trong cùng phương pháp. Trong hình này, phần đường kẻ đậm không tô màu thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, và phần đường kẻ đậm tô màu đen thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, một cách tương ứng.

FIG. 2E là hình ảnh thể hiện vùng nhiễm sắc thể của cá thể thế hệ con được ưu tiên trong bước (1-6), trong số những cá thể thế hệ con thu được ở bước (1-5) trong cùng phương pháp. Trong hình này, phần đường kẻ đậm không tô màu thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, và phần đường kẻ đậm tô màu đen thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, một cách tương ứng.

FIG. 2F là hình ảnh thể hiện vùng nhiễm sắc thể của cá thể thế hệ con được ưu tiên trong bước (1-6), trong số những cá thể thế hệ con thu được ở bước (1-5) trong cùng phương pháp. Trong hình này, phần đường kẻ đậm không tô màu thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, và phần đường kẻ đậm tô màu đen thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, một cách tương ứng.

FIG. 3A là hình ảnh thể hiện vùng nhiễm sắc thể của cá thể thế hệ con được ưu tiên trong bước (2-4), trong số những cá thể thế hệ con thu được ở bước (2-3) của phương pháp thứ hai tạo ra cây trồng mới theo sáng chế. Trong hình này, phần đường kẻ đậm không tô màu thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, và phần đường kẻ đậm tô màu đen thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, một cách tương ứng.

FIG. 3B là hình ảnh thể hiện vùng nhiễm sắc thể của cá thể thế hệ con được ưu tiên trong bước (2-4), trong số những cá thể thế hệ con thu được ở bước (2-3) trong cùng phương pháp. Trong hình này, phần đường kẻ đậm không tô màu thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, và phần đường kẻ đậm tô màu đen thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, một cách tương ứng.

FIG. 3C là hình ảnh thể hiện vùng nhiễm sắc thể của cá thể thế hệ con được ưu tiên trong bước (2-4), trong số những cá thể thế hệ con thu được ở bước (2-3) trong cùng phương pháp. Trong hình này, phần đường kẻ đậm không tô màu thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, và phần đường kẻ đậm tô màu đen thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, một cách tương ứng.

FIG. 3D là hình ảnh thể hiện vùng nhiễm sắc thể của cá thể thế hệ con được ưu tiên ở bước (2-6), trong số những cá thể thế hệ con thu được ở bước (2-5) trong cùng phương pháp. Trong hình này, phần đường kẻ đậm không tô màu thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, và phần đường kẻ đậm tô màu đen thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, một cách tương ứng.

FIG. 3E là hình ảnh thể hiện vùng nhiễm sắc thể của cá thể thế hệ con được ưu tiên trong bước (2-6), trong số những cá thể thế hệ con thu được ở bước (2-5) trong cùng phương pháp. Trong hình này, phần đường kẻ đậm không tô màu thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, và phần đường kẻ đậm tô màu đen thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, một cách tương ứng.

FIG. 3F là hình ảnh thể hiện vùng nhiễm sắc thể của cá thể thế hệ con được ưu tiên trong bước (2-6), trong số những cá thể thế hệ con thu được ở bước (2-5) trong cùng phương pháp. Trong hình này, phần đường kẻ đậm không tô màu thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, và phần đường kẻ đậm tô màu đen thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, một cách tương ứng.

FIG. 4A là hình ảnh thể hiện vùng nhiễm sắc thể của cá thể thế hệ con được ưu tiên trong bước (3-4), trong số những cá thể thế hệ con thu được ở bước (3-3) trong phương pháp thứ ba tạo ra cây trồng mới theo sáng chế. Trong hình này, phần đường kẻ đậm không tô màu thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, và phần đường kẻ đậm tô màu đen thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, một cách tương ứng.

FIG. 4B là hình ảnh thể hiện vùng nhiễm sắc thể của cá thể thế hệ con được ưu tiên trong bước (3-4), trong số những cá thể thế hệ con thu được ở bước (3-3) trong cùng phương pháp. Trong hình này, phần đường kẻ đậm không tô màu thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, và phần đường kẻ đậm tô màu đen thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, một cách tương ứng.

FIG. 4C là hình ảnh thể hiện vùng nhiễm sắc thể của cá thể thế hệ con được ưu tiên trong bước (3-4), trong số những cá thể thế hệ con thu được ở bước (3-3) trong cùng phương pháp. Trong hình này, phần đường kẻ đậm không tô màu thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, và phần đường kẻ đậm tô màu đen thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, một cách tương ứng.

FIG. 4D là hình ảnh thể hiện vùng nhiễm sắc thể của cá thể thế hệ con được ưu tiên trong bước (3-4), trong số những cá thể thế hệ con thu được ở bước (3-3) trong cùng phương pháp. Trong hình này, phần đường kẻ đậm không tô màu thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, và phần đường kẻ đậm tô màu đen thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, một cách tương ứng.

FIG. 4E là hình ảnh thể hiện vùng nhiễm sắc thể của cá thể thế hệ con được ưu tiên trong bước (3-4), trong số những cá thể thế hệ con thu được ở bước (3-3) trong cùng phương pháp. Trong hình này, phần đường kẻ đậm không tô màu thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, và phần đường kẻ đậm tô màu đen thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, một cách tương ứng.

FIG. 4F là hình ảnh thể hiện vùng nhiễm sắc thể của cá thể thế hệ con được ưu tiên trong bước (3-4), trong số những cá thể thế hệ con thu được ở bước (3-3) trong cùng phương pháp. Trong hình này, phần đường kẻ đậm không tô màu thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, và phần đường kẻ đậm tô màu đen thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, một cách tương ứng.

FIG. 5A là hình ảnh thể hiện vùng nhiễm sắc thể của cá thể thế hệ con được ưu tiên trong bước (3-6), trong số những cá thể thế hệ con thu được ở bước (3-5) trong phương pháp thứ ba tạo ra cây trồng mới theo sáng chế. Trong hình này, phần đường kẻ đậm không tô màu thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, và phần đường kẻ đậm tô màu đen thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, một cách tương ứng.

FIG. 5B là hình ảnh thể hiện vùng nhiễm sắc thể của cá thể thế hệ con được ưu tiên trong bước (3-6), trong số những cá thể thế hệ con thu được ở bước (3-5) trong cùng phương pháp. Trong hình này, phần đường kẻ đậm không tô màu thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, và phần đường kẻ đậm tô màu đen thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, một cách tương ứng.

FIG. 5C là hình ảnh thể hiện vùng nhiễm sắc thể của cá thể thế hệ con được ưu tiên trong bước (3-6), trong số những cá thể thế hệ con thu được ở bước (3-5) trong cùng phương pháp. Trong hình này, phần đường kẻ đậm không tô màu thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, và phần đường kẻ đậm tô màu đen thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, một cách tương ứng.

FIG. 5D là hình ảnh thể hiện vùng nhiễm sắc thể của cá thể thế hệ con được ưu tiên trong bước (3-6), trong số những cá thể thế hệ con thu được ở bước (3-5) trong cùng phương pháp. Trong hình này, phần đường kẻ đậm không tô màu thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, và phần đường kẻ đậm tô màu đen thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, một cách tương ứng.

FIG. 5E là hình ảnh thể hiện vùng nhiễm sắc thể của cá thể thế hệ con được ưu tiên trong bước (3-6), trong số những cá thể thế hệ con thu được ở bước (3-5) trong cùng phương pháp. Trong hình này, phần đường kẻ đậm không tô màu thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, và phần đường kẻ đậm tô màu đen thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, một cách tương ứng.

FIG. 5F là hình ảnh thể hiện vùng nhiễm sắc thể của cá thể thế hệ con được ưu tiên trong bước (3-6), trong số những cá thể thế hệ con thu được ở bước (3-5) trong cùng phương pháp. Trong hình này, phần đường kẻ đậm không tô màu thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, và phần đường kẻ đậm tô màu đen thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, một cách tương ứng.

FIG. 6A là hình ảnh thể hiện vùng nhiễm sắc thể của cá thể thế hệ con tương đối được ưu tiên trong bước (3-7-2), trong số những cá thể thế hệ con thu được ở bước (3-7-1). Trong hình này, phần đường kẻ đậm không tô màu thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, và phần đường kẻ đậm tô màu đen thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, một cách tương ứng.

FIG. 6B là hình ảnh thể hiện vùng nhiễm sắc thể của cá thể thế hệ con tương đối được ưu tiên trong bước (3-7-2), trong số những cá thể thế hệ con thu được ở bước (3-7-1). Trong hình này, phần đường kẻ đậm không tô màu thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, và phần đường kẻ đậm tô màu đen thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, một cách tương ứng.

FIG. 6C là hình ảnh thể hiện vùng nhiễm sắc thể của cá thể thế hệ con tương đối được ưu tiên trong bước (3-7-2), trong số những cá thể thế hệ con thu được ở bước (3-7-1). Trong hình này, phần đường kẻ đậm không tô màu thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, và phần đường kẻ đậm tô màu đen thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, một cách tương ứng.

FIG. 6D là hình ảnh thể hiện vùng nhiễm sắc thể của cá thể thế hệ con tương đối được ưu tiên trong bước (3-7-2), trong số những cá thể thế hệ con thu được ở bước (3-7-1). Trong hình này, phần đường kẻ đậm không tô màu thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, và phần đường kẻ đậm tô màu đen thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, một cách tương ứng.

FIG. 7A là hình ảnh thể hiện vùng nhiễm sắc thể của cá thể thế hệ con tương đối được ưu tiên trong bước (3-7-2), trong số những cá thể thế hệ con thu được ở bước (3-7-1). Trong hình này, phần đường kẻ đậm không tô màu thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, và phần đường kẻ đậm tô màu đen thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, một cách tương ứng.

FIG. 7B là hình ảnh thể hiện vùng nhiễm sắc thể của cá thể thế hệ con tương đối được ưu tiên trong bước (3-7-2), trong số những cá thể thế hệ con thu được ở bước (3-7-1). Trong hình này, phần đường kẻ đậm không tô màu thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, và phần đường kẻ đậm tô màu đen thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, một cách tương ứng.

FIG. 7C là hình ảnh thể hiện vùng nhiễm sắc thể của cá thể thế hệ con tương đối được ưu tiên trong bước (3-7-2), trong số những cá thể thế hệ con thu được ở bước (3-7-1). Trong hình này, phần đường kẻ đậm không tô màu thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, và phần đường kẻ đậm tô màu đen thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, một cách tương ứng.

FIG. 7D là hình ảnh thể hiện vùng nhiễm sắc thể của cá thể thế hệ con tương đối được ưu tiên trong bước (3-7-2), trong số những cá thể thế hệ con thu được ở bước (3-7-1). Trong hình này, phần đường kẻ đậm không tô màu thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, và phần đường kẻ đậm tô màu đen thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, một cách tương ứng.

FIG. 7E là hình ảnh thể hiện vùng nhiễm sắc thể của cá thể thế hệ con tương đối được ưu tiên trong bước (3-7-2), trong số những cá thể thế hệ con thu được ở bước (3-7-1). Trong hình này, phần đường kẻ đậm không tô màu thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, và phần đường kẻ đậm tô màu đen thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, một cách tương ứng.

FIG. 7F là hình ảnh thể hiện vùng nhiễm sắc thể của cá thể thế hệ con tương đối được ưu tiên trong bước (3-7-2), trong số những cá thể thế hệ con thu được ở bước (3-7-1). Trong hình này, phần đường kẻ đậm không tô màu thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, và phần đường kẻ đậm tô màu đen thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, một cách tương ứng.

FIG. 7G là hình ảnh thể hiện vùng nhiễm sắc thể của cá thể thế hệ con tương đối được ưu tiên trong bước (3-7-2), trong số những cá thể thế hệ con thu được ở bước (3-7-1). Trong hình này, phần đường kẻ đậm không tô màu thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, và phần đường kẻ đậm tô màu đen thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, một cách tương ứng.

FIG. 8A là hình ảnh thể hiện vùng nhiễm sắc thể của cá thể thế hệ con tương đối được ưu tiên trong bước (3-7-2), trong số những cá thể thế hệ con thu được ở bước (3-7-1). Trong hình này, phần đường kẻ đậm không tô màu thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, và phần đường kẻ đậm tô màu đen thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, một cách tương ứng.

FIG. 8B là hình ảnh thể hiện vùng nhiễm sắc thể của cá thể thế hệ con tương đối được ưu tiên trong bước (3-7-2), trong số những cá thể thế hệ con thu được ở bước (3-7-1). Trong hình này, phần đường kẻ đậm không tô màu thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, và phần đường kẻ đậm tô màu đen thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, một cách tương ứng.

FIG. 8C là hình ảnh thể hiện vùng nhiễm sắc thể của cá thể thế hệ con tương đối được ưu tiên trong bước (3-7-2), trong số những cá thể thế hệ con thu được ở bước (3-7-1). Trong hình này, phần đường kẻ đậm không tô màu thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, và phần đường kẻ đậm tô màu đen thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, một cách tương ứng.

FIG. 8D là hình ảnh thể hiện vùng nhiễm sắc thể của cá thể thế hệ con tương đối được ưu tiên trong bước (3-7-2), trong số những cá thể thế hệ con thu được ở bước (3-7-1). Trong hình này, phần đường kẻ đậm không tô màu thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, và phần đường kẻ đậm tô màu đen thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, một cách tương ứng.

FIG. 9A là hình ảnh thể hiện vùng nhiễm sắc thể của cá thể thế hệ con tương đối được ưu tiên trong bước (3-7-2), trong số những cá thể thế hệ con thu được ở bước (3-7-1). Trong hình này, phần đường kẻ đậm không tô màu thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, và phần đường kẻ đậm tô màu đen thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, một cách tương ứng.

FIG. 9B là hình ảnh thể hiện vùng nhiễm sắc thể của cá thể thế hệ con tương đối được ưu tiên trong bước (3-7-2), trong số những cá thể thế hệ con thu được ở bước (3-7-1). Trong hình này, phần đường kẻ đậm không tô màu thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, và phần đường kẻ đậm tô màu đen thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, một cách tương ứng.

FIG. 9C là hình ảnh thể hiện vùng nhiễm sắc thể của cá thể thế hệ con tương đối được ưu tiên trong bước (3-7-2), trong số những cá thể thế hệ con thu được ở bước (3-7-1). Trong hình này, phần đường kẻ đậm không tô màu thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, và phần đường kẻ đậm tô màu đen thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, một cách tương ứng.

FIG. 9D là hình ảnh thể hiện vùng nhiễm sắc thể của cá thể thế hệ con tương đối được ưu tiên trong bước (3-7-2), trong số những cá thể thế hệ con thu được ở bước (3-7-1). Trong hình này, phần đường kẻ đậm không tô màu thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, và phần đường kẻ đậm tô màu đen thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, một cách tương ứng.

FIG. 9E là hình ảnh thể hiện vùng nhiễm sắc thể của cá thể thế hệ con tương đối được ưu tiên trong bước (3-7-2), trong số những cá thể thế hệ con thu được ở bước (3-7-1). Trong hình này, phần đường kẻ đậm không tô màu thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, và phần đường kẻ đậm tô màu đen thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, một cách tương ứng.

FIG. 9F là hình ảnh thể hiện vùng nhiễm sắc thể của cá thể thế hệ con tương đối được ưu tiên trong bước (3-7-2), trong số những cá thể thế hệ con thu được ở bước (3-7-1). Trong hình này, phần đường kẻ đậm không tô màu thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, và phần đường kẻ đậm tô màu đen thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, một cách tương ứng.

FIG. 9G là hình ảnh thể hiện vùng nhiễm sắc thể của cá thể thế hệ con tương đối được ưu tiên trong bước (3-7-2), trong số những cá thể thế hệ con thu được ở bước (3-7-1). Trong hình này, phần đường kẻ đậm không tô màu thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, và phần đường kẻ đậm tô màu đen thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, một cách tương ứng.

FIG. 10A là lược đồ thể hiện phương pháp tạo ra cây trồng trong đó ba vùng đích (vùng đích A, B, C) ở nhiễm sắc thể của cây trồng ban đầu được thay thế bằng mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai.

FIG. 10B là lược đồ thể hiện phương pháp tạo ra cây trồng trong đó ba vùng đích (vùng đích A, B, C) ở nhiễm sắc thể của cây trồng ban đầu được thay thế bằng mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai.

FIG. 11A là lược đồ thể hiện phương pháp tạo ra cây trồng trong đó bốn vùng đích (vùng đích A, B, C, D) ở nhiễm sắc thể của cây trồng ban đầu được thay thế bằng mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai.

FIG. 11B là lược đồ thể hiện phương pháp tạo ra cây trồng trong đó bốn vùng đích (vùng đích A, B, C D) ở nhiễm sắc thể của cây trồng ban đầu được thay thế bằng mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai.

FIG. 11C là lược đồ thể hiện phương pháp tạo ra cây trồng trong đó bốn vùng đích (vùng đích A, B, C ,D) ở nhiễm sắc thể của cây trồng ban đầu được thay thế bằng mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai.

FIG. 12A là lược đồ thể hiện phương pháp tạo ra cây trồng trong đó năm vùng đích (vùng đích A, B, C, D, E) ở nhiễm sắc thể của cây trồng ban đầu được thay thế bằng mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai.

FIG. 12B là lược đồ thể hiện phương pháp tạo ra cây trồng trong đó năm vùng đích (vùng đích A, B, C, D, E) ở nhiễm sắc thể của cây trồng ban đầu được thay thế bằng mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai.

FIG. 12C là lược đồ thể hiện phương pháp tạo ra cây trồng trong đó năm vùng đích (vùng đích A, B, C, D, E) ở nhiễm sắc thể của cây trồng ban đầu được thay thế bằng mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai.

FIG. 12D là lược đồ thể hiện phương pháp tạo ra cây trồng trong đó năm vùng đích (vùng đích A, B, C, D, E) ở nhiễm sắc thể của cây trồng ban đầu được thay thế bằng mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai.

FIG. 13A là lược đồ thể hiện phương pháp tạo ra cây trồng trong đó sáu vùng đích (vùng đích A, B, C, D, E, F) ở nhiễm sắc thể của cây trồng ban đầu được thay thế bằng mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai.

FIG. 13B là lược đồ thể hiện phương pháp tạo ra cây trồng trong đó sáu vùng đích (vùng đích A, B, C, D, E, F) ở nhiễm sắc thể của cây trồng ban đầu được thay thế bằng mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai.

FIG. 13C là lược đồ thể hiện phương pháp tạo ra cây trồng trong đó sáu vùng đích (vùng đích A, B, C, D, E, F) ở nhiễm sắc thể của cây trồng ban đầu được thay thế bằng mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai.

FIG. 13D là lược đồ thể hiện phương pháp tạo ra cây trồng trong đó sáu vùng đích (vùng đích A, B, C, D, E, F) ở nhiễm sắc thể của cây trồng ban đầu được thay thế bằng mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai.

FIG. 13E là lược đồ thể hiện phương pháp tạo ra cây trồng trong đó sáu vùng đích (vùng đích A, B, C, D, E, F) ở nhiễm sắc thể của cây trồng ban đầu được thay thế bằng mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai.

FIG. 14A là lược đồ thể hiện phương pháp tạo ra cây trồng P6 (ABCDEF), với xác suất xảy ra là cá thể thể hệ con mục tiêu có mặt trong quần thể chọn lọc mỗi lần là 1/64 đến 1/16.

FIG. 14B là lược đồ thể hiện phương pháp tạo ra cây trồng P6 (ABCDEF), với xác suất xảy ra là cá thể thể hệ con mục tiêu có mặt trong quần thể chọn lọc mỗi lần là 1/64 đến 1/16.

FIG. 14C là lược đồ thể hiện phương pháp tạo ra cây trồng P6 (ABCDEF), với xác suất xảy ra là cá thể thể hệ con mục tiêu có mặt trong quần thể chọn lọc mỗi lần là 1/64 đến 1/16.

FIG. 15 là hình ảnh thể hiện dấu chuẩn ADN được sử dụng để tạo ra cây lúa Koshihikari eichi 4go.

FIG. 16 là lược đồ thể hiện hệ gen của cây lúa Koshihikari eichi 4go.

FIG. 17 là hình ảnh so sánh tính chống chịu không bị đẽ rập của cây lúa Koshihikari eichi 4go và cây lúa Koshihikari. Cánh đồng ở phía trước là cánh đồng trồng cây lúa Koshihikari, và cánh đồng ở phía sau là cánh đồng trồng cây lúa Koshihikari eichi 4go.

FIG. 18 là hình ảnh thể hiện dấu chuẩn ADN được sử dụng để tạo ra cây lúa

Koshihikari eichi 2go.

FIG. 19 là lược đồ thể hiện hệ gen của cây lúa Koshihikari eichi 2go.

FIG. 20 là hình ảnh thể hiện dấu chuẩn ADN được sử dụng để tạo ra cây lúa Koshihikari eichi 3go.

FIG. 21 là lược đồ thể hiện hệ gen của cây lúa Koshihikari eichi 3go.

FIG. 22 là lược đồ thể hiện hệ gen của cây lúa Koshihikari kazusa 4go.

Mô tả chi tiết sáng chế

Theo sáng chế, dòng có đoạn nhiễm sắc thể thay thế dùng để chỉ dòng trong đó chỉ một phần của nhiễm sắc thể của cây trồng ban đầu được thay thế bằng mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai.

Cây trồng ngoại lai không bị giới hạn cụ thể miễn là đó là cây trồng khác cây trồng ban đầu, và có thể là cây trồng thực vật cùng một loài với cây trồng ban đầu, có thể là cây trồng thực vật khác loài với cây trồng ban đầu, và có thể là cây trồng không thuộc thực vật chẳng hạn như động vật và các loại tương tự.

Theo sáng chế, cây trồng dùng để chỉ quần thể của cùng một loài thực vật, nhưng có thể được phân biệt rõ ràng với các loài khác trong cùng một loài về một số tính trạng, do cấu trúc di truyền khác nhau.

Theo sáng chế, vùng đích dùng để chỉ vùng ở nhiễm sắc thể của cây trồng ban đầu, được nhằm để được thay thế bằng mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai. Ví dụ, cây trồng thực vật mà thông tin di truyền của nó đã được biết tương đối đủ, chẳng hạn như cây lúa, lúa mì, và cây Arabidopsis, có thể tạo ra cây trồng mới được cải thiện về một đặc tính so với cây trồng ban đầu bằng cách thay thế vùng nhiễm sắc thể cụ thể chứa gen tính trạng mục tiêu bằng mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai. Trong bản mô tả này, vùng đích của cây trồng ban đầu không bị hạn chế đặc biệt miễn là đó là vùng tương ứng với vùng của phần được thay thế bằng mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai trong nhiễm sắc thể của dòng có đoạn nhiễm sắc thể thay thế được dùng làm cá thể cha mẹ, và vùng đích của cây trồng ban đầu có thể là vùng một gen, hoặc có thể là vùng chứa hai hoặc nhiều gen. Ví dụ, khi cây trồng ngoại lai là khác loài với cây trồng ban đầu, tốt hơn là vùng này vùng một gen. Ngoài ra, khi cây trồng ngoại lai là loài có quan hệ gần với cây

trồng ban đầu, chẳng hạn như khi cây trồng ngoại lai là cây trồng khác thuộc cùng một loài với cây trồng ban đầu, vùng đích có thể là vùng một gen, hoặc có thể là vùng chứa hai hoặc nhiều gen.

Vùng gen này có thể chỉ là vùng dịch mã, hoặc có thể là vùng chứa vùng không dịch mã chẳng hạn như intron, vùng kiểm soát chẳng hạn như vùng gen khởi đầu vùng và vùng gen kết thúc ngoài vùng dịch mã.

Dấu chuẩn ADN theo sáng chế không bị giới hạn đặc biệt miễn là nó có thể phân biệt nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu và nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, tức là nó có thể phát hiện sự khác biệt về trình tự ADN trên nhiễm sắc thể giữa cây trồng ban đầu và cây trồng ngoại lai, và có thể sử dụng dấu chuẩn ADN mà thường được sử dụng trong lĩnh vực phân tích gen. Các dấu chuẩn ADN này có thể, ví dụ là dấu chuẩn RFLP (đa hình độ dài các đoạn giới hạn - Restriction Fragment Chiều dài Polymorphism) hoặc dấu chuẩn có thể phát hiện hiện tượng đa hình gen chẳng hạn như SNP (đa hình đơn nucleotit - Single Nucleotide Polymorphism), và có thể phát hiện sự khác biệt về số đoạn lặp SSR (đoạn lặp đơn giản - Simple Sequence Repeats).

Có thể thực hiện việc phân biệt một alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu và một alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai bằng cách sử dụng các dấu chuẩn ADN này theo phương pháp thông thường. Ví dụ, PCR được thực hiện như sau: sử dụng ADN được chiết từ mỗi cá thể làm khuôn mẫu; và sử dụng đoạn mồi mà có thể lai đặc hiệu với SNP và SSR cụ thể. Sau đó, bằng cách phát hiện sự có mặt hoặc vắng mặt của sản phẩm PCR này bằng cách áp dụng phương pháp điện di hoặc các phương pháp tương tự, có thể phân biệt mỗi hiện tượng đa hình SNP và SSR giữa cây trồng ban đầu và cây trồng ngoại lai. Theo cách khác, bằng cách phát hiện kiểu mẫu của mảnh ADN bằng cách sử dụng phương pháp điện di hoặc các phương pháp tương tự sau khi chiết ADN từ mỗi cá thể được xử lý bằng enzym giới hạn, tương tự có thể phân biệt mỗi hiện tượng đa hình. Có thể thiết kế đoạn mồi mà có thể thể lai đặc hiệu với SNP và SSR cụ thể theo phương pháp thông thường bằng cách sử dụng công cụ thiết kế đoạn mồi mà thường được sử dụng, tùy thuộc vào trình tự nucleotit của SNP và SSR. Ngoài ra, có thể tổng hợp đoạn mồi thiết kế bằng cách sử dụng phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Với các dấu chuẩn ADN, các dấu chuẩn ADN đã biết có thể được sử dụng một cách thích hợp. Theo cách khác, có thể sử dụng các dấu chuẩn ADN mới được tạo ra. Ví dụ, khi sử dụng các dấu chuẩn ADN đã biết liên quan đến cây lúa, có thể sử dụng các dấu chuẩn SNP được bộc lộ trong tài liệu Patent 2, và các dấu chuẩn ADN được công bố trong Chương trình nghiên cứu hệ gen cây lúa - Rice Genome Research Program (<http://rgp.dna.affrc.go.jp/publicdata.html>). Khi sử dụng các dấu chuẩn ADN đã biết liên quan đến cây lúa mạch, có thể sử dụng các dấu chuẩn ADN được công bố trong GrainGenes: A Database for Triticeae and Avena (<http://wheat.pw.usda.gov/GG2/index.shtml>), CR-EST: The IPK Crop EST Database (<http://pgrc.ipk-gatersleben.de/est/index.php>). Khi sử dụng các dấu chuẩn ADN đã biết liên quan đến cây lúa miến, có thể sử dụng các dấu chuẩn ADN được công bố trong GRAMENE (http://www.gramene.org/db/markers/marker_view). Khi sử dụng các dấu chuẩn ADN đã biết liên quan đến lúa mì, có thể sử dụng các dấu chuẩn ADN được công bố trong GrainGenes: A Database for Triticeae and Avena, WHEAT CAP (<http://maswheat.ucdavis.edu/>). Khi sử dụng các dấu chuẩn ADN đã biết liên quan đến cây ngô, có thể sử dụng các dấu chuẩn ADN được công bố trong MaizeGDB (<http://www.maizegdb.org/>). Ngoài ra, các dấu chuẩn ADN thuộc các dạng khác được bộc lộ trong GRAMENE, và cũng có thể sử dụng các dạng này.

Trước hết, phương pháp thiết kế hệ gen thực vật theo sáng chế được mô tả chi tiết.

Phương pháp thiết kế hệ gen thực vật theo sáng chế là phương pháp thiết kế hệ gen thực vật trong đó một hoặc nhiều vùng đích ở nhiễm sắc thể của cây trồng ban đầu được thay thế bằng mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, bằng cách sử dụng dòng có đoạn nhiễm sắc thể thay thế trong đó chỉ một phần của nhiễm sắc thể của cây trồng ban đầu được thay thế bằng mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai. Trong phương pháp này, các dấu chuẩn ADN từ M1 đến M5 thoả mãn yêu cầu sau đây (i) được thiết lập đối với mỗi một vùng đích. Tức là trong vùng thay thế ở nhiễm sắc thể của cây trồng ban đầu mà chứa vùng đích này và sẽ được thay thế bằng mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, gen được thiết kế sao cho đầu mút phía trước của nó nằm giữa các dấu chuẩn ADN M1 và M2, và đầu mút ở phía sau của nó nằm giữa các dấu chuẩn ADN M4 và M5.

(i) Dấu chuẩn ADN M2 được thiết lập ở đầu mút phía trước của vùng đích, hoặc ở phía trước của nó. Dấu chuẩn ADN M1 được thiết lập ở trước dấu chuẩn ADN M2. Dấu chuẩn ADN M4 được thiết lập ở đầu mút phía sau vùng đích, hoặc ở sau của nó. Dấu chuẩn ADN M5 được thiết lập ở sau dấu chuẩn ADN M4. Dấu chuẩn ADN M3 được thiết lập trong vùng đích.

Theo sáng chế, ở phía trước dùng để chỉ phía nhánh ngắn ở nhiễm sắc thể, và ở sau dùng để chỉ phía nhánh dài ở nhiễm sắc thể.

Bằng cách thiết lập các dấu chuẩn ADN tương ứng từ M1 đến M5 sao cho thỏa mãn yêu cầu (i), có thể kiểm soát được chiều dài của mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai sẽ được đưa vào nhiễm sắc thể của cây trồng ban đầu, tức là vùng thay thế ở nhiễm sắc thể của cây trồng ban đầu sẽ được thay thế bằng mảnh nhiễm sắc thể này. Vì lý do này, bằng cách sử dụng phương pháp thiết kế hệ gen thực vật theo sáng chế, có thể thiết kế hệ gen sao cho gen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai hướng đích được đưa vào nhiễm sắc thể của cây trồng ban đầu, đồng thời giữ ở mức nhỏ nhất xác suất mà nhiều gen khác không phải là gen mục tiêu được đưa vào nhiễm sắc thể của cây trồng ban đầu và khả năng là gen không phải là gen mục tiêu có mặt trong vùng kề cận của vùng đích được thay thế bằng nhiễm sắc thể của cây trồng ban đầu có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai.

Có thể thiết kế các dấu chuẩn ADN tương ứng từ M1 đến M5 dựa trên thông tin di truyền đã biết của loài thực vật mà mỗi cây trồng thuộc về đó. Thông tin di truyền của mỗi cây trồng là có được, ví dụ, ở NCBI (National center for Biotechnology Information) và DDBJ (DNA Data Bank of Japan) cung cấp nguồn dữ liệu trình tự nucleotit quốc tế. Đặc biệt là, thông tin di truyền cho mỗi giống cây trồng cây lúa có sở KOME (Knowledge-based Oryza Molecular biological Encyclopedia, <http://cdna01.dna.affrc.go.jp/cDNA/>).

FIG. 1 là hình ảnh thể hiện vùng đích T trên nhiễm sắc thể G của cây trồng ban đầu, mảnh nhiễm sắc thể L có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai sẽ được thay thế, và các dấu chuẩn ADN từ M1 đến M5. Đầu mút phía trước của mảnh nhiễm sắc thể L có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, tức là một đầu mút phía trước của vùng thay thế ở nhiễm sắc thể của cây trồng ban đầu, mà được thay thế bằng mảnh nhiễm sắc thể L có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, nằm giữa các dấu chuẩn ADN M1 và M2. Mặt khác,

đầu mút ở phía sau của mảnh nhiễm sắc thể L có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, tức là đầu mút ở phía sau của vùng thay thế ở nhiễm sắc thể của cây trồng ban đầu, mà được thay thế bằng mảnh nhiễm sắc thể L có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, nằm giữa các dấu chuẩn ADN M4 và M5. Vì lý do này, thiết lập khoảng cách giữa các dấu chuẩn ADN M1 và M2 là d_1 , thiết lập khoảng cách giữa các dấu chuẩn ADN M2 và M4 là d_2 , và thiết lập khoảng cách giữa các dấu chuẩn ADN M4 và M5 là d_3 , chiều dài của mảnh nhiễm sắc thể L có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai (chiều dài của vùng thay thế) được biểu hiện bằng phương trình (1).

Phương trình (1): $d_2 \leq \text{chiều dài của mảnh nhiễm sắc thể L có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai} \leq d_1 + d_2 + d_3$

Bằng cách thiết lập dấu chuẩn ADN M2 ở phía trước (hướng cách xa vùng đích T) nhiễm sắc thể G của cây trồng ban đầu, chiều dài của mảnh nhiễm sắc thể L có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai trở thành dài. Mặt khác, bằng cách thiết lập dấu chuẩn ADN M2 ở phía sau (hướng tiếp cận vùng đích T) của nhiễm sắc thể G của cây trồng ban đầu, chiều dài của mảnh nhiễm sắc thể L có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai trở thành ngắn. Tương tự, bằng cách thiết lập dấu chuẩn ADN M4 ở phía sau nhiễm sắc thể G của cây trồng ban đầu, chiều dài của mảnh nhiễm sắc thể L có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai trở nên dài và, bằng cách thiết lập ở phía trước nhiễm sắc thể G của cây trồng ban đầu, chiều dài của mảnh nhiễm sắc thể L có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai trở thành ngắn.

Mặt khác, khi khoảng cách d_1 giữa các dấu chuẩn ADN M1 và M2 là dài, phạm vi mà trong đó một đầu mút phía trước của mảnh nhiễm sắc thể L có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai có thể tồn tại bị mở rộng. Vì lý do này, sẽ khó xác định chiều dài của mảnh nhiễm sắc thể L có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai được đưa vào. Mặt khác, khi khoảng cách d_1 này là ngắn, phạm vi mà trong đó một đầu mút phía trước của mảnh nhiễm sắc thể L có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai có thể tồn tại được thu hẹp. Vì lý do này, sẽ dễ xác định chiều dài của mảnh nhiễm sắc thể L có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai được đưa vào.

Tương tự, khi khoảng cách d_3 giữa các dấu chuẩn ADN M4 và M5 là dài, phạm vi mà trong đó đầu mút ở phía sau của mảnh nhiễm sắc thể L có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai có thể tồn tại bị mở rộng, và sẽ khó xác định chiều dài của mảnh nhiễm

sắc thể L có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai được đưa vào. Khi khoảng cách d3 này là ngắn, phạm vi mà trong đó đầu mút ở phía sau của mảnh nhiễm sắc thể L có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai có thể tồn tại được thu hẹp, trở nên dễ dàng xác định chiều dài của mảnh nhiễm sắc thể L có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai được đưa vào.

Khi chiều dài của mảnh nhiễm sắc thể L có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai trở nên dài hơn, khả năng mà các gen có mặt trên cả hai phía của vùng đích được đưa vào cây trồng ban đầu cùng với gen mục tiêu có mặt trong vùng đích T trở nên cao hơn. Việc đưa một gen không phải là gen mục tiêu vào nhiễm sắc thể của cây trồng ban đầu dẫn đến là một gen không phải là gen mục tiêu có mặt trong cây trồng ban đầu được thay thế bằng mảnh nhiễm sắc thể L có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai. Kết quả là, có khả năng là một đặc tính tốt ở cây trồng ban đầu bị phá huỷ một cách bất cẩn. Khi một gen không phải là gen mục tiêu sẽ được đưa vào nhiễm sắc thể của cây trồng ban đầu là ít hơn, tức là chiều dài của mảnh nhiễm sắc thể L có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai là gần hơn với chiều dài của vùng đích T, khả năng là một đặc tính tốt của cây trồng ban đầu được thay thế có thể được giảm đi. Do đó, tốt hơn là chiều dài của mảnh nhiễm sắc thể L có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai là gần hơn với chiều dài của vùng đích T.

Khi các dấu chuẩn ADN M2 và M1 là gần hơn với một đầu mút của phía trên vùng đích T, và khi các dấu chuẩn ADN M4 và M5 là gần hơn với đầu mút ở phía sau vùng đích T, chiều dài của mảnh nhiễm sắc thể L có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai trở thành ngắn hơn. Kết quả là, vùng nhiễm sắc thể không phải là vùng đích T của mảnh nhiễm sắc thể L có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai sẽ được đưa vào nhiễm sắc thể của cây trồng ban đầu có thể là ngắn hơn. Khi đó, tốt hơn là dấu chuẩn ADN M2 được thiết lập nằm kề cận một đầu mút phía trước của vùng đích T, và tốt hơn nữa nếu dấu chuẩn ADN M2 ở cùng một phía với phía một đầu mút phía trước của vùng đích T. Ngoài ra, tốt hơn là dấu chuẩn ADN M1 được thiết lập vùng kề cận ở phía trước dấu chuẩn ADN M2. Mặt khác, tốt hơn là dấu chuẩn ADN M4 được thiết lập nằm kề cận đầu mút ở phía sau vùng đích T, và tốt hơn nữa nếu dấu chuẩn ADN M4 ở cùng một phía với phía của đầu mút ở phía sau vùng đích T. Ngoài ra, tốt hơn là dấu chuẩn ADN M5 được thiết lập vùng kề cận ở phía sau của dấu chuẩn ADN M4.

Tuy nhiên, khi khoảng cách d1 giữa các dấu chuẩn ADN M1 và M2, khoảng cách

d2 giữa các dấu chuẩn ADN M2 và M4, và khoảng cách d3 giữa các dấu chuẩn ADN M4 và M5 trở nên quá ngắn, một cách tương ứng, thì tần số tái tổ hợp của nhiễm sắc thể trở nên nhỏ. Vì lý do này, khi mà kích cỡ của quần thể mà từ đó chọn lọc cá thể thế hệ con không được tăng lên, trở nên khó cá thể thế hệ con thu được mục tiêu (cá thể thế hệ con trong đó xuất hiện tái tổ hợp ở nhiễm sắc thể).

Khi cây trồng ngoại lai là loài tương tự với cây trồng ban đầu, trình tự ADN của nhiễm sắc thể của cả hai cây trồng này có tính tương đồng cao. Vì lý do này, thậm chí khi chiều dài của mảnh nhiễm sắc thể L có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai là dài và do đó gen nằm kề cận gen mục tiêu (vùng đích T) được thay thế bằng gen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai cùng với gen mục tiêu, có khả năng là đặc tính tốt của cây trồng ban đầu không bị phá hủy.

Từ phần nêu trên, tốt hơn là thiết lập các dấu chuẩn ADN M1, M2, M4, và M5 này được xác định một cách thích hợp so với chiều dài của vùng đích T, cho dù cây trồng ban đầu và cây trồng ngoại lai là các loài tương tự hoặc loài xa, và kích cỡ của quần thể sẽ được chọn lọc.

Hiện nay, mặc dù thông tin trình tự của gen đã được vén mở, vẫn có nhiều gen với chức năng chưa biết. Ngoài ra, ngay cả khi với một gen có chức năng đã biết, thì vẫn còn nhiều trường hợp trong đó lại tìm ra chức năng mới không biết nhờ phân tích sau đó. Về mặt nguyên tắc, có thể làm sáng tỏ chức năng của gen như vậy bằng cách đưa mảnh nhiễm sắc thể mã hoá gen này có chức năng chưa biết vào nhiễm sắc thể của cây trồng ban đầu mà về di truyền không chứa gen này và sau đó so sánh và nghiên cứu đặc tính sinh học chẳng hạn như hoạt tính sinh lý có ở cây trồng thu được so với đặc tính của cây trồng ban đầu. Tuy nhiên, trong phương pháp cải thiện cây trồng bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết từ trước chẳng hạn như phương pháp MAS và các phương pháp tương tự, khó mà kiểm soát một cách nghiêm ngặt mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai sẽ được đưa vào cây trồng ban đầu. Do đó, thông tin chẳng hạn như gen nào được mã hoá ngoài gen mục tiêu trong mảnh nhiễm sắc thể được đưa vào, hoặc gen nào được mã hoá ở vùng nhiễm sắc thể của cây trồng ban đầu bị mất đi do sự thay thế mảnh nhiễm sắc thể này trong nhiều trường hợp là chưa biết. Vì lý do này, trong trường hợp cây trồng có hệ gen được thiết kế sao cho để đưa mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai vào theo phương pháp

trước đây, rất khó đánh giá một cách chính xác liệu một đặc tính sinh học khác với đặc tính của cây trồng ban đầu là chức năng được biểu hiện bằng gen mục tiêu được đưa vào hay không. Ngoài ra, thậm chí trong trường hợp khi mà có thể đưa vào tính trạng mục tiêu, khi tính trạng khác cũng thay đổi, cũng khó thiết lập là liệu sự thay đổi này có phải là do chức năng chưa biết đến của gen mục tiêu được đưa vào, hoặc do một gen khác với gen này.

Ngược lại, trong hệ gen được thiết kế bằng phương pháp thiết kế hệ gen thực vật theo sáng chế, chiều dài của mảnh nhiễm sắc thể L có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, và vùng thay thế của nhiễm sắc thể G ở cây trồng ban đầu sẽ được thay thế bằng mảnh nhiễm sắc thể L có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai này có thể được xác định chặt chẽ hơn trước đây. Vì lý do này, trong trường hợp cây trồng có hệ gen được thiết kế để đưa mảnh nhiễm sắc thể L có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai vào bằng cách sử dụng phương pháp thiết kế hệ gen thực vật theo sáng chế, đã có thể để đánh giá tính trạng được đưa vào cây trồng ban đầu bằng mảnh nhiễm sắc thể L có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai với độ chính xác cao hơn trước đây. Do đó, phương pháp thiết kế hệ gen thực vật theo sáng chế còn có thể thích hợp để sử dụng trong việc phân tích chức năng gen.

Sau đây, phương pháp tạo ra cây trồng mới theo sáng chế sẽ được giải thích. Phương pháp tạo ra cây trồng mới theo sáng chế sử dụng phương pháp thiết kế hệ gen thực vật theo sáng chế. Cụ thể, có bốn dạng phương pháp sản xuất sau (từ phương pháp thứ nhất đến thứ tư).

Trong phương pháp tạo ra cây trồng mới theo sáng chế, cây trồng ban đầu không bị giới hạn cụ thể miễn là cây trồng thực vật, nhưng tốt hơn nếu cây trồng ban đầu là chẳng hạn như họ hoà thảo Poaceae, họ Đậu, họ Cải, họ Cam, Họ Cẩm quỳ, họ Cúc, họ Dền, họ Thầu dầu, họ Bìm bìm, hoặc họ Loa kèn. đối với thực vật thuộc Họ hoà thảo, ví dụ, cây lúa, ngô, cây lúa miến ngọt, lúa mì, lúa mạch, cây lúa mạch đen, cây kê barnyard Nhật bản (Japanese barnyard millet), và cây lúa miến là được ưu tiên. Ngoài ra, đối với thực vật thuộc họ Đậu Fabaceae, ví dụ, lạc, cây đậu chick-pea, cây đậu soybean max, đậu common bean, đậu bird's-foot trefoil, và cỏ linh lăng là được ưu tiên. Đối với thực vật thuộc họ cải, ví dụ, cây cải thale-cross, cây cải dầu, cây tâm giá, cây củ cải, cải bắp, và cây "cải ngựa Nhật bản" wasabi là được ưu tiên. Đối với thực

vật thuộc họ Cam, ví dụ, cây cam là được ưu tiên. Đối với thực vật thuộc họ Cẩm quỳ, ví dụ, cây bông là được ưu tiên. Đối với thực vật thuộc họ Cúc, ví dụ, cây hướng dương, rau diếp, cúc cánh giấy, cây cà chua, cây khoai tây, cây hạt tiêu, và cây thuốc lá là được ưu tiên. Đối với thực vật thuộc họ Dền, ví dụ, cây củ cải đường là được ưu tiên và, đối với thực vật thuộc họ Thầu dầu, ví dụ, cây đại kích, và cây sắn là được ưu tiên. Đối với thực vật thuộc họ Bìm bìm, ví dụ, cây bìm bìm biếc Nhật bản là được ưu tiên và, đối với thực vật thuộc họ Loa kèn, ví dụ, cây hành là được ưu tiên.

Trong phương pháp tạo ra cây trồng mới theo sáng chế, tốt hơn là dòng có đoạn nhiễm sắc thể thay thế đặc biệt, là dòng cây tự giao hoặc cây tự thụ phấn bởi vì có thể giảm đi yếu tố không chắc chắn trong thiết kế hệ gen. Trong bản mô tả này, cây tự nhân giống dùng để chỉ ghép đôi giữa bằng cách sử dụng bản thân cây này như là thành phần ghép đôi. Cụ thể, trong trường hợp với thực vật thể lưỡng tính, sự tự nhân giống đó là noãn được thụ phấn bằng cách tự giao để tạo ra hạt giống, tức là sự tự ghép đôi.

Đặc biệt, phương pháp tạo ra cây trồng mới theo sáng chế có thể tạo ra cây trồng mới tương đối an toàn và ổn định mà không sử dụng phương pháp tái tổ hợp gen. Vì lý do này, tốt hơn nếu dòng có đoạn nhiễm sắc thể thay thế được sử dụng theo sáng chế sao cho cây trồng ăn được là cây trồng ban đầu, tốt hơn nữa nếu cây lúa, lúa mì, ngô, hoặc đậu nành là cây trồng ban đầu, và còn tốt hơn nếu cây lúa là cây trồng ban đầu. Tốt hơn nếu cây lúa là cây lúa Koshihikari, Habataki, hoặc IR64, đặc biệt tốt hơn nếu là cây lúa Koshihikari.

Dòng có đoạn nhiễm sắc thể thay thế được sử dụng theo sáng chế có thể được tạo ra bằng phương pháp thông thường, hoặc có thể có được từ tổ chức chẳng hạn như National Institute of Agrobiological Sciences Rice Genome Resource Center.

Trong phương pháp thứ nhất tạo ra cây trồng mới theo sáng chế, thực hiện các bước sau đây từ (1-1) đến (1-6) đối với mỗi một vùng đích trên một hoặc nhiều vùng đích ở nhiễm sắc thể của cây trồng ban đầu, bằng cách sử dụng dòng có đoạn nhiễm sắc thể thay thế trong đó chỉ một phần của nhiễm sắc thể của cây trồng ban đầu được thay thế bằng mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai.

(1-1) Bước thiết lập dấu chuẩn ADN M2 ở đầu mút phía trước của vùng đích, hoặc ở phía trước nó; bước thiết lập dấu chuẩn ADN M1 ở phía trước dấu chuẩn ADN

M2; bước thiết lập dấu chuẩn ADN M4 ở đầu mút phía sau vùng đích, hoặc ở sau nó; bước thiết lập dấu chuẩn ADN M5 ở sau dấu chuẩn ADN M4; bước thiết lập dấu chuẩn ADN M3 trong vùng đích.

(1-2) Bước ghép đôi dòng có đoạn nhiễm sắc thể thay thế và cây trồng ban đầu để thu được cá thể thế hệ con trong đó dấu chuẩn ADN M3 là vùng dị nhiễm sắc gồm một alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu và một alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai.

(1-3) Bước tự ghép đôi cá thể thế hệ con thu được ở bước (1-2) để thu được cá thể thế hệ con.

(1-4) Bước chọn lọc cá thể thế hệ con trong đó dấu chuẩn ADN M1 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, và các dấu chuẩn ADN M2 và M3 là vùng dị nhiễm sắc gồm một alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu và một alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, từ cá thể thế hệ con thu được ở bước (1-3); hoặc cá thể thế hệ con thu được bằng cách lai ngược cá thể thế hệ con thu được ở bước (1-3).

(1-5) Bước tự ghép đôi cá thể thế hệ con được chọn lọc ở bước (1-4) để thu được cá thể thế hệ con.

(1-6) Bước chọn lọc cá thể thế hệ con trong đó các dấu chuẩn ADN M1 và M5 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, và các dấu chuẩn ADN M2, M3 và M4 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai từ cá thể thế hệ con thu được ở bước (1-5); hoặc cá thể thế hệ con thu được bằng cách tự ghép đôi cá thể thế hệ con thu được ở bước (1-5).

Mỗi bước sẽ được mô tả chi tiết dưới đây.

Trước hết, như là bước (1-1), dấu chuẩn ADN M2 được thiết lập ở đầu mút phía trước của vùng đích ở nhiễm sắc thể của cây trồng ban đầu, hoặc ở phía trước vùng đích này, và dấu chuẩn ADN M1 được thiết lập ở trước dấu chuẩn ADN M2. Mặt khác, dấu chuẩn ADN M4 được thiết lập ở đầu mút phía sau của vùng này đích, hoặc ở phía sau vùng đích này, và dấu chuẩn ADN M5 được thiết lập ở sau dấu chuẩn ADN M4. Và, trong vùng đích này, thiết lập dấu chuẩn ADN M3. Tức là các dấu chuẩn ADN tương ứng M1, M2, M4, M5 được thiết lập sao cho đầu mút phía trước mảnh nhiễm

sắc thể có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai sẽ được đưa vào vùng nhiễm sắc thể (vùng chứa vùng đích) của cây trồng ban đầu bằng cách thay thế là nằm giữa các dấu chuẩn ADN M1 và M2, và đầu mút ở phía sau của chúng nằm giữa các dấu chuẩn ADN M4 và M5.

Cụ thể, thiết lập các dấu chuẩn ADN tương ứng từ M1 đến M5 là giống nhau như cách thiết lập phương pháp thiết kế hệ gen thực vật theo sáng chế.

Bằng cách thiết lập các dấu chuẩn ADN từ M1 đến M5 như thế này, khi tạo ra cây trồng mới, có thể kiểm soát được chiều dài của mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai sẽ được đưa vào nhiễm sắc thể của cây trồng ban đầu. Kết quả là, gen không phải là gen mục tiêu có thể được ức chế một cách hiệu quả không được đưa vào nhiễm sắc thể của cây trồng ban đầu. Ngoài ra, đã có thể ức chế một cách hiệu quả một gen không phải là gen mục tiêu có mặt trong vùng kề cận vùng đích không được thay thế bằng nhiễm sắc thể của cây trồng ban đầu có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai.

Sau đó, trong bước (1-2), dòng có đoạn nhiễm sắc thể thay thế và cây trồng ban đầu được ghép đôi để thu được cá thể thế hệ con trong đó dấu chuẩn ADN M3 là vùng dị nhiễm sắc gồm một alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu và một alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai. Có thể cho ghép đôi dòng có đoạn nhiễm sắc thể thay thế là cây mẹ là cây mang hạt, và cây trồng ban đầu là cây cha là cây cho phấn, hoặc có thể cho ghép đôi cây trồng ban đầu như là cây mẹ là cây mang hạt và dòng có đoạn nhiễm sắc thể thay thế như là cây cha là cây cho phấn.

Thông thường, trong quá trình ghép đôi, gen có trong cá thể cha mẹ được phân bố ngẫu nhiên trong giao tử. Vì lý do này, mặc dù cá thể thế hệ con được chọn lọc bằng dấu chuẩn ADN có gen mã hoá tính trạng mục tiêu, các vùng gen khác được thay đổi như thế nào so với cá thể cha mẹ là không được biết đến. Vì lý do này, sẽ khó xác định rằng một tính trạng kiểu hình của cá thể thế hệ con thu được là do vùng nhiễm sắc thể được liên kết với dấu chuẩn ADN, hoặc do ảnh hưởng của gen có mặt trong vùng nhiễm sắc thể khác.

Theo sáng chế, sử dụng dòng có đoạn nhiễm sắc thể thay thế và cây trồng ban đầu của dòng có đoạn nhiễm sắc thể thay thế này làm cá thể cha mẹ. Trong dòng có đoạn nhiễm sắc thể thay thế này, tất cả các vùng nhiễm sắc thể khác không phải là

mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai có gen giống như gen ở cây trồng ban đầu. Do đó, vùng nhiễm sắc thể của cá thể thế hệ con thu được là sao cho tất cả vùng nhiễm sắc thể không phải là mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai có cùng một gen như gen ở cây trồng ban đầu. Vì lý do này, trong cá thể thế hệ con này, có thể xác định một cách dễ dàng ảnh hưởng của mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai.

Trong phương pháp tạo ra cây trồng mới theo sáng chế, việc ghép đôi có thể là ghép đôi tự nhiên, nhưng vì cây mẹ là cây mang hạt và cây cha là cây cho phấn có thể được nhận diện một cách chắc chắn, ghép đôi nhân tạo là được ưu tiên. Trong bản mô tả này, phương pháp ghép đôi nhân tạo không bị giới hạn cụ thể miễn là đó là phương pháp có thể làm cho nhụy hoa của cây mẹ là cây mang hạt nhận được hạt phấn từ cây cha là cây cho phấn để thụ phấn cho nó, mà có thể được thực hiện theo phương pháp thông thường.

Trong bước (1-3), cá thể thế hệ con thu được ở bước (1-2) được tự ghép đôi để thu được cá thể thế hệ con. Sau đó, trong bước (1-4), chọn lọc cá thể thế hệ con trong đó dấu chuẩn ADN M1 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, và các dấu chuẩn ADN M2 và M3 là vùng dị nhiễm sắc gồm một alen của cây trồng ban đầu và một alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, từ cá thể thế hệ con thu được ở bước (1-3); hoặc cá thể thế hệ con thu được bằng cách lai ngược cá thể thế hệ con thu được ở bước (1-3).

Các từ FIG. 2A đến FIG. 2C là hình ảnh thể hiện vùng nhiễm sắc thể của cá thể thế hệ con được ưu tiên ở bước (1-4) trong số những cá thể thế hệ con thu được ở bước (1-3). Trong hình này, phần đường kẻ đậm không tô màu thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, và phần đường kẻ đậm tô màu đen thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai. Trước hết, từ cá thể thế hệ con thu được ở bước (1-3), chọn lọc cá thể thế hệ con (1a) trong đó dấu chuẩn ADN M1 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, và các dấu chuẩn ADN M2 và M3 là vùng dị nhiễm sắc; cá thể thế hệ con (1b) trong đó dấu chuẩn ADN M1 là vùng dị nhiễm sắc, và các dấu chuẩn ADN M2 và M3 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai; cá thể thế hệ con (1c) trong đó dấu chuẩn ADN M1 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, và các dấu chuẩn ADN M2 và

M3 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai; một cách tương ứng. Trong bản mô tả này, cá thể thế hệ con (1a) là cá thể thế hệ con được chọn lọc cuối cùng ở bước (1-4). Cá thể thế hệ con (1b) và cá thể thế hệ con (1c) được lai ngược tiếp với cá thể của mỗi cây trồng ban đầu, và sau đó có thể chọn lọc cá thể thế hệ con (1a) từ cá thể thế hệ con thu được.

Sau đó, trong bước (1-5), bằng cách tự ghép đôi cá thể thế hệ con (1a) chọn lọc ở bước (1-4) như sau, thu được cá thể thế hệ con. Sau đó, trong bước (1-6), chọn lọc cá thể thế hệ con trong đó các dấu chuẩn ADN M1 và M5 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, và các dấu chuẩn ADN M2, M3, và M4 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, từ cá thể thế hệ con thu được ở bước (1-5); hoặc cá thể thế hệ con thu được bằng cách tự ghép đôi cá thể thế hệ con thu được ở bước (1-5).

Các từ FIG. 2D đến FIG. 2F là hình ảnh thể hiện vùng nhiễm sắc thể của cá thể thế hệ con được ưu tiên ở bước (1-6) trong số những cá thể thế hệ con thu được ở bước (1-5). Trong các hình này, phần đường kẻ đậm không tô màu thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, và phần đường kẻ đậm tô màu đen thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai. Trước hết, từ cá thể thế hệ con thu được ở bước (1-5), chọn lọc cá thể thế hệ con (1d) trong đó các dấu chuẩn ADN M1 và M5 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, và các dấu chuẩn ADN M2, M3 và M4 là vùng dị nhiễm sắc; cá thể thế hệ con (1e) trong đó các dấu chuẩn ADN M1 và M5 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, và các dấu chuẩn ADN M2, M3 và M4 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai; cá thể thế hệ con (1f) trong đó dấu chuẩn ADN M1 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, các dấu chuẩn ADN M2, M3 và M4 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, và dấu chuẩn ADN M5 là vùng dị nhiễm sắc; một cách tương ứng. Trong bản mô tả này, cá thể thế hệ con (1e) là cây trồng mới mục tiêu được tạo ra bằng phương pháp thứ nhất tạo ra cây trồng mới theo sáng chế, trong đó một đầu mút phía trước của mảnh nhiễm sắc thể L có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai nằm giữa các dấu chuẩn ADN M1 và M2, và đầu mút ở phía sau nó nằm giữa các dấu chuẩn ADN M4 và M5. Cá thể thế hệ con (1d) và cá thể thế hệ con (1f) được tự ghép đôi tiếp, một cách tương ứng, và có thể

chọn lọc cá thể thế hệ con (1e) từ cá thể thế hệ con thu được.

Theo cách khác, để thiết lập cả hai đầu mút của vùng đích, sau khi thiết lập một đầu mút phía trước của mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai sẽ được đưa vào, có thể thiết lập đầu mút ở phía sau như phương pháp thứ nhất để tạo ra cây trồng mới theo sáng chế, hoặc sau một khi đầu mút ở phía sau được thiết lập, có thể thiết lập đầu mút phía trước như phương pháp thứ hai tạo ra cây trồng mới theo sáng chế được mô tả sau đây.

Trong phương pháp thứ hai tạo ra cây trồng mới theo sáng chế, thực hiện các bước từ (2-1) đến (2-6) sau đây đối với mỗi một vùng đích trên một hoặc nhiều vùng đích ở nhiễm sắc thể của cây trồng ban đầu, bằng cách sử dụng dòng có đoạn nhiễm sắc thể thay thế trong đó chỉ một phần của nhiễm sắc thể của cây trồng ban đầu được thay thế bằng mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai.

(2-1) Bước thiết lập dấu chuẩn ADN M2 ở đầu mút phía trước của vùng đích, hoặc ở phía trước nó; bước thiết lập dấu chuẩn ADN M1 ở phía trước dấu chuẩn ADN M2; bước thiết lập dấu chuẩn ADN M4 ở đầu mút phía sau của vùng đích, hoặc ở sau nó; bước thiết lập dấu chuẩn ADN M5 ở sau dấu chuẩn ADN M4; bước thiết lập dấu chuẩn ADN M3 trong vùng đích.

(2-2) Bước ghép đôi dòng có đoạn nhiễm sắc thể thay thế và cây trồng ban đầu để thu được cá thể thế hệ con trong đó dấu chuẩn ADN M3 là vùng dị nhiễm sắc gồm một alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu và một alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai.

(2-3) Bước tự ghép đôi cá thể thế hệ con thu được ở bước (2-2) để thu được cá thể thế hệ con.

(2-4) Bước chọn lọc cá thể thế hệ con trong đó dấu chuẩn ADN M5 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, và các dấu chuẩn ADN M3 và M4 là vùng dị nhiễm sắc gồm một alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu và một alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, từ cá thể thế hệ con thu được ở bước (2-3); hoặc cá thể thế hệ con thu được bằng cách lai ngược cá thể thế hệ con thu được ở bước (2-3).

(2-5) Bước tự ghép đôi cá thể thế hệ con được chọn lọc ở bước (2-4) để thu được

cá thể thế hệ con.

(2-6) Bước chọn lọc cá thể thế hệ con trong đó các dấu chuẩn ADN M1 và M5 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, và các dấu chuẩn ADN M2, M3 và M4 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, từ cá thể thế hệ con thu được ở bước (2-5); hoặc cá thể thế hệ con thu được bằng cách tự ghép đôi cá thể thế hệ con thu được ở bước (2-5).

Các bước từ (2-1) đến (2-3) là giống như các bước từ (1-1) đến (1-3) của phương pháp thứ nhất tạo ra cây trồng mới theo sáng chế, một cách tương ứng.

Các từ FIG. 3A đến FIG. 3C là hình ảnh thể hiện vùng nhiễm sắc thể của cá thể thế hệ con được ưu tiên ở bước (2-4) trong số những cá thể thế hệ con thu được ở bước (2-3). Trong các hình này, phần đường kẻ đậm không tô màu thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, và phần đường kẻ đậm tô màu đen thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, một cách tương ứng. Trước hết, từ cá thể thế hệ con thu được ở bước (2-3) chọn lọc, cá thể thế hệ con (2a) trong đó dấu chuẩn ADN M5 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, và các dấu chuẩn ADN M4 và M3 là vùng dị nhiễm sắc; cá thể thế hệ con (2b) trong đó dấu chuẩn ADN M5 là vùng dị nhiễm sắc, và các dấu chuẩn ADN M4 và M3 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai; cá thể thế hệ con (2c) trong đó dấu chuẩn ADN M5 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, và các dấu chuẩn ADN M4 và M3 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai; một cách tương ứng. Theo bản mô tả này, cá thể thế hệ con (2a) là a cá thể thế hệ con được chọn lọc cuối cùng ở bước (2-4). Cá thể thế hệ con (2b) và cá thể thế hệ con (2c) được lai ngược tiếp với cá thể của mỗi cây trồng ban đầu, và có thể chọn lọc cá thể thế hệ con (2a) từ cá thể thế hệ con tạo ra.

Các FIG. 3D đến FIG. 3F là hình ảnh thể hiện vùng nhiễm sắc thể của cá thể thế hệ con được ưu tiên ở bước (2-6) trong số những cá thể thế hệ con thu được ở bước (2-5). Trong các hình này, phần đường kẻ đậm không tô màu thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, và phần đường kẻ đậm tô màu đen thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai. Trước hết, từ cá thể thế hệ con thu được ở bước (2-5) chọn lọc, cá thể thế hệ con (2d) trong đó các dấu chuẩn ADN M1 và M5 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, và các dấu chuẩn ADN M2, M3 và M4 là

vùng dị nhiễm sắc; cá thể thế hệ con (2e) trong đó các dấu chuẩn ADN M1 và M5 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, và các dấu chuẩn ADN M2, M3 và M4 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai; cá thể thế hệ con (2f) trong đó dấu chuẩn ADN M5 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, các dấu chuẩn ADN M2, M3 và M4 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, và các dấu chuẩn ADN M1 là vùng dị nhiễm sắc; một cách tương ứng. Trong bản mô tả này, cá thể thế hệ con (2e) là cây trồng mới mục tiêu được tạo ra bằng phương pháp thứ hai tạo ra cây trồng mới theo sáng chế, trong đó một đầu mút phía trước của mảnh nhiễm sắc thể L có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai nằm giữa các dấu chuẩn ADN M1 và M2, và đầu mút ở phía sau của nó nằm giữa các dấu chuẩn ADN M4 và M5. Cá thể thế hệ con (2d) và cá thể thế hệ con (2f) được tự ghép đôi tiếp, một cách tương ứng, và sau đó có thể chọn lọc cá thể thế hệ con (2e) từ cá thể thế hệ con thu được.

Theo cách khác, để thiết lập cả hai đầu mút của vùng đích, sau khi thiết lập được đầu mút ở một phía của mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai được đưa vào, có thể thiết lập được đầu mút kia như phương pháp thứ nhất hoặc phương pháp thứ hai tạo ra cây trồng mới theo sáng chế, hoặc trước tiên có thể thiết lập các đầu mút ở cả hai phía như phương pháp thứ ba tạo ra cây trồng mới theo sáng chế được mô tả sau đây.

Trong phương pháp thứ ba tạo ra cây trồng mới theo sáng chế, thực hiện các bước từ (3-1) đến (3-6) sau đây đối với mỗi một vùng đích trên một hoặc nhiều vùng đích ở nhiễm sắc thể của cây trồng ban đầu, bằng cách sử dụng dòng có đoạn nhiễm sắc thể thay thế trong đó chỉ một phần của nhiễm sắc thể của cây trồng ban đầu được thay thế bằng mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai.

(3-1) Bước thiết lập dấu chuẩn ADN M2 ở đầu mút phía trước của vùng đích, hoặc ở phía trước nó; bước thiết lập dấu chuẩn ADN M1 ở phía trước dấu chuẩn ADN M2; bước thiết lập dấu chuẩn ADN M4 ở đầu mút phía sau vùng đích, hoặc ở sau nó; bước thiết lập dấu chuẩn ADN M5 ở sau dấu chuẩn ADN M4; bước thiết lập dấu chuẩn ADN M3 trong vùng đích.

(3-2) Bước ghép đôi dòng có đoạn nhiễm sắc thể thay thế và cây trồng ban đầu để thu được cá thể thế hệ con trong đó dấu chuẩn ADN M3 là vùng dị nhiễm sắc gồm

một alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu và một alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai.

(3-3) Bước tự ghép đôi cá thể thế hệ con thu được ở bước (3-2) để thu được cá thể thế hệ con.

(3-4) Bước chọn lọc cá thể thế hệ con trong đó bất kỳ một trong số các dấu chuẩn ADN M1 và M5 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, và dấu chuẩn kia là vùng dị nhiễm sắc gồm một alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu và một alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, từ cá thể thế hệ con thu được ở bước (3-3); hoặc cá thể thế hệ con thu được bằng cách lai ngược cá thể thế hệ con thu được ở bước (3-3).

(3-5) Bước tự ghép đôi cá thể thế hệ con được chọn lọc ở bước (3-4) để thu được cá thể thế hệ con.

(3-6) Bước chọn lọc cá thể thế hệ con trong đó các dấu chuẩn ADN M1 và M5 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, và các dấu chuẩn ADN M2, M3 và M4 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, từ cá thể thế hệ con thu được ở bước (3-5); hoặc cá thể thế hệ con thu được bằng cách tự ghép đôi cá thể thế hệ con thu được ở bước (3-5).

Các bước từ (3-1) đến (3-3) là giống như các bước từ (1-1) đến (1-3) của phương pháp thứ nhất tạo ra cây trồng mới theo sáng chế.

Trong bước (3-4), cá thể thế hệ con trong đó bất kỳ một trong số các dấu chuẩn ADN M1 và M5 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, và dấu chuẩn kia là vùng dị nhiễm sắc gồm một alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu và một alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, từ cá thể thế hệ con thu được ở bước (3-3); hoặc cá thể thế hệ con thu được bằng cách lai ngược cá thể thế hệ con thu được ở bước (3-3). Tức là trong số những cá thể thế hệ con thu được ở bước (3-3), có thể chọn lọc cá thể thế hệ con mục tiêu, hoặc sau khi cá thể thế hệ con trong đó ít nhất một alen bất kỳ, có mặt điểm tái tổ hợp quanh vùng alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu và vùng alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai giữa các dấu chuẩn ADN M1 và M5 được chọn lọc từ những cá thể thế hệ con thu được ở bước (3-3), có thể chọn lọc cá thể thế hệ con mục tiêu từ trong số những cá thể thế hệ con thu được bằng cách

lai ngược cá thể thế hệ con này.

Các FIG. 4A đến FIG. 4F là hình ảnh thể hiện vùng nhiễm sắc thể của cá thể thế hệ con được ưu tiên ở bước (3-4) trong số những cá thể thế hệ con thu được ở bước (3-3). Trong các hình này, phần đường kẻ đậm không tô màu thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, và phần đường kẻ đậm tô màu đen thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, một cách tương ứng. Trước hết, từ cá thể thế hệ con thu được ở bước (3-3) chọn lọc, cá thể thế hệ con (3a) trong đó dấu chuẩn ADN M1 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, và dấu chuẩn ADN M5 là vùng dị nhiễm sắc; cá thể thế hệ con (3b) trong đó dấu chuẩn ADN M1 là vùng dị nhiễm sắc, và dấu chuẩn ADN M5 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai; cá thể thế hệ con (3c) trong đó dấu chuẩn ADN M1 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, và dấu chuẩn ADN M5 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai; cá thể thế hệ con (3d) trong đó dấu chuẩn ADN M1 là vùng dị nhiễm sắc, và dấu chuẩn ADN M5 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu; cá thể thế hệ con (3e) trong đó dấu chuẩn ADN M1 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, và dấu chuẩn ADN M5 là vùng dị nhiễm sắc; cá thể thế hệ con (3f) trong đó dấu chuẩn ADN M1 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, và dấu chuẩn ADN M5 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu; một cách tương ứng. Trong bản mô tả này, cá thể thế hệ con (3a) hoặc (3d) là cá thể thế hệ con được chọn lọc cuối cùng ở bước (3-4). Cá thể thế hệ con (3b), (3c), (3e) hoặc (3f) được lai ngược tiếp với cá thể của mỗi cây trồng ban đầu, và có thể chọn lọc cá thể thế hệ con (3a) hoặc (3d) từ cá thể thế hệ con thu được.

Sau đó, trong bước (3-5), bằng cách tự ghép đôi cá thể thế hệ con (3a) hoặc (3d) được chọn lọc ở bước (3-4) như thế, thu được cá thể thế hệ con. Sau đó, trong bước (3-6), chọn lọc cá thể thế hệ con trong đó các dấu chuẩn ADN M1 và M5 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, và các dấu chuẩn ADN M2, M3 và M4 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, từ cá thể thế hệ con thu được ở bước (3-5); hoặc cá thể thế hệ con thu được bằng cách tự ghép đôi cá thể thế hệ con thu được ở bước (3-5).

Các FIG. 5A đến FIG. 5C là hình ảnh thể hiện vùng nhiễm sắc thể của cá thể thế

hệ con được ưu tiên ở bước (3-6), trong trường hợp trong đó cá thể thế hệ con thu được ở bước (3-4) là (3a). Trong các hình này, phần đường kẻ đậm không tô màu thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, và phần đường kẻ đậm tô màu đen thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai. Trước hết, từ những cá thể thế hệ con thu được ở bước (3-5) chọn lọc, cá thể thế hệ con (3g) trong đó các dấu chuẩn ADN M1 và M5 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, và các dấu chuẩn ADN M2, M3 và M4 là vùng dị nhiễm sắc; cá thể thế hệ con (3h) trong đó các dấu chuẩn ADN M1 và M5 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, và các dấu chuẩn ADN M2, M3 và M4 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai; cá thể thế hệ con (3i) trong đó dấu chuẩn ADN M1 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, các dấu chuẩn ADN M2, M3 và M4 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, và dấu chuẩn ADN M5 là vùng dị nhiễm sắc; một cách tương ứng. Trong bản mô tả này, cá thể thế hệ con (3h) là cây trồng mới mục tiêu được tạo ra bằng phương pháp thứ ba tạo ra cây trồng mới theo sáng chế, một đầu mút phía trước của mảnh nhiễm sắc thể L có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai nằm giữa các dấu chuẩn ADN M1 và M2, và đầu mút ở phía sau nằm giữa các dấu chuẩn ADN M4 và M5. Cá thể thế hệ con (3g) và cá thể thế hệ con (3i) được tự ghép đôi tiếp, một cách tương ứng, và có thể chọn lọc cá thể thế hệ con (3h) từ cá thể thế hệ con thu được.

Các FIG. 5D đến FIG. 5F là hình ảnh thể hiện vùng nhiễm sắc thể ở nhiễm sắc thể cá thể được ưu tiên ở bước (3-6), trong trường hợp trong đó cá thể thế hệ con thu được ở bước (3-4) là (3d). Trong các hình này, phần đường kẻ đậm không tô màu thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, và phần đường kẻ đậm tô màu đen thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai. Trước tiên, từ những cá thể thế hệ con thu được ở bước (3-5) chọn lọc, cá thể thế hệ con (3j) trong đó các dấu chuẩn ADN M1 và M5 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, và các dấu chuẩn ADN M2, M3 và M4 là vùng dị nhiễm sắc; cá thể thế hệ con (3k) trong đó các dấu chuẩn ADN M1 và M5 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, và các dấu chuẩn ADN M2, M3 và M4 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai; cá thể thế hệ con (3l) trong đó dấu chuẩn ADN M5 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, các dấu chuẩn ADN M2, M3 và M4 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây

trồng ngoại lai, và dấu chuẩn ADN M1 là dị nhiễm sắc thể; một cách tương ứng. Trong bản mô tả này, cá thể thế hệ con (3k) là cây trồng mới mục tiêu được tạo ra bằng phương pháp thứ ba tạo ra cây trồng mới theo sáng chế, một đầu mút phía trước của mảnh nhiễm sắc thể L có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai nằm giữa các dấu chuẩn ADN M1 và M2, và đầu mút ở phía sau nằm giữa các dấu chuẩn ADN M4 và M5. Cá thể thế hệ con (3j) và (3l) được tự ghép đôi tiếp, một cách tương ứng, và có thể chọn lọc cá thể thế hệ con (3k) từ cá thể thế hệ con thu được.

Trong phương pháp thứ ba tạo ra cây trồng mới theo sáng chế, thậm chí khi tất cả cá thể thế hệ con (3a) đến (3f) được thể hiện ở FIG. 4A đến FIG. 4F được chọn lọc ở bước (3-4), bằng cách thực hiện các bước (3-7-1) và (3-7-2) sau đây trước bước (3-5), có thể thu được cá thể thế hệ con mục tiêu trong đó các dấu chuẩn ADN M1 và M5 là cá thể đồng nhiễm sắc gồm alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, và các dấu chuẩn ADN M2, M3 và M4 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai.

(3-7-1) Bước thu nhận cá thể thế hệ con bằng cách tự ghép đôi cá thể thế hệ con được chọn lọc ở bước (3-4).

(3-7-2) Bước chọn lọc (ii-1) cá thể thế hệ con trong đó dấu chuẩn ADN M1 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, và các dấu chuẩn ADN M2 và M3 là vùng dị nhiễm sắc gồm một alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu và một alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai; hoặc (ii-2) cá thể thế hệ con trong đó dấu chuẩn ADN M5 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, và các dấu chuẩn ADN M3 và M4 là vùng dị nhiễm sắc gồm một alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu và một alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, từ cá thể thế hệ con thu được ở bước (3-7-1); cá thể thế hệ con thu được bằng cách lai ngược cá thể thế hệ con thu được ở bước (3-7-1); hoặc cá thể thế hệ con thu được bằng cách ghép đôi ngược tiếp cá thể thế hệ con thu được bằng cách tự ghép đôi cá thể thế hệ con thu được ở bước (3-7-1).

Trong số những cá thể được chọn lọc ở bước (3-7-2), (ii-1) cá thể thế hệ con trong đó dấu chuẩn ADN M1 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, và các dấu chuẩn ADN M2 và M3 là vùng dị nhiễm sắc gồm một alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu và một alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai

tương ứng với cá thể thế hệ con (1a) được chọn lọc cuối cùng ở bước (1-4) của phương pháp thứ nhất tạo ra cây trồng mới theo sáng chế. Mặt khác, từ những cá thể chọn lọc ở bước (3-7-2), (ii-2) cá thể thế hệ con trong đó dấu chuẩn ADN M5 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, và các dấu chuẩn ADN M3 và M4 là vùng dị nhiễm sắc gồm một alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu và một alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai tương ứng với cá thể thế hệ con (2a) được chọn lọc cuối cùng ở bước (2-4) trong phương pháp thứ hai tạo ra cây trồng mới theo sáng chế. Do đó, cá thể được chọn lọc ở bước (3-7-2) là cá thể thế hệ con trong đó một đầu mút phía trước của mảnh nhiễm sắc thể L có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai nằm giữa các dấu chuẩn ADN M1 và M2, và đầu mút ở phía sau của nó nằm giữa các dấu chuẩn ADN M4 và M5, bằng cách thực hiện bước (3-5') và (3-6'), giống như các bước (1-5) và (1-6) của phương pháp thứ nhất tạo ra cây trồng mới theo sáng chế, hoặc các bước (2-5) và (2-6) của phương pháp thứ hai tạo ra cây trồng mới theo sáng chế. Tức là bằng cách chọn lọc ở bước (3-7-2), có thể thu được cây trồng mới mục tiêu được tạo ra bằng phương pháp thứ ba tạo ra cây trồng mới theo sáng chế.

Các FIG. 6A đến FIG. 9G là hình ảnh thể hiện vùng nhiễm sắc thể của cá thể thế hệ con tương đối được ưu tiên trong số những cá thể thế hệ con thu được ở bước (3-7-1). Trong các hình này, phần đường kẻ đậm không tô màu thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, và phần đường kẻ đậm tô màu đen thể hiện alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai. Cá thể thế hệ con (3a-a) trong đó dấu chuẩn ADN M1 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, và các dấu chuẩn ADN M2 đến M5 là vùng dị nhiễm sắc; và cá thể thế hệ con (3a-b) trong đó các dấu chuẩn ADN M1 và M2 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, và các dấu chuẩn ADN M3 đến M5 là vùng dị nhiễm sắc; là cá thể thế hệ con thu được bằng cách tự ghép đôi cá thể thế hệ con (3a) (tham khảo FIG. 6A và FIG. 6B).

Cá thể thế hệ con (3b-a) trong đó các dấu chuẩn ADN M1 và M2 là vùng dị nhiễm sắc, và các dấu chuẩn ADN M3 đến M5 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai; và cá thể thế hệ con (3b-b) trong đó dấu chuẩn ADN M1 là vùng dị nhiễm sắc, và các dấu chuẩn ADN M2 đến M5 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai; là cá thể thế hệ con thu được bằng cách tự ghép đôi cá thể thế hệ con (3b) (tham khảo FIG. 6C và FIG. 6D).

A cá thể thế hệ con (3c-a) trong đó dấu chuẩn ADN M1 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, các dấu chuẩn ADN M2 đến M4 là vùng dị nhiễm sắc, và dấu chuẩn ADN M5 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai; cá thể thế hệ con (3c-b) trong đó dấu chuẩn ADN M1 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, và các dấu chuẩn ADN M2 đến M5 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai; cá thể thế hệ con (3c-c) trong đó dấu chuẩn ADN M1 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, dấu chuẩn ADN M2 là vùng dị nhiễm sắc, và các dấu chuẩn ADN M4 và M5 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai; cá thể thế hệ con (3c-d) trong đó dấu chuẩn ADN M1 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, các dấu chuẩn ADN M2 và M3 là vùng dị nhiễm sắc, và các dấu chuẩn ADN M4 và M5 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai; cá thể thế hệ con (3c-e) trong đó dấu chuẩn ADN M1 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, các dấu chuẩn ADN M2 đến M4 là vùng dị nhiễm sắc, và dấu chuẩn ADN M5 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai; cá thể thế hệ con (3c-f) trong đó các dấu chuẩn ADN M1 và M2 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, dấu chuẩn ADN M3 là vùng dị nhiễm sắc, và các dấu chuẩn ADN M4 và M5 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai; và cá thể thế hệ con (3c-g) trong đó các dấu chuẩn ADN M1 và M2 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, các dấu chuẩn ADN M3 và M4 là vùng dị nhiễm sắc, và dấu chuẩn ADN M5 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai; là cá thể thế hệ con thu được bằng cách tự ghép đôi cá thể thế hệ con (3c) (tham khảo FIG. 7A đến FIG. 7G).

Ngoài ra, cá thể thế hệ con (3d-a) trong đó các dấu chuẩn ADN M1 đến M4 là vùng dị nhiễm sắc, và dấu chuẩn ADN M5 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu; và cá thể thế hệ con (3d-b) trong đó các dấu chuẩn ADN M1 đến M3 là vùng dị nhiễm sắc, và các dấu chuẩn ADN M4 và M5 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu; là cá thể thế hệ con thu được bằng cách tự ghép đôi cá thể thế hệ con (3d) (tham khảo FIG. 8A và FIG. 8B).

Cá thể thế hệ con (3e-a) trong đó các dấu chuẩn ADN M1 đến M4 là vùng đồng

nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, và dấu chuẩn ADN M5 là vùng dị nhiễm sắc; và cá thể thế hệ con (3e-b) trong đó các dấu chuẩn ADN M1 đến M3 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, và các dấu chuẩn ADN M4 và M5 là vùng dị nhiễm sắc; là cá thể thế hệ con thu được bằng cách tự ghép đôi cá thể thế hệ con (3e) (tham khảo FIG. 8C và FIG. 8D).

Cá thể thế hệ con (3f-a) trong đó dấu chuẩn ADN M1 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, các dấu chuẩn ADN M2 đến M4 là vùng dị nhiễm sắc, và dấu chuẩn ADN M5 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai; cá thể thế hệ con (3f-b) trong đó các dấu chuẩn ADN M1 đến M4 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, và dấu chuẩn ADN M5 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu; cá thể thế hệ con (3f-c) trong đó các dấu chuẩn ADN M1 và M2 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, dấu chuẩn ADN M4 là vùng dị nhiễm sắc, và dấu chuẩn ADN M5 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu; cá thể thế hệ con (3f-d) trong đó các dấu chuẩn ADN M1 và M2 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, các dấu chuẩn ADN M3 và M4 là vùng dị nhiễm sắc, và dấu chuẩn ADN M5 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu; cá thể thế hệ con (3f-e) trong đó dấu chuẩn ADN M1 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, các dấu chuẩn ADN M2 đến M4 là vùng dị nhiễm sắc, và dấu chuẩn ADN M5 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu; cá thể thế hệ con (3f-f) trong đó các dấu chuẩn ADN M1 và M2 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, dấu chuẩn ADN M3 là vùng dị nhiễm sắc, và các dấu chuẩn ADN M4 và M5 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu; và cá thể thế hệ con (3f-g) trong đó dấu chuẩn ADN M1 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, các dấu chuẩn ADN M2 và M3 là vùng dị nhiễm sắc, và các dấu chuẩn ADN M4 và M5 là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu; là cá thể thế hệ con thu được bằng cách tự ghép đôi cá thể thế hệ con (3f) (tham khảo FIG. 9A đến FIG. 9G).

Trong số những cá thể thế hệ con thu được ở bước (3-7-1), cá thể thế hệ con (3a-a) tương ứng với cá thể thế hệ con (1a) được thể hiện ở FIG. 2A, và cá thể thế hệ con

(3d-a) tương ứng với cá thể thể hệ con (2a) được thể hiện ở FIG. 3A. Do đó, những cá thể thể hệ con này có thể được chọn lọc để thực hiện bước tiếp theo (3-5').

Ngoài ra, khi những cá thể thể hệ con (3b-b), (3c-a), (3c-b), (3c-c), (3c-d), và (3c-e) được tự ghép đôi, một cách tương ứng, cá thể trong đó vùng nhiễm sắc thể tương ứng với vùng ở cá thể thể hệ con (1a) có thể được bao gồm trong những cá thể thể hệ con thu được bằng phương pháp tự ghép đôi này. Tương tự, khi những cá thể thể hệ con (3e-a), (3f-a), (3f-b), (3f-c), (3f-d), và (3f-e) được tự ghép đôi, một cách tương ứng, một cá thể trong đó vùng nhiễm sắc thể tương ứng với vùng của cá thể thể hệ con (2a) được bao gồm trong cá thể thể hệ con thu được bằng phương pháp tự ghép đôi này. Sau đó, có thể chọn lọc những cá thể thể hệ con này để thực hiện bước tiếp theo (3-5').

Mặt khác, khi cá thể thể hệ con (3b-a) được tự ghép đôi, trong số những cá thể thể hệ con thu được bằng phương pháp tự ghép đôi này, cá thể trong đó vùng nhiễm sắc thể tương ứng với vùng của cá thể thể hệ con (3b-b) có thể được tính đến. Tương tự, khi cá thể thể hệ con (3e-b) được tự ghép đôi, trong số những cá thể thể hệ con thu được bằng phương pháp tự ghép đôi này, cá thể trong đó vùng nhiễm sắc thể tương ứng với vùng của cá thể thể hệ con (3e-a) có thể được tính đến. Sau đó, những cá thể thể hệ con này tương ứng với cá thể thể hệ con (3b-b) hoặc (3e-a) được chọn từ các nhóm tự ghép đôi, và được tự ghép đôi tiếp. Và sau đó, trong số những cá thể thể hệ con thu được bằng phương pháp tự ghép đôi này, có thể chọn lọc cá thể trong đó vùng nhiễm sắc thể tương ứng với vùng của cá thể thể hệ con (1a) hoặc cá thể thể hệ con (2a) để thực hiện bước tiếp theo (3-5').

Trong những cá thể thể hệ con được chọn lọc ở bước (3-4), cá thể thể hệ con trong đó vị trí của điểm tái tổ hợp vào khoảng vùng một alen có nguồn gốc từ loài gốc và vùng một alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai là chưa biết, và vùng đích không được thay thế bằng mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai; và cá thể thể hệ con trong đó vùng đích chỉ được thay thế một phần bằng mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai; được tính đến. Sau đó, từ những cá thể thể hệ con được chọn lọc ở bước (3-4), chọn lọc cá thể thể hệ con trong đó vùng đích được thay thế bằng mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, và có thể sử dụng cá thể thể hệ con được chọn lọc này ở bước (3-5).

Trong bản mô tả này, việc chọn lọc cá thể thế hệ con trong đó vùng đích được thay thế bằng mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai có thể là chọn lọc bằng cách sử dụng dấu chuẩn ADN, hoặc có thể là chọn lọc bằng cách phát hiện tính trạng. Trong trường hợp chọn lọc bằng cách sử dụng dấu chuẩn ADN, chọn lọc cá thể thế hệ con trong đó dấu chuẩn ADN M3 là vùng dị nhiễm sắc gồm một alen có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu và một alen có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai. Trong trường hợp chọn lọc bằng cách phát hiện tính trạng, chọn lọc cá thể thế hệ con có tính trạng mục tiêu xuất hiện do việc thay thế bằng mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai. Khi số lượng cá thể thế hệ con thu được ở bước (3-3) là nhỏ, có thể thực hiện việc chọn lọc bằng cách phát hiện tính trạng.

Tốt hơn là cần kiểm tra liệu những cá thể thế hệ con được chọn lọc ở bước (1-6), (2-6) hoặc (3-6), tức là cây trồng mới được tạo ra bằng thứ nhất đến các phương pháp từ thứ nhất đến thứ ba tạo ra cây trồng mới theo sáng chế có tính trạng mục tiêu hay không. Ví dụ, hạt tự giao được gom từ những cá thể là cây trồng mới, và các hạt được trồng riêng thành quần thể. Bằng cách quan sát một cách thích hợp hoặc phân tích quần thể được trồng này, khẳng định sự có tính trạng mục tiêu và không có sự phân ly quần thể như là toàn thể.

Ngoài ra, trong các phương pháp từ thứ nhất đến thứ ba tạo ra cây trồng mới theo sáng chế, số lượng vùng đích có thể là một hoặc nhiều vùng. Trong trường hợp nhiều vùng đích, có thể thu được cá thể thế hệ con trong đó tất cả vùng đích được thay thế bằng mảnh đồng nhiễm sắc có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai bằng cách thực hiện lặp lại các bước nêu trên cho mỗi vùng đích.

Theo các phương pháp từ thứ nhất đến thứ ba tạo ra cây trồng mới theo sáng chế, có thể kiểm soát được vùng chứa mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai sẽ được đưa vào nhiễm sắc thể của cây trồng ban đầu, và có thể hạn chế một cách hiệu quả các gen khác không phải là vùng gen mục tiêu không cho vào nhiễm sắc thể của cây trồng ban đầu. Do đó, có thể tạo ra cây trồng mới có tính trạng mục tiêu mà không làm thay đổi tính trạng được ưa thích vốn có ở cây trồng ban đầu. Vì lý do này, ở các cây trồng được tạo ra bằng các phương pháp từ thứ nhất đến thứ ba tạo ra cây trồng mới theo sáng chế, hiệu quả của việc cải thiện tính trạng của cây trồng ban đầu bằng cách đưa mảnh nhiễm sắc thể vào nhiễm sắc thể có thể được quyết định với độ

tin cậy rất cao.

Theo các phương pháp từ thứ nhất đến thứ ba tạo ra cây trồng mới theo sáng chế, thông qua bước cụ thể chẳng hạn như các bước (1-1) đến (1-6), có thể tạo ra cây trồng trong đó vùng mã hoá gen mục tiêu là vùng đích, và chỉ chứa vùng ngắn gồm các gen khác không phải là gen mục tiêu này, được thay thế bằng mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai.

Ví dụ, trong hệ gen của cây lúa, về mặt lý thuyết, chỉ khác là trung bình là vùng nhiễm sắc thể có kích cỡ 12 Mbp hoặc nhiều hơn, sự lai chéo của nhiễm sắc thể xảy ra đồng thời ở 2 điểm, và về mặt lý thuyết không thể thu được sự tái tổ hợp trong đó vùng này được kết hợp lại do sự nhiễu vát chéo. Do đó, xác suất tồn tại của cá thể thể hệ con trong đó chỉ một vùng chỉ ra rất ngắn được thay thế là rất nhỏ. Vì lý do này, khi dấu chuẩn ADN chỉ được thiết lập cho vùng mong muốn và việc chọn lọc được thực hiện bằng phương pháp MAS đã biết bằng cách sử dụng dấu chuẩn ADN như là dấu hiệu, cần thiết rằng quần thể chọn lọc là ở quy mô lớn. Vì lý do này, công sức và chi phí cần thiết cho quá trình chọn lọc trở nên quá lớn. Ngoài ra, vì số lượng hạt có thể được thu hoạch từ một cây lúa là có giới hạn, nên có nhiều khả năng là có thể không thu được cá thể thể hệ con mong muốn thậm chí khi lặp lại việc sàng lọc nhiều lần.

Ngược lại, các phương pháp từ thứ nhất đến thứ ba tạo ra cây trồng mới theo sáng chế cho phép tạo ra cá thể thể hệ con trong đó chỉ vùng mảnh nhiễm sắc thể được thay thế như được thiết kế trong khi giữ quần thể chọn lọc ở kích thước phổ biến.

Ngoài ra, trong các phương pháp từ thứ nhất đến thứ ba tạo ra cây trồng mới theo sáng chế, các dấu chuẩn ADN tương ứng từ M1 đến M5 được thiết lập cho vùng đích là thông tin hệ gen đặc biệt cho cây trồng được tạo ra bằng các phương pháp này. Do đó, có thể phân biệt cây trồng được tạo ra bằng các phương pháp từ thứ nhất đến thứ ba tạo ra cây trồng mới theo sáng chế bằng cách sử dụng các dấu chuẩn ADN này.

Cụ thể, phương pháp phân biệt cây trồng thực vật theo sáng chế là phương pháp phân biệt liệu một cá thể thực vật có phải là cây trồng cụ thể tạo ra bằng cách sử dụng các phương pháp từ thứ nhất đến thứ ba tạo ra cây trồng mới theo sáng chế, trong đó một hoặc nhiều dấu chuẩn ADN được chọn từ nhóm bao gồm các dấu chuẩn ADN từ M1 đến M5 được định typ bằng cách phân tích hệ gen của cá thể thực vật này và, khi kết quả định typ là phù hợp với kết quả của cây trồng cụ thể, xác định được rằng cá thể

thực vật này là cây trồng cụ thể.

Trong bản mô tả này, năm dấu chuẩn ADN từ M1 đến M5 được thiết kế đối với mỗi một vùng đích, nhưng có thể sử dụng tất cả các dấu chuẩn ADN này từ M1 đến M5, và có thể sử dụng một số dấu chuẩn ADN này để phân biệt một cây trồng. Ví dụ, có thể sử dụng chỉ các dấu chuẩn ADN M1 và M2 là điểm tái tổ hợp ở phía trước của vùng đích, có thể sử dụng chỉ các dấu chuẩn ADN M4 và M5 là điểm tái tổ hợp ở phía sau của vùng đích, hoặc có thể sử dụng chỉ các dấu chuẩn ADN M2 và M4 chứa vùng đích trong đó. Theo cách khác, khi số lượng vùng đích là số nhiều, có thể sử dụng các dấu chuẩn ADN của vùng đích tương ứng một cách thích hợp bằng cách kết hợp. Bằng cách kết hợp một cách thích hợp nhiều dấu chuẩn ADN, có thể phân biệt cây trồng một cách chặt chẽ hơn.

Các cá thể cây trồng được tạo ra bằng các phương pháp từ thứ nhất đến thứ ba tạo ra cây trồng mới theo sáng chế (sau đây, được gọi là cây trồng thứ nhất theo sáng chế trong một số trường hợp) có thể được cho ghép đôi để thu được cá thể thế hệ con như là cá thể của cây trồng ban đầu được sử dụng để tạo ra cá thể này. Đặc biệt, tốt hơn là thu được cá thể thế hệ con bằng cách ghép đôi hai cá thể được chọn từ nhóm bao gồm cá thể của cây trồng thứ nhất theo sáng chế và cá thể thế hệ con của cây trồng thứ nhất này. Theo sáng chế, tốt hơn là hai cá thể này là sao cho ít nhất một vùng đích là khác với vùng khác. Ngoài ra, tốt hơn là cá thể thế hệ con được thu nhận bằng cách ghép đôi sao cho nhiều vùng đích ở nhiễm sắc thể của cây trồng ban đầu được thay thế bằng mảnh đồng nhiễm sắc có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai.

Sau đây, phương pháp thứ tư tạo ra cây trồng mới theo sáng chế sẽ được giải thích. Trong phương pháp thứ tư tạo ra cây trồng mới theo sáng chế này, trong số những cá thể của cây trồng thứ nhất theo sáng chế được tạo ra bằng các phương pháp từ thứ nhất đến thứ ba tạo ra cây trồng mới theo sáng chế, hai cá thể trong đó ít nhất một vùng đích là khác với vùng đích khác được ghép đôi như là cá thể cha mẹ. Nhờ đó, có thể tạo ra cây trồng mới có hệ gen trong đó các vùng được thay thế bằng mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai có trong mỗi cá thể cha mẹ được tích lũy.

Tức là, phương pháp thứ tư tạo ra cây trồng mới theo sáng chế gồm các bước: (4-1) bước sử dụng cá thể của cây trồng thứ nhất theo sáng chế như là cây mẹ là cây

mang hạt, và một cá thể là cây trồng thứ nhất theo sáng chế trong đó ít nhất một vùng đích là khác với cây mẹ là cây mang hạt này như là cây cha là cây cho phần, và ghép đôi giữa cây mẹ là cây mang hạt và cây cha là cây cho phần để thu được cá thể thế hệ con; (4-2) bước tự ghép đôi cá thể thế hệ con thu được ở bước (4-1) để thu được cá thể thế hệ con; (4-3) bước chọn lọc cá thể thế hệ con trong đó, ở nhiễm sắc thể của cây trồng ban đầu, tất cả các vùng đích mà cây mẹ là cây mang hạt sở hữu và vùng đích mà cây cha là cây cho phần sở hữu được thay thế bằng đồng nhiễm sắc có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, từ cá thể thế hệ con thu được ở bước (4-2).

Ngoài ra, phương pháp thứ tư tạo ra cây trồng mới theo sáng chế có thể có thêm các bước sau bước (4-3): (4-4) bước chọn lọc hai cá thể trong đó ít nhất một vùng đích là khác với vùng đích kia, như là cây mẹ là cây mang hạt và cây cha là cây cho phần, từ nhóm bao gồm cá thể là cây trồng thứ nhất theo sáng chế và cá thể được chọn lọc ở bước (4-3), và ghép đôi giữa chúng để thu được cá thể thế hệ con; (4-5) bước tự ghép đôi cá thể thế hệ con thu được ở bước (4-4) để thu được cá thể thế hệ con; (4-6) bước chọn lọc cá thể thế hệ con trong đó, ở nhiễm sắc thể của cây trồng ban đầu, tất cả vùng đích mà cây mẹ là cây mang hạt sở hữu và vùng đích mà cây cha là cây cho phần sở hữu được thay thế bằng mảnh đồng nhiễm sắc có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, từ các cá thể thế hệ con thu được ở bước (4-5); (4-7) bước lặp lại các bước từ (4-4) đến (4-6) một hoặc nhiều lần.

Ngoài ra, trong mỗi cá thể thế hệ con thu được bằng phương pháp thứ tư tạo ra cây trồng mới theo sáng chế, có thể phân biệt liệu mỗi vùng đích có phải là mảnh đồng hợp tử có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai hay không bằng cách sử dụng các dấu chuẩn ADN từ M1 đến M5 được sử dụng trong phương pháp tạo ra cây trồng thứ nhất theo sáng chế.

Trong phương pháp cải thiện cây trồng trước đây bằng cách lai ngược và phương pháp MAS, không thể kiểm soát được chiều dài của mảnh nhiễm sắc thể sẽ được đưa vào ở nhiễm sắc thể của cây trồng ban đầu, như đã nêu trên. Vì lý do này, nhiều gen có chức năng chưa biết đến ngoài ra gen mục tiêu được đưa vào cùng nhiễm sắc thể của cây trồng ban đầu. Vì số lượng mảnh nhiễm sắc thể được đưa vào tăng lên, nên số lượng gen được đưa vào có chức năng chưa biết cũng tăng lên. Do đó, khi ta cố gắng cải thiện nhiều tính trạng bằng cách ghép đôi, nảy sinh ra một vấn đề là chẳng hạn như

là sự suy giảm kém đi một tính trạng không phải là tính trạng mục tiêu cần được cải thiện. Ngoài ra, vì thế, vì có nhiều khả năng là nhiều gen không biết được đưa vào, tính trạng mục tiêu không nhất thiết được cải thiện bằng mảnh nhiễm sắc thể được chủ định đưa vào (vùng đích chứa mảnh nhiễm sắc thể). Vì lý do này, thậm chí trong trường hợp cá thể thế hệ con có mảnh nhiễm sắc thể chứa vùng đích, thu được nhiều cá thể có các tính trạng mục tiêu không được cải thiện. Ngoài ra, các dấu chuẩn ADN được sử dụng trong quá trình chọn lọc này chỉ được liên kết với mảnh nhiễm sắc thể của vùng đích trong cây trồng ban đầu. Vì lý do này, các nhiễm sắc thể được phân bố ngẫu nhiên sau nhiều lần ghép đôi giữa những cá thể thực vật và, kết quả là, các dấu chuẩn ADN trở nên là không liên kết với mảnh nhiễm sắc thể của vùng đích. Do đó, khi sử dụng dấu chuẩn ADN, trong nhiều trường hợp không thể chọn lọc được cá thể thế hệ con có mảnh nhiễm sắc thể của vùng đích.

Ví dụ, bằng phương pháp ghép đôi trước đây, ghép đôi cá thể P1 (A) trong đó mảnh đồng nhiễm sắc của vùng đích A có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai được đưa vào nhiễm sắc thể của cây trồng ban đầu, và cá thể P1 (B) trong đó mảnh đồng nhiễm sắc của vùng đích B có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai được đưa vào nhiễm sắc thể của cây trồng ban đầu, và tự ghép đôi cá thể thế hệ con thu được. Nhờ đó, thu được cá thể P2 (AB) trong đó cả hai vùng đích A và B có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai là đồng hợp tử ở nhiễm sắc thể của cây trồng ban đầu. Trên cơ sở đó, khi vùng đích A và B là độc lập với nhau, và tuân theo quy luật Mendel, có thể chọn lọc được cá thể P2 (AB) từ cá thể thế hệ con thu được bằng cách tự ghép đôi về mặt lý thuyết với xác suất là 1/16. Tuy nhiên, không nhất thiết là cải thiện được cá thể chọn lọc P2 (AB) về hai tính trạng mục tiêu và, dù rằng các tính trạng mục tiêu có được cải thiện, thì trong nhiều trường hợp suy giảm các tính trạng khác. Vấn đề này trở nên càng nghiêm trọng khi số lượng vùng đích đưa vào trở nên lớn hơn và, thật ra, rất khó cải thiện ba hoặc nhiều tính trạng hơn.

Ngược lại, trong những cá thể cây trồng được tạo ra bằng các phương pháp từ thứ nhất đến thứ ba tạo ra cây trồng mới theo sáng chế, và những cá thể thế hệ con trong số đó, việc đưa vùng nhiễm sắc thể vào một vùng không phải là vùng đích có thể bị ức chế ở mức nhiều nhất có thể. Vì lý do này, có nhiều khả năng là một tính trạng khác với tính trạng của cây trồng ban đầu là tác động của mảnh nhiễm sắc thể vùng đích

được đưa vào có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai. Do đó, như phương pháp thứ tư tạo ra cây trồng mới theo sáng chế, ví dụ, khi ghép đôi cá thể P1 (A) trong đó mảnh đồng nhiễm sắc của vùng đích A có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai được đưa vào nhiễm sắc thể của cây trồng ban đầu theo các phương pháp từ thứ nhất đến thứ ba tạo ra cây trồng mới theo sáng chế; và cá thể P1 (B) trong đó mảnh đồng nhiễm sắc của vùng đích B có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai được đưa vào theo cách tương tự, nhờ đó thu được cá thể P2 (AB) trong đó cả hai vùng đích A và B có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai là đồng hợp tử. Trong cá thể P2 (AB) này, có thể dự tính thích hợp rằng cả hai tính trạng gồm tính trạng được cải thiện A có ở cá thể P1 (A) và tính trạng được cải thiện B có ở cá thể P1 (B) được cải thiện mà không làm thay đổi tính trạng được ưa thích có ở cây trồng ban đầu khác. Tương tự như vậy, bằng cách sử dụng phương pháp thứ tư tạo ra cây trồng mới theo sáng chế, có thể liên tiếp tích lũy các tính trạng được cải thiện bằng cách ghép đôi, và có thể cải thiện ba hoặc nhiều tính trạng hơn một cách đơn giản và với quá trình hiệu quả cao.

Ngoài ra, các dấu chuẩn ADN từ M1 đến M5 được sử dụng cho việc chọn lọc là các dấu chuẩn ADN ở trong vùng đích hoặc nằm kề cận vùng đích. Vì lý do này, thậm chí khi ghép đôi được lặp lại nhiều lần như trường hợp sử dụng phương pháp thứ tư tạo ra cây trồng mới theo sáng chế, có thể đủ chọn lọc cá thể thế hệ con có mảnh nhiễm sắc thể của vùng đích bằng cách sử dụng các dấu chuẩn ADN từ M1 đến M5 này.

Ví dụ, cá thể P1 (A) là cá thể là cây trồng thứ nhất theo sáng chế và trong đó mảnh đồng nhiễm sắc của vùng đích A có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai được đưa vào nhiễm sắc thể của cây trồng ban đầu được sử dụng như là cây mẹ là cây mang hạt, và cá thể P1 (B) là cá thể là cây trồng thứ nhất theo sáng chế và trong đó mảnh đồng nhiễm sắc của vùng đích B có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai được đưa vào nhiễm sắc thể của cây trồng ban đầu được sử dụng như là cây cha là cây cho phấn. Và, ghép đôi P1 (A) và P1 (B), tự ghép đôi cá thể thế hệ con thu được để thu được cá thể thế hệ con. Và sau đó, từ cá thể thế hệ con thu được bằng phương pháp tự ghép đôi này, chọn lọc cá thể P2 (AB) trong đó, ở nhiễm sắc thể của cây trồng ban đầu, tất cả vùng đích A và B được thay thế bằng mảnh đồng nhiễm sắc có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai. Nhờ đó, có thể tạo ra cây trồng mới. Trong bản mô tả này, khi các vùng đích A và B là

độc lập với nhau mà không có liên kết, và theo quy luật Mendel, có thể chọn lọc được cá thể P2 (AB) từ cá thể thế hệ con thu được bằng cách tự ghép đôi với xác suất là 1/16.

Ngoài ra, ghép đôi cá thể thế hệ con thu được như vậy P2 (AB), và cá thể P1 (C) trong đó mảnh đồng nhiễm sắc của vùng đích C có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai được đưa vào nhiễm sắc thể của cây trồng ban đầu để thu được cá thể thế hệ con. Sau đó, cá thể thế hệ con thu được này được tự ghép đôi và, từ cá thể thế hệ con thu được bằng phương pháp tự ghép đôi này, chọn lọc cá thể P3 (ABC) trong đó, ở nhiễm sắc thể của cây trồng ban đầu, tất cả các vùng đích A, B và C được thay thế bằng mảnh đồng nhiễm sắc có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai. Nhờ đó, có thể tạo ra cây trồng mới. Trong bản mô tả này, khi vùng đích A, B và C là độc lập với nhau mà không có sự liên kết, và theo quy luật Mendel, có thể chọn lọc được cá thể P3 (ABC) từ cá thể thế hệ con thu được bằng cách tự ghép đôi với xác suất là 1/64.

Cũng có thể tạo ra cá thể P3 (ABC) trong đó tất cả các vùng đích A, B và C được thay thế bằng mảnh đồng nhiễm sắc có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, ví dụ bằng phương pháp sau đây. Trước hết, ghép đôi P1 (B) và P1 (C) để thu được cá thể thế hệ con, và tự ghép đôi cá thể thế hệ con thu được. Từ cá thể thế hệ con thu được bằng phương pháp tự ghép đôi này, chọn lọc cá thể P2 (BC) trong đó, ở nhiễm sắc thể của cây trồng ban đầu, vùng đích B và C được thay thế bằng mảnh đồng nhiễm sắc có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai. Trong bản mô tả này, khi vùng đích B và C là độc lập với nhau mà không có sự liên kết, và theo quy luật Mendel, có thể chọn lọc cá thể P2 (BC) từ những cá thể thế hệ con thu được bằng cách tự ghép đôi với xác suất là 1/16. Sau đó, ghép đôi P2 (AB) và P2 (BC) để thu được cá thể thế hệ con, và sau đó tự ghép đôi cá thể thế hệ con này. Từ cá thể thế hệ con thu được, chọn lọc P3 (ABC), nhờ đó, có thể tạo ra P3 (ABC). Trong cả P2 (AB) và P2 (BC), vùng đích B là đồng hợp tử có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai. Do đó, khi vùng đích A, B và C là độc lập tương ứng với nhau mà không có liên kết, và theo quy luật Mendel, có thể chọn lọc cá thể P3 (ABC) từ cá thể thế hệ con thu được bằng cách tự ghép đôi với xác suất là 1/16.

FIG. 10A và FIG. 10B là lược đồ thể hiện phương pháp tạo ra cây trồng trong đó, ở nhiễm sắc thể của cây trồng ban đầu, ba vùng đích (vùng đích A, B, C) được thay thế bằng mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai. Trong các hình này,

hình vuông biểu thị mỗi cá thể, và chữ cái trong hình vuông này biểu thị là mỗi vùng đích được thay thế bằng mảnh đồng nhiễm sắc có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai. Trong hình chóp trong đó các hình vuông được xếp vào, một hình vuông được xếp ở bậc trên hai hình vuông. Điều này có nghĩa là hai hình vuông ở bậc dưới là cá thể cha mẹ, và một hình vuông ở bậc trên là cá thể thế hệ con thu được bằng cách ghép đôi. Ngoài ra, con số ở phía bên trái của hình chóp trong đó các hình vuông được xếp vào biểu thị xác suất thu nhận mỗi cá thể thế hệ con khi vùng đích tương ứng là độc lập tương ứng mà không có liên kết, và theo quy luật Mendel.

FIG. 10A thể hiện phương pháp tạo ra P3 (ABC) bằng cách ghép đôi P2 (AB) và P1 (C) nêu trên. FIG. 10B thể hiện phương pháp tạo ra P3 (ABC) bằng cách ghép đôi P2 (AB) và P2 (BC) nêu trên. Tương tự như vậy, bằng cách ghép đôi liên tiếp giữa những cá thể trong đó ít nhất một vùng đích là khác với vùng đích trong các cây trồng được tạo ra bằng cách sử dụng các phương pháp từ thứ nhất đến thứ ba tạo ra cây trồng mới theo sáng chế và những cá thể thế hệ con của chúng, tích lũy được nhiều dạng vùng đích được thay thế bằng mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai trong cá thể thế hệ con. Vì vậy, a cây trồng trong đó, ở nhiễm sắc thể của cây trồng ban đầu, cũng có thể tạo ra bốn hoặc nhiều vùng đích hơn được thay thế bằng mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai.

Trong bản mô tả này, sẽ mô tả trường hợp sản xuất ra cây trồng P4 (ABCD) trong đó, ở nhiễm sắc thể của cây trồng ban đầu, bốn vùng đích (các vùng đích A, B, C, D) được thay thế bằng mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai. Trước hết, ví dụ, ghép đôi cá thể P2 (AB) trong đó vùng đích A và B được thay thế bằng mảnh đồng nhiễm sắc có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, và cá thể P2 (CD) trong đó vùng đích C và D được thay thế bằng mảnh đồng nhiễm sắc có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai để thu được cá thể thế hệ con. Sau đó, bằng cách chọn lọc P4 (ABCD) từ những cá thể thế hệ con thu được bằng cách tự ghép đôi cá thể thế hệ con này, có thể tạo ra P4 (ABCD). Do đó, khi vùng đích A, B, C và D là độc lập tương ứng mà không có liên kết, và theo quy luật Mendel, có thể chọn lọc cá thể P4 (ABCD) từ cá thể thế hệ con thu được bằng cách tự ghép đôi, với xác suất là 1/256. Tương tự, trong trường hợp tạo ra cây trồng P5 (ABCDE) trong đó năm vùng đích (vùng đích A, B, C, D, E) được thay thế bằng mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ cây trồng ngoại

lai, trước hết, ví dụ, ghép đôi cá thể P3 (ABC) trong đó vùng đích A, B, C được thay thế bằng mảnh đồng nhiễm sắc có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, và cá thể P2 (BD) trong đó vùng đích B và E được thay thế bằng mảnh đồng nhiễm sắc có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai để thu được cá thể thế hệ con và tự ghép đôi cá thể thế hệ con này. Sau đó, bằng cách chọn lọc P5 (ABCDE) từ những cá thể thế hệ con thu được bằng phương pháp tự ghép đôi này, có thể tạo ra P5 (ABCDE). Do đó, khi vùng đích A, B, C, D và E là độc lập tương ứng mà không có liên kết, và tuân theo quy luật Mendel, thì có thể chọn lọc cá thể P5 (ABCDE) từ cá thể thế hệ con thu được bằng cách tự ghép đôi, với xác suất là $1/1024$.

Tuy nhiên, thông thường, khi thu được cá thể thế hệ con mục tiêu, số lượng của quần thể chọn lọc (nhóm những cá thể thế hệ con thu được bằng cách tự ghép đôi) được thiết lập là vào khoảng gấp từ vài đến 10 lần xác suất tồn tại của cá thể thế hệ con mục tiêu. Khi số lượng của quần thể chọn lọc là không đủ, có nhiều khả năng là không thu được cá thể thế hệ con mục tiêu. Mặt khác, thông thường, số lượng hạt mà có thể gom được từ một cá thể là bị giới hạn. Ví dụ, ở cây lúa, chỉ có thể đảm bảo có 1000 hạt từ một cá thể. Ngoài ra, cây lúa là một cây yếu, và đôi khi chỉ thu được vài chục hạt từ mỗi cây. Ngoài ra, khi số lượng của quần thể được chọn lọc lớn hơn, thì thời gian, công sức lao động và chi phí cần thiết trở nên lớn. Vì lý do này, cho rằng thật ra rất khó thực hiện phương pháp sản xuất trong đó xác suất thu nhận cá thể thế hệ con mục tiêu là $1/1024$ hoặc cao hơn.

Trong phương pháp thứ tư tạo ra cây trồng mới theo sáng chế, bằng cách ghép đôi liên tiếp giữa cá thể thế hệ con được chọn lọc, có thể tích lũy vùng đích được thay thế bằng mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai ở cá thể thế hệ con đó. Do đó, có thể tạo ra cây trồng mới sao cho xác suất có mặt của cá thể thế hệ con mục tiêu trong một quần thể được chọn lọc là $1/256$ đến $1/16$.

Ví dụ như, liên quan đến trường hợp trong đó vùng đích A, B, C và D là độc lập tương ứng mà không có liên kết, và theo quy luật Mendel, sẽ mô tả phương pháp tạo ra P4 (ABCD) (tham khảo FIG. 11A đến FIG. 11C). Trước hết, tạo ra P2 (AB) và P2 (CD) theo cùng một phương pháp như phương pháp nêu trên tạo ra P2 (AB). Sau đó, ghép đôi P2 (AB) và P2 (CD) để thu được cá thể thế hệ con, và tự ghép đôi cá thể thế hệ con này. Sau đó, bằng cách chọn lọc P4 (ABCD) từ những cá thể thế hệ con thu

được bằng phương pháp tự ghép đôi này, có thể tạo ra P4 (ABCD) (tham khảo FIG. 11A). Trong trường hợp này, về mặt lý thuyết, có thể chọn lọc được P4 (ABCD) từ quần thể được chọn lọc với xác suất là $1/256$.

Theo cách khác, ghép đôi P2 (AB), và P3 (BCD) được tạo ra theo cùng một phương pháp như phương pháp nêu trên tạo ra P3 (ABC) để thu được cá thể thế hệ con, và tự ghép đôi cá thể thế hệ con này. Từ cá thể thế hệ con thu được bằng phương pháp tự ghép đôi này, có thể chọn lọc P4 (ABCD) (tham khảo FIG. 11B). Cả hai P2 (AB) và P3 (BCD) là sao cho vùng đích B là đồng hợp tử có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai. Vì lý do này, về mặt lý thuyết, có thể chọn lọc P4 (ABCD) từ quần thể được chọn lọc với xác suất là $1/64$.

Ngoài ra, sau khi ghép đôi P3 (ABC) và P3 (BCD) được tạo ra theo cùng một phương pháp như phương pháp P3 (BCD) để thu được cá thể thế hệ con, có thể chọn lọc P4 (ABCD) từ những cá thể thế hệ con thu được bằng cách tự ghép đôi cá thể thế hệ con này (tham khảo FIG. 11C). Cả hai P3 (ABC) và P3 (BCD) là sao cho vùng đích B và C là đồng hợp tử có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai. Vì lý do này, về mặt lý thuyết, có thể chọn lọc P4 (ABCD) từ quần thể được chọn lọc với xác suất là $1/16$.

Tức là, theo phương pháp tạo ra cây trồng mới theo sáng chế, thậm chí khi số lượng vùng đích là 4, có thể chọn lọc cây trồng mới mục tiêu với xác suất cao hơn phương pháp đã biết.

Ngoài ra, ví dụ, liên quan đến trường hợp trong đó vùng đích, A, B, C, D và E là độc lập tương ứng mà không có liên kết, và theo quy luật Mendel, sẽ mô tả phương pháp tạo ra P5 (ABCDE) (tham khảo FIG. 12A đến FIG. 12D). Trước hết, ghép đôi P2 (AB) và P3 (CDE) để thu được cá thể thế hệ con và tự ghép đôi cá thể thế hệ con này. Sau đó, bằng cách chọn lọc P5 (ABCDE) từ những cá thể thế hệ con thu được bằng phương pháp tự ghép đôi này, có thể tạo ra P5 (ABCDE) (tham khảo FIG. 12A). Trong trường hợp này, về mặt lý thuyết, có thể chọn lọc P5 (ABCDE) từ quần thể được chọn lọc với xác suất là $1/1024$.

Trái lại, trong trường hợp sau đây, xác suất chọn lọc P5 (ABCDE) được cải thiện.

Tạo ra P3 (ABC) và P3 (CDE) theo cùng một phương pháp như phương pháp nêu trên tạo ra P3 (ABC), một cách tương ứng. Sau đó, ghép đôi P3 (ABC) và P3

(CDE) này để thu được cá thể thế hệ con và tự ghép đôi cá thể thế hệ con này. Ngoài ra, bằng cách chọn lọc P5 (ABCDE) từ những cá thể thế hệ con thu được bằng phương pháp tự ghép đôi này, có thể tạo ra P5 (ABCDE) (tham khảo FIG. 12B). Cả hai P3 (ABC) và P3 (CDE) là sao cho vùng đích C là đồng hợp tử có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai. Vì lý do này, trong trường hợp này, về mặt lý thuyết, có thể chọn lọc P5 (ABCDE) từ quần thể được chọn lọc với xác suất là $1/256$.

Theo cách khác, tạo ra P3 (ABC) cùng một phương pháp như phương pháp nêu trên tạo ra P3 (ABC), và tạo ra P4 (BCDE) theo cùng một phương pháp như phương pháp nêu trên tạo ra P4 (ABCD). Sau đó, ghép đôi P3 (ABC) và P4 (BCDE) này để thu được cá thể thế hệ con và tự ghép đôi cá thể thế hệ con này. Từ những cá thể thế hệ con thu được bằng phương pháp tự ghép đôi này, có thể chọn lọc P5 (ABCDE) (tham khảo FIG. 12C). Cả hai P3 (ABC) và P4 (BCDE) là sao cho vùng đích B và C là đồng hợp tử có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai. Vì lý do này, về mặt lý thuyết, có thể chọn lọc P5 (ABCDE) từ quần thể được chọn lọc với xác suất là $1/64$.

Ngoài ra, theo cùng một phương pháp như phương pháp nêu trên tạo ra P4 (ABCD), tạo ra P4 (ABCD) và P4 (BCDE), một cách tương ứng. Sau đó, ghép đôi các P4 (ABCD) và P4 (BCDE) này để thu được cá thể thế hệ con và tự ghép đôi cá thể thế hệ con này. Ngoài ra, từ những cá thể thế hệ con thu được bằng phương pháp tự ghép đôi này, có thể chọn lọc P5 (ABCDE) (tham khảo FIG. 12D). Cả hai P4 (ABCD) và P4 (BCDE) là sao cho vùng đích B, C và D là đồng hợp tử có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai. Vì lý do này, trong trường hợp này, về mặt lý thuyết, có thể chọn lọc P5 (ABCDE) từ quần thể được chọn lọc với xác suất là $1/16$.

Tức là theo phương pháp tạo ra cây trồng mới theo sáng chế, thậm chí khi số lượng vùng đích là 5, có thể chọn lọc cây trồng mới mục tiêu với xác suất cao hơn phương pháp đã biết.

Ngoài ra, ví dụ, liên quan đến trường hợp trong đó vùng đích A, B, C, D, E và F là độc lập tương ứng mà không có liên kết, và theo quy luật Mendel, sẽ mô tả phương pháp tạo ra P6 (ABCDEF) (tham khảo FIG. 13A to FIG. 13E). Ví dụ, sau khi P3 (ABC) và P3 (DEF) được ghép đôi để thu được cá thể thế hệ con, tự ghép đôi cá thể thế hệ con này. Bằng cách chọn lọc P6 (ABCDEF) từ những cá thể thế hệ con thu được bằng phương pháp tự ghép đôi này, có thể tạo ra P6 (ABCDEF) (tham khảo FIG.

13A). Trong trường hợp này, về mặt lý thuyết, xác suất mà có thể chọn lọc P6 (ABCDEF) từ quần thể được chọn lọc là 1/4096.

Theo cách khác, sau khi ghép đôi P3 (ABC) và P4 (CDEF) để thu được cá thể thế hệ con, tự ghép đôi cá thể thế hệ con này để thu được những cá thể thế hệ con. Bằng cách chọn lọc P6 (ABCDEF) từ các cá thể thế hệ con thu được bằng cách tự ghép đôi, cũng có thể tạo ra P6 (ACBDEF) (tham khảo FIG. 13B). Trong trường hợp này, về mặt lý thuyết, xác suất mà có thể chọn lọc P6 (ABCDEF) từ quần thể được chọn lọc là 1/1024.

Trái lại, trong trường hợp sau đây, xác suất chọn lọc P6 (ABCDEF) được cải thiện.

Trước hết, tạo ra P4 (ABCD) và P4 (CDEF) theo cùng một phương pháp như phương pháp nêu trên tạo ra P4 (ABCD), một cách tương ứng. Sau đó, ghép đôi các P4 (ABCD) và P4 (CDEF) này để thu được cá thể thế hệ con và tự ghép đôi cá thể thế hệ con này. Ngoài ra, bằng cách chọn lọc P6 (ABCDEF) từ những cá thể thế hệ con thu được bằng phương pháp tự ghép đôi này, có thể tạo ra P6 (ABCDEF) (tham khảo FIG. 13C). Do đó, về mặt lý thuyết, có thể chọn lọc P6 (ABCDEF) từ quần thể được chọn lọc với xác suất là 1/256. Điều này là bởi vì cả hai P4 (ABCD) và P4 (CDEF) là sao cho vùng đích C và D là đồng hợp tử có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai.

Theo cách khác, tạo ra P4 (ABCD) theo cùng một phương pháp như phương pháp nêu trên tạo ra P4 (ABCD), và tạo ra P5 (BCDEF) theo cùng một phương pháp như phương pháp nêu trên tạo ra P5 (ABCDE). Sau đó, sau khi ghép đôi P4 (ABCD) và P5 (BCDEF) này để thu được cá thể thế hệ con, tự ghép đôi cá thể thế hệ con này. Bằng cách chọn lọc P6 (ABCDEF) từ những cá thể thế hệ con thu được bằng phương pháp tự ghép đôi này, cũng có thể tạo ra P6 (ABCDEF) (tham khảo FIG. 13D). Cả hai P4 (ABCD) và P5 (BCDEF) là sao cho vùng đích B, C và D là đồng hợp tử có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai. Vì lý do này, trong trường hợp này, về mặt lý thuyết, có thể chọn lọc P5 (ABCDE) từ quần thể được chọn lọc với xác suất là 1/64.

Theo cách khác, tạo ra P5 (ABCDE) và P5 (BCDEF) theo cùng một phương pháp như phương pháp nêu trên tạo ra P5 (ABCDE), một cách tương ứng. Sau đó, sau khi ghép đôi P5 (ABCDE) và P5 (BCDEF) để thu được cá thể thế hệ con, tự ghép đôi cá thể thế hệ con này. Bằng cách chọn lọc P6 (ABCDEF) từ những cá thể thế hệ con

thu được bằng phương pháp tự ghép đôi này, cũng có thể tạo ra P6 (ABCDEF) (tham khảo FIG. 13E). Cả hai P5 (ABCDE) và P5 (BCDEF) là sao cho vùng đích B, C, D và E là đồng hợp tử có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai. Vì lý do này, trong trường hợp này, về mặt lý thuyết, có thể chọn lọc P6 (ABCDEF) từ quần thể được chọn lọc với xác suất là 1/16.

Tức là theo phương pháp tạo ra cây trồng mới theo sáng chế, thậm chí khi số lượng vùng đích là 6, có thể chọn lọc cây trồng mới mục tiêu với xác suất cao hơn phương pháp đã biết.

Như đã nêu trên, trong trường hợp thực vật trong đó số lượng cá thể thể hệ con thu được qua một lần ghép đôi là tương đối nhỏ, chẳng hạn như cây lúa, tốt hơn là tạo ra cây trồng mới sao cho xác suất có mặt của cá thể thể hệ con mục tiêu trong quần thể chọn lọc mỗi lần là từ 1/64 đến 1/16. Tức là bằng cách ghép đôi liên tiếp giữa những cá thể kết hợp trong đó tổng số vùng đích khác nhau ở nhiễm sắc thể là 3 hoặc ít hơn, có thể tạo ra một cách ổn định cây trồng trong đó nhiều vùng đích ở nhiễm sắc thể của cây trồng ban đầu được thay thế bằng mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai.

Các FIG. 14A đến FIG. 14C là lược đồ thể hiện phương pháp tạo ra cây trồng P6 (ABCDEF) với xác suất xảy ra cá thể thể hệ con mục tiêu trong quần thể chọn lọc mỗi lần là từ 1/64 đến 1/16. FIG. 14A là hình ảnh thể hiện phương pháp khi xác suất xảy ra trong tất cả các quần thể được chọn lọc là 1/16. FIG. 14B và FIG. 14C là lược đồ thể hiện phương pháp khi xác suất xảy ra trong tất cả các quần thể được chọn lọc là 1/16 hoặc 1/64. Thậm chí khi số lượng vùng đích là 7 hoặc nhiều hơn, có thể tạo ra cá thể theo cách tương tự vì xác suất thu nhận cá thể thể hệ con mục tiêu trong quần thể được chọn lọc một lần là 1/64 đến 1/16.

Khi vùng đích tương ứng là độc lập tương ứng mà không có liên kết, và theo quy luật Mendel, cách thức làm sao có thể xác định một cách thích hợp xác suất có mặt của cá thể thể hệ con mục tiêu trong quần thể chọn lọc xét đến số lượng cá thể thể hệ con thu được qua một lần ghép đôi, và thời gian cho đến khi cuối cùng thu được cá thể là cây trồng mục tiêu. Khi số lượng những cá thể thể hệ con thu được bằng cách ghép đôi là đủ, xác suất xảy ra cá thể thể hệ con mục tiêu có thể được thiết lập ở mức thấp chẳng hạn như 1/64. Trong trường hợp này, quy mô của quần thể chọn lọc mỗi lần trở

nên tương đối lớn, và thời gian, công sức lao động và chi phí cần thiết cho chọn lọc một lần là cao, nhưng có thể thu được cây trồng trong đó số vùng đích mục tiêu được thay thế bằng mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai qua số lần chọn lọc tương đối nhỏ. Mặt khác, khi số lượng cá thể thế hệ con thu được qua một lần ghép đôi giữa là nhỏ, quy mô của quần thể chọn lọc mỗi lần phải được giảm đi. Trong trường hợp này, thời gian và chi phí cần thiết cho chọn lọc một lần có thể được giảm đi, nhưng số lần chọn lọc tăng lên, và thời gian cho đến khi cuối cùng thu được cá thể là cây trồng mục tiêu bị kéo dài. Ví dụ, như được chỉ ra trên các FIG. 11A đến FIG. 11C, khi tạo ra P4 (ABCD, theo phương pháp ở FIG. 11A, trước hết tạo ra P4 (ABCD) bằng ba lần chọn lọc: lần ghép đôi giữa P1 (A) và P1 (B), và sau đó chọn lọc P2 (AB); lần ghép đôi giữa P1 (C) và P1 (D), và sau đó chọn lọc P2 (CD); lần ghép đôi giữa P2 (AB) và P2 (CD), và sau đó chọn lọc P4 (ABCD). Mặt khác, theo phương pháp ở FIG. 11C, tạo ra P4 (ABCD), ví dụ, bằng ít nhất năm lần chọn lọc: lần ghép đôi giữa P1 (A) và P1(B), và sau đó chọn lọc P2 (AB); lần ghép đôi giữa P1 (C) và P1 (D), và sau đó chọn lọc P2 (CD); lần ghép đôi giữa P2 (AB) và P1 (C), và sau đó chọn lọc P3 (ABC); lần ghép đôi giữa P1 (B) và P2 (CD), và sau đó chọn lọc P3 (BCD); lần ghép đôi giữa P3 (ABC) và P3 (BCD), và sau đó chọn lọc P4 (ABCD). Trong phương pháp theo FIG. 11A, vùng đích được thay thế bằng mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai có trong cá thể cha mẹ sẽ được ghép đôi là khác nhau ở mỗi cá thể cha mẹ. Vì lý do này, cần phải để tạo ra quần thể chọn lọc mỗi lần lớn hơn theo phương pháp FIG. 11C, nhưng có thể tạo ra P4 (ABCD) bằng số lần chọn lọc nhỏ hơn.

Cây trồng mới được tạo ra theo sáng chế là, như đã nêu trên, cây trồng thế hệ con là dòng có đoạn nhiễm sắc thể thay thế trong đó một phần của nhiễm sắc thể được thay thế bằng mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai. Trong cây trồng mới này, một hoặc nhiều vùng đích được thay thế bằng mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, và chiều dài của mảnh nhiễm sắc thể được kiểm soát bởi dấu chuẩn ADN được thiết lập ở phía trước của vùng đích, và dấu chuẩn ADN được thiết lập ở phía sau vùng đích. Theo sáng chế, bằng cách thiết lập một cách thích hợp vùng đích, có thể thu được cây trồng mới hữu ích chẳng hạn như cây trồng mới như được mô tả trong Ví dụ thực hiện sáng chế được mô tả sau đây, đặc biệt, cây lúa, cây trồng *Oryza sativa* L. Koshihikari kazusa 4go.

Ngoài ra, có thể tạo ra cây trồng mới trong đó ít nhất một vùng trong nhiều vùng được thay thế bằng mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai có trong cá thể cha mẹ được thay thế bằng mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu. Trước hết, cá thể là cây trồng được tạo ra bằng cách sử dụng các phương pháp từ thứ nhất đến thứ tư tạo ra cây trồng mới theo sáng chế, trong đó hai hoặc nhiều vùng đích ở nhiễm sắc thể của cây trồng ban đầu được thay thế bằng mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai, hoặc ghép đôi cá thể thế hệ con của cá thể này, và cá thể của cây trồng ban đầu. Sau đó, tự ghép đôi cá thể thế hệ con thu được bằng phương pháp ghép đôi này và, từ cá thể thế hệ con thu được bằng phương pháp tự ghép đôi này, chọn lọc cá thể trong đó ít nhất một vùng được thay thế bằng mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu.

Ví dụ, trường hợp trong đó tạo ra cá thể P3 (ABC) trong đó, ở nhiễm sắc thể của cây trồng ban đầu, tất cả các vùng đích A, B và C được thay thế bằng mảnh đồng nhiễm sắc có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu bằng cách sử dụng các phương pháp từ thứ nhất đến thứ tư tạo ra cây trồng mới theo sáng chế sẽ được mô tả. Trước hết, ghép đôi P3 (ABC) này và cá thể thuộc cây trồng ban đầu. Sau đó, bằng cách tự ghép đôi cá thể thế hệ con thu được bằng phương pháp ghép đôi này, chọn lọc cá thể P2 (AB) trong đó chỉ vùng đích A và B được thay thế bằng mảnh đồng nhiễm sắc có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai và vùng đích C được thay thế bằng mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu, hoặc cá thể P2 (B) trong đó chỉ vùng đích B được thay thế bằng mảnh đồng nhiễm sắc có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai và vùng đích A và C được thay thế bằng mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ cây trồng nguồn. Từ bước nêu trên, có thể thu được cá thể là cây trồng mới trong đó ít nhất một vùng trong nhiều vùng được thay thế bằng mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai có trong cá thể cha mẹ được thay thế bằng mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ cây trồng ban đầu.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ sau đây minh họa tiếp sáng chế một cách chi tiết hơn, nhưng sáng chế không chỉ giới hạn ở các ví dụ sau đây.

Ví dụ 1

Bằng cách sử dụng sáng chế, tạo ra cây trồng mới là cây lúa Koshihikari có tính

chống chịu không bị đẽ rạp được cải thiện.

Trước hết, ghép đôi cây lúa Habataki là giống ngắn, và cây lúa Koshihikari, và thực hiện phân tích bản đồ QTL (gen liên quan đến tính trạng số lượng - Quantitative Trait Locus) trên quần thể phân ly. Kết quả là, nhận thấy rằng QTL lớn có mặt trong vùng Sd1 của nhiễm sắc thể đầu tiên. Cho rằng khi vùng gen của cây lúa Koshihikari được thay thế bằng vùng gen có nguồn gốc từ Habataki, chiều cao (chiều dài thân) của cây lúa Koshihikari trở nên nhỏ, và tính chống chịu không bị đẽ rạp được tăng cường. Sau đó, cây lúa Habataki được lai ngược với cây lúa Koshihikari để tạo ra dòng có đoạn nhiễm sắc thể thay thế trong đó vùng Sd1 của cây lúa Koshihikari được thay thế bằng mảnh gen có nguồn gốc từ Habataki.

Sau đó, theo phương pháp thiết kế hệ gen thực vật theo sáng chế, chiều dài của vùng mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ Habataki của dòng có đoạn nhiễm sắc thể được thay thế thu được được điều hoà để thiết kế hệ gen. Cụ thể, dấu chuẩn ADN SP-4009 ở vùng Sd1 được thiết lập là dấu chuẩn ADN M1 (Sd1), dấu chuẩn ADN G2003 ở vùng Sd1 được thiết lập là dấu chuẩn ADN M2 (Sd1), dấu chuẩn ADN G2002 ở vùng Sd1 được thiết lập là dấu chuẩn ADN M3 (Sd1), dấu chuẩn ADN SP-462 ở vùng Sd1 được thiết lập là dấu chuẩn ADN M4 (Sd1), và dấu chuẩn ADN SP-1259 ở vùng Sd1 được thiết lập là dấu chuẩn ADN M5 (Sd1). Các dấu chuẩn ADN này được thể hiện ở FIG. 15 và Bảng 1. Khoảng cách d1 giữa các dấu chuẩn ADN M1 (Sd1) và M2 (Sd1) là vào khoảng 1,6 kbp (kilo bazơ), khoảng cách d2 giữa các dấu chuẩn ADN M2 (Sd1) và M4 (Sd1) là vào khoảng 90 kbp, và khoảng cách d3 giữa các dấu chuẩn ADN M4 (Sd1) và M5 (Sd1) là vào khoảng 750 kbp. Nhờ đó, ở nhiễm sắc thể của cây lúa Koshihikari, chiều dài của mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ Habataki L_1 là $90 \text{ kbp} < L_1 < 842 \text{ kbp}$.

Bảng 1

	Dấu chuẩn	Loại	Vị trí	Trình tự
M1 (Sd1)	SP-4009	SNP	38.107.956	Trình tự xuôi: ccgttcattgtgcctgtatgg
				Trình tự ngược: tggtagcaggaaggtagacaca
				SP-4009Gc: ttggaaggaacatctagcagg
M2	G2003	PCR	38.109.578	TG2003U: cacagcgctcacttctca

(Sd1)				TG2003L: tgcaatgtcgtccaccatcg
M3 (Sd1)	G2002	PCR	38.109.641	TG2002U: cacagcgtcacttctca
				TG2002L: atgatcgtcagcgacagct
M4 (Sd1)	SP-462	SNP	38.199.633	Trình tự xuôi: aactccagcgtgctaagc
				Trình tự ngược: gcattgcatgcaggatcg
				SP-462Gt: agagcccttcactttcagc
M5 (Sd1)	SP-1259	SNP	38.949.811	Trình tự xuôi: aaggctgatgagcactgc
				Trình tự ngược: ggcattgtggaagctcttc
				SP-1259Tc: tctcctttcgagtgccc

Sau đó, ghép đôi dòng có đoạn nhiễm sắc thể thay thế thu được và cây lúa Koshihikari để thu hoạch 10 cá thể thế hệ con (hạt giống) trong đó dấu chuẩn ADN M3 (Sd1) là vùng dị nhiễm sắc gồm một alen có nguồn gốc từ cây lúa Koshihikari và một alen có nguồn gốc từ Habataki. Tất cả các hạt thu được được trồng, và được tự thụ phấn (được tự ghép đôi) để thu hoạch hạt là cá thể thế hệ con.

Hạt giống được thu hoạch này được trồng. Sau cây con được phát triển đến mức độ mà cây con này có thể được bứng trồng vào cánh đồng, chiết ADN từ lá cây của mỗi cá thể được trồng, và chọn lọc cá thể được trồng trong đó dấu chuẩn ADN M1 (Sd1) là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây lúa Koshihikari, và các dấu chuẩn ADN M2 (Sd1) và M3 (Sd1) là vùng dị nhiễm sắc gồm một alen có nguồn gốc từ cây lúa Koshihikari và một alen có nguồn gốc từ Habataki.

Cá thể được trồng chọn lọc này được tự thụ phấn (được tự ghép đôi) để thu hoạch hạt là cá thể thế hệ con. Hạt giống được thu hoạch này được trồng tiếp, và cây con được phát triển đến mức độ mà có thể bứng trồng cây con này vào cánh đồng, chiết ADN từ lá cây của mỗi cá thể được trồng, và chọn lọc cá thể được trồng trong đó các dấu chuẩn ADN M1 (Sd1) và M5 (Sd1) là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây lúa Koshihikari, và các dấu chuẩn ADN M2 (Sd1), M3 (Sd1) và M4 (Sd1) là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ Habataki. Cá thể được trồng chọn lọc này là cây trồng mới trong đó vùng nằm giữa dấu chuẩn ADN M1 (Sd1) và dấu chuẩn ADN M5 (Sd1) của vùng Sd1 của cây lúa Koshihikari được thay thế bằng mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ Habataki. Các tác giả sáng chế đặt tên cây trồng mới này là “cây lúa Koshihikari eichi 4go”.

FIG. 16 là lược đồ thể hiện hệ gen của cây lúa Koshihikari eichi 4go.

Tính trạng giữa cây lúa Koshihikari eichi 4go, cây lúa Koshihikari và Nihonbare được so sánh, và được nghiên cứu (được thực hiện ở Aichi Prefecture vào năm 2005 đến 2006). Việc nghiên cứu tính trạng được thực hiện theo quy định Kiểm tra đặc tính cho việc nộp đơn đăng ký cây trồng - Property Examination for filing Cultivar Registration - trên cơ sở điều luật về hạt giống và bảo vệ cây trồng - Plant Cultivar Protection and Seed Act (Year Heisei 10, Luật số 83), Điều 5, Khoản 1. Các kết quả này được thể hiện ở các bảng từ 2 đến 4. Chiều dài phần thân của cây lúa Koshihikari và Nihonbare là cây trồng đối chứng lần lượt là 99,0 cm và 86,8 cm, trong khi đó chiều dài phần thân của cây lúa Koshihikari eichi 4go chỉ ngắn có 83,3 cm. Mặt khác, cây lúa Koshihikari eichi 4go có nhiều điểm giống như cây lúa Koshihikari chỉ khác là chiều dài thân là ngắn, và có tính trạng tốt là khó mọc mầm trước khi thu hoạch cây lúa Koshihikari. Ngoài ra, như được chỉ ra trên FIG. 17, vì chiều dài thân được giảm đi, tính chống chịu không bị đè rạp cũng tăng lên.

Do đó, từ các kết quả này, rõ ràng là, bằng cách thiết kế hệ gen bằng cách sử dụng phương pháp thiết kế hệ gen thực vật theo sáng chế, và tạo ra cây trồng mới bằng cách sử dụng phương pháp tạo ra cây trồng mới theo sáng chế, có thể tạo ra được cây trồng mới có tính trạng mục tiêu mà không làm thay đổi tính trạng được ưa thích có ở cây trồng ban đầu.

Bảng 2

Giai đoạn	Tình trạng	Trị số đặc tính của cây trồng (so sánh với cây trồng chuẩn)									Nhận xét	Trị số đặc tính của cây trồng đối chứng		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9				
40	Lá: Màu anthoxyanin	Không có mặt								Có mặt	1	1	Koshihikari (Aichi Prefecture, 2005-2006)	Nihonbare (Aichi Prefecture, 2006)
	Lá: phần bổ màu anthoxyanin	Chỉ ở phần ngon	Chỉ ở phần mép	Như vết đốm	Toàn bộ lá cây						1	1		1
	Lá: Màu anthoxyanin của lông cuối phiến lá	Không có mặt								Có mặt	1	1		1
60	Lá cây dạng lá cỏ: Dáng của phiến lá (Quan sát ban đầu)	Mọc đứng		Nửa mọc đứng		Nằm ngang		Uốn ngược lại			3	3		3
90	Lá cây dạng lá cỏ: Dáng của phiến lá (Quan sát lúc sau)	Mọc đứng		Nửa mọc đứng		Nằm ngang		Uốn ngược lại			3	4		4
55	Thời gian trở bông (ngày 50% trở bông)	Cực sớm		Sớm		Trung bình		Muộn			3	3	7 tháng 8	4
65	Mây ngoài: Màu anthoxyanin của phần trên (quan sát ban đầu)	Không có mặt hoặc cực xám		Màu xanh xám		Trung bình		Mạnh		Rất mạnh	1	1		1

Bảng 3

Giai đoạn	Tình trạng	Trị số đặc tính của cây trồng (so sánh với cây trồng chuẩn)									Nhận xét	Trị số đặc tính của cây trồng đối chứng	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9		Koshihikari (Aichi Prefecture, 2005-2006)	Nihonbare (Aichi Prefecture, 2006)
70	Thân cây: Dài (dự tính cho bông, dự tính cho cây lúa nổi)	Rất ngắn		Ngắn		Trung bình		Dài		Rất dài	4 83,3 cm	6 99,0 cm	5 86,8 cm
	Thân cây: Màu anthoxyanin của nốt	Không có mặt								Có mặt	1	1	1
	Bông: Chiều dài của trục chính			Ngắn		Trung bình		Dài			4 16,5 cm	4 16,8 cm	4 16,4 cm
70	Bông: Số bông			Ít		Trung bình		Nhiều			5 15,3 bông	5 15,3 bông	5 12,0 bông
70-80	Bông: phân bố râu ngọn	Chỉ ở phần ngọn		Chỉ ở nửa trên		Toàn bộ					1	1	1
60-80	Bông nhỏ: Nhiều hoặc ít tùm lông ở mây ngoài của đầu nhỏ	Không có mặt hoặc rất ít		Ít		Trung bình		Nhiều		Rất nhiều	Tương đương với cây lúa Koshihikari		
80-90	Bông nhỏ: Màu của đầu mút mây ngoài (màu của đầu nhỏ)	Màu trắng	Màu vàng	Màu nâu	Màu đỏ	Màu tím nhạt	Màu đen				1	1	1
90	Bông: Mức độ uốn cong của trục chính	Mọc đứng		Ngã		Dốc xuống		Uốn cong			5	5	5
	Bông: dạng bông	Dạng đầu cây giáo	Giống như hình thoi	Giống như con dơi	Giống như bông hoa	Ồ					2	2	2
	Giai đoạn chín	Cực sớm		Sớm		Trung bình		Muộn		Rất muộn	5 16 Tháng 9	5 16 Tháng 9	6 28 Tháng 9 (2007)
	Màu của mây	Màu trắng hơi vàng	Màu vàng	Màu nâu	Màu tím nhạt đỏ sẫm	Màu tím nhạt	Màu đen				1	1	1
	Màu của mây: kiểu	Không có mặt	Rãnh màu vàng	Rãnh màu nâu	Đốm màu tím nhạt	Rãnh màu tím nhạt					1	1	1

Bảng 4

Giai đoạn	Tình trạng	Trị số đặc tính của cây trồng (so sánh với cây trồng chuẩn)								Nhận xét	Trị số đặc tính của cây trồng đối chứng	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	Koshihikari (Aichi Prefecture, 2005-2006)	Nihonbare (Aichi Prefecture, 2006)
92	Máy ngoài: Màu anthoxyanin của phần trên	Không có mặt hoặc cực xám		Màu xanh xám		Trung bình		Sẫm		Rất sẫm	1	1
	Máy ngoài: chiều dài			Ngắn		Trung bình		Chiều dài			2	2
	Máy ngoài: Màu sắc	Màu trắng hơi vàng	Màu vàng	Màu đỏ	Màu tím nhạt						1	1
	Thóc: khối lượng 1.000 hạt (chín)			Nhẹ		Trung bình		Nặng			5	5
	Thóc: Phản ứng phenol của mày hoa trên	Không có mặt		Màu xanh xám		Trung bình		Sâu		Có mặt	24,74 g	26,1 g
	Gạo không xát : Chiều dài			Ngắn		Trung bình		Chiều dài			1	1
	Gạo không xát : Chiều rộng			Mỏng		Trung bình		Dày			5	5
	Gạo không xát : Hình dạng (quan sát từ phía bên)	Tròn	Nửa hình tròn	Nửa hình thoi	Hình thoi	Hình thoi dài					5,03 mm	5,26 mm
	Gạo không xát : Màu sắc	Màu trắng	Màu nâu nhạt	Đốm màu nâu	Màu nâu sẫm	Màu đỏ nhạt	Màu đỏ	Đốm màu nhạt	Màu tím nhạt	Màu tím sẫm/màu đen	2,90 mm	2,88 mm
	Gạo không xát : Mùi thơm	Không có hoặc rất yếu	Nhẹ	Mạnh							1,85 mm	2,01 mm
											2	2
											1	1

Ví dụ 2

Bằng cách sử dụng phương pháp theo sáng chế, tạo ra cây trồng mới trong đó mật độ sắp đặt hạt của cây lúa Koshihikari tăng lên.

Trước hết, ghép đôi cây lúa Habataki và cây lúa Koshihikari, và tiến hành phân tích QTL trong quần thể phân ly. Kết quả là, rõ ràng là QTL có mật độ sắp đặt hạt cao hơn của cây lúa Koshihikari có mặt trong khoảng vùng 5 Mp của nhiễm sắc thể thứ nhất. Tức là rõ ràng là gen Gn1 có mặt trong vùng này là gen nguyên nhân cho kiểm soát mật độ sắp đặt hạt. Sau đó, dự đoán là khi gen Gn1 của cây lúa Koshihikari được thay thế bằng vùng gen có nguồn gốc từ Habataki, mật độ sắp đặt hạt của cây lúa Koshihikari được tăng lên. Khi đó, Habataki được lai ngược với cây lúa Koshihikari để tạo ra dòng có đoạn nhiễm sắc thể thay thế trong đó vùng chứa gen Gn1 của cây lúa Koshihikari được thay thế bằng mảnh gen có nguồn gốc từ Habataki.

Sau đó, theo phương pháp thiết kế hệ gen thực vật theo sáng chế, điều hoà chiều dài của vùng mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ Habataki của dòng có đoạn nhiễm sắc thể thay thế thu được để thiết kế hệ gen. Cụ thể, dấu chuẩn ADN SP-2032 ở vùng gen Gn1 được thiết lập là dấu chuẩn ADN M1 (Gn1), dấu chuẩn ADN SP-170 ở vùng gen Gn1 được thiết lập là dấu chuẩn ADN M2 (Gn1), dấu chuẩn ADN SP-4028 ở vùng gen Gn1 được thiết lập là dấu chuẩn ADN M3 (Gn1), dấu chuẩn ADN SP-4038 ở vùng gen Gn1 được thiết lập là dấu chuẩn ADN M4 (Gn1), và dấu chuẩn ADN SP-4030 ở vùng gen Gn1 được thiết lập là dấu chuẩn ADN M5 (Gn1). Các dấu chuẩn ADN này được thể hiện ở FIG. 18 và Bảng 5. Khoảng cách d1 giữa các dấu chuẩn ADN M1 (Gn1) và M2 (Gn1) là vào khoảng 201 kbp, khoảng cách d2 giữa các dấu chuẩn ADN M2 (Gn1) và M4 (Gn1) là vào khoảng 37 kbp, và khoảng cách d3 giữa các dấu chuẩn ADN M4 (Gn1) và M5 (Gn1) là vào khoảng 7 kbp. Nhờ đó, ở nhiễm sắc thể của cây lúa Koshihikari, chiều dài của mảnh nhiễm sắc thể L_2 có nguồn gốc từ Habataki là $37 \text{ kbp} < L_2 < 246 \text{ kbp}$.

Bảng 5

	Dấu chuẩn	Loại	Vị trí	Trình tự
M1 (Gn1)	SP-2032	SNP	5.029.585	Trình tự xuôi: cattgagtcatttcctctgc
				Trình tự ngược: gcagctccaagaatgactac
				SP-2032Tg: attggtgctagagcaactac
M2 (Gn1)	SP-170	SNP	5.230.897	Trình tự xuôi: gtgagacatagactatccac
				Trình tự ngược: acgcgtacgccacatagac
				SP-170Ta: aggggtgaggaatgtccggt
M3 (Gn1)	SP-4028	SNP	5.267.633	Trình tự xuôi: gcagtacctgccttactacg
				Trình tự ngược: catttcatgcgagtggtgac
				SP-4028Ac: tgcacgaatcttgccagag
M4 (Gn1)	SP-4038	SNP	5.267.932	Trình tự xuôi: cttaaactcaacttgcacaagtag
				Trình tự ngược: actgccgacatgttactgtc
				SP-4038Gc: gtccacactgaacatatcca
M5 (Gn1)	SP-4030	SNP	5.274.787	Trình tự xuôi: tctttgattctttggatcgatcg
				Trình tự ngược: gcgtacgagagctatagagc
				SP-4030At: atggatccgtggatcgatcg

Sau đó, ghép đôi dòng có đoạn nhiễm sắc thể thay thế thu được và cây lúa Koshihikari, và lặp lại việc ghép đôi và chọn lọc như ở ví dụ 1 để chọn lọc cá thể là cây trồng mới trong đó vùng nằm giữa dấu chuẩn ADN M1 (Gn1) và dấu chuẩn ADN M5 (Gn1) của vùng gen Gn1 ở cây lúa Koshihikari được thay thế bằng mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ Habataki. Các tác giả sáng chế đặt tên cây trồng mới này là cây lúa “Koshihikari eichi 2go”. FIG. 19 là lược đồ thể hiện hệ gen của cây lúa Koshihikari eichi 2go.

Các tính trạng của cây lúa Koshihikari eichi 2go, cây lúa Koshihikari và Nihonbare được so sánh và nghiên cứu như ở ví dụ 1 (được thực hiện ở Aichi Prefecture vào năm 2005 đến 2006). Các kết quả này được trình bày ở các bảng 6 đến 8. Trong các Bảng này, “(2005)” dùng để chỉ giá trị đo được vào năm 2005, và “(2006)” dùng để chỉ giá trị đo được vào năm 2006, một cách tương ứng. Mật độ sấp đặt hạt của cây lúa Koshihikari là cây trồng đối chứng là 7,01 hạt/cm² vào năm 2005, và 8,89 hạt/cm² vào năm 2006. Mật độ sấp đặt hạt vào năm 2006 của

Nihonbare là tương tự cây trồng đối chứng và là 5,99 hạt/cm². Trái lại, mật độ sấp đặt hạt của cây lúa Koshihikari eichi 2go là 10,7 hạt/cm² vào năm 2005, và 10,0 hạt/cm² vào năm 2006. Tương tự như vậy, mật độ sấp đặt hạt của cây lúa Koshihikari eichi 2go là rất cao hơn và tốt hơn mật độ của cây lúa Koshihikari và Nihonbare. Mặt khác, không phát hiện được sự khác biệt có ý nghĩa giữa cây lúa Koshihikari eichi 2go và cây lúa Koshihikari ngoài mật độ sấp đặt hạt cao. Ngoài ra, còn trong trường hợp trong đó thực hiện thử nghiệm ở Niigata Prefecture vào năm 2005 bằng cách sử dụng cây lúa Koshihikari và Dontokoi làm cây trồng đối chứng, thu được các kết quả gần giống như các kết quả ở các Bảng từ 6 đến 8.

Do đó, ngoài ra từ các kết quả này, rõ ràng là, bằng cách thiết kế hệ gen bằng cách sử dụng phương pháp thiết kế hệ gen thực vật theo sáng chế, và tạo ra cây trồng bằng cách sử dụng phương pháp tạo ra cây trồng mới theo sáng chế, có thể tạo ra cây trồng mới có tính trạng mục tiêu mà không làm thay đổi tính trạng được ưa thích có ở cây trồng ban đầu.

Bảng 6

Giai đoạn	Tính trạng	Trị số đặc tính của cây trồng (so sánh với cây trồng chuẩn)									Nhận xét	Trị số đặc tính của cây trồng đối chứng	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9		cây lúa Koshihikari (Aichi Prefecture, 2005-2006)	Nihonbare (Aichi Prefecture, 2006)
40	Lá: Màu anthoxyanin	Không có mặt								Có mặt	1	1	1
	Lá: phần bổ màu anthoxyanin	Chỉ ở phần ngọn	Chỉ ở phần mép	Như vết đốm	Toàn bộ lá cây						1	1	1
	Lá: Màu anthoxyanin của lông cuối phiến lá	Không có mặt								Có mặt	1	1	1
60	Lá cây dạng lá cỏ: Dạng của phiến lá (Quan sát ban đầu)	Mọc đứng		Nửa mọc đứng		Nằm ngang		Uốn ngược lại			3	3	2
90	Lá cây dạng lá cỏ: Dạng của phiến lá (Quan sát lúc sau)	Mọc đứng		Nửa mọc đứng		Nằm ngang		Uốn ngược lại			4	4	4
55	Thời gian trổ bông (ngày 50% trổ bông)	Cực sớm		Sớm		Trung bình		Muộn			3 5 Tháng 8 (2005) 8 Tháng 8 (2006)	3 5 Tháng 8 (2005) 9 Tháng 8 (2006)	4 17 Tháng 8
65	Mây ngoài: Màu anthoxyanin của phần trên (quan sát ban đầu)	Không có mặt hoặc cực xám		Màu xanh xám		Trung bình		Mạnh		Rất mạnh	1	1	1

Bảng 7

Giai đoạn	Tình trạng	Trị số đặc tính của cây trồng (so sánh với cây trồng chuẩn)									Nhận xét	Trị số đặc tính của cây trồng đối chứng	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9		cây lúa Koshihikari (Aichi Prefecture 2005-2006)	Nihonbare (Aichi Prefecture 2006)
70	Thân cây: Chiều dài (dự tính cho bông, dự tính cho cây lúa nổi)	Rất ngắn		Ngắn		Trung bình		Dài		Rất dài	6 105,0 cm (2005) 95,5 cm (2006)	6 108,9 cm (2005) 101,0 cm (2006)	5 86,8 cm
	Thân cây: Màu anthocyanin của nốt	Không có mặt								Có mặt	1	1	1
72-90	Bông: Chiều dài của trục chính			Ngắn		Trung bình		Dài			4 18,0 cm (2005) 15,7 cm (2006)	4 18,8 cm (2005) 15,1 cm (2006)	4 16,4 cm
70	Bông: Số bông			Ít		Trung bình		Nhiều			5 17,0 bông (2005) 11,2 bông (2006)	5 16,8 bông (2005) 13,4 bông (2006)	5 12,0 bông
70-80	Bông: phân bố râu ngọn	Chỉ ở phần ngọn		Chỉ ở nửa trên		Toàn bộ					1	1	1
60-80	Bông nhỏ: Nhiều hoặc ít tím lông ở mày ngoài	Không có mặt hoặc rất ít		Ít		Trung bình		Nhiều		Rất nhiều	Tương đương với cây lúa Koshihikari		
80-90	Bông nhỏ: Màu của đầu mút mày ngoài (màu của đầu nhỏ)	Màu trắng	Màu vàng	Màu nâu	Màu đỏ	Màu tím nhạt	Màu đen				1	1	1
90	Bông: Mức độ uốn cong của trục chính	Mọc đứng		Nghiêng		Dốc xuống		Uốn cong			5	5	5
	Bông: dạng bông	Dạng đầu cây giáo	Giống như hình thoi	Giống như con dơi	Giống như bông hoa	Ó					2	2	2
	Giai đoạn chín	Cục sớm		Sớm		Trung bình		Muộn		Rất muộn	5 15/9 (2005) 18/9 (2006)	5 18/9 (2005) 19/9 (2006)	6 28/9 (2007)
	Màu của mày	Màu trắng hơi vàng	Màu vàng	Màu nâu	Màu tím nhạt đỏ sẫm	Màu tím nhạt	Màu đen				1	1	1
	Màu của mày: kiểu	Không có mặt	Rãnh màu vàng	Rãnh màu nâu	Đốm màu tím nhạt	Rãnh màu tím nhạt					1	1	1

Bảng 8

Giai đoạn	Tính trạng	Trị số đặc tính của cây trồng (so sánh với cây trồng chuẩn)								Nhận xét	Trị số đặc tính của cây trồng đối chứng	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	Koshihikari (Aichi Prefecture, 2005-2006)	Nihonbare (Aichi Prefecture, 2006)
92	Mây ngoài: Màu anthoxyanin của phần trên	Không có mặt hoặc cực xám		Màu xanh xám		Trung bình		Sẫm màu		Rất sẫm	1	1
	Mây ngoài: chiều dài			Ngắn		Trung bình		Dài			2	2
	Mây ngoài: Màu sắc	Màu trắng hơi vàng	Màu vàng	Màu đỏ	Màu tím nhạt						1	1
	Thóc: khối lượng 1.000 hạt (chín)			Nhẹ		Trung bình		Nặng			5	5
	Thóc: Phản ứng phenol của mây hoa trên	Không có mặt		Màu xanh xám		Trung bình		Sâu		Có mặt	1	1
	Gạo không xát : Chiều dài			Ngắn		Trung bình		Dài			5	5
	Gạo không xát : Chiều rộng			Mỏng		Trung bình		Dầy			5	5
	Gạo không xát : Hình dạng (quan sát từ phía bên)	Tròn	Nửa hình tròn	Nửa hình thoi	Hình thoi	Hình thoi dài					2	2
	Gạo không xát : Màu sắc	Màu trắng	Màu nâu nhạt	Đốm màu nâu	Màu nâu sẫm	Màu đỏ nhạt	Màu đỏ	Đốm màu tím nhạt	Màu tím nhạt	Tím sẫm/đen	2	2
	Gạo không xát: Mùi thơm	Không có mặt hoặc rất yếu	Nhẹ	Mạnh							1	1
GII	Mật độ sắp đặt hạt		Rất thưa	Thưa	Hơi thưa	Trung bình	Hơi nặng	Nặng	Rất nặng		7	5
											10,7 hạt/cm ² (2005) 10,0 hạt/cm ² (2006)	5,99 hạt/cm ² (2006)

Ví dụ 3

Khi cây lúa Koshihikari được trồng ở Hokkaido, thời gian từ khi gieo hạt đến lúc trổ bông là vào khoảng 144 ngày và khoảng thời gian này là quá dài. Tức là khi trồng hạt vào giữa tháng 5, không xảy ra trổ bông cho đến khi giữa tháng 9. Tuy nhiên, sau giữa tháng 9, nhiệt độ không khí giảm đi ở Hokkaido, và do đó cây lúa Koshihikari không thể được trưởng thành bình thường. Vì lý do này, để trồng cây lúa Koshihikari ở các tỉnh phía bắc chẳng hạn như Hokkaido và các vùng tương tự, việc chuyển đổi cây lúa Koshihikari phát triển sớm là cần thiết. Khi đó, bằng cách sử dụng sáng chế, tạo ra được cây trồng mới là cây lúa Koshihikari đã được chuyển hoá thành cây phát triển sớm.

Trước hết, ghép đôi cây lúa Habataki và cây lúa Koshihikari, và tiến hành phân tích QTL trong quần thể phân ly. Kết quả là, tìm ra được QTL mà chuyển hoá cây lúa Koshihikari thành cây phát triển sớm ở vùng nhiệt đới. Tức là điều được nhận thấy là có nhiều khả năng là gen Hd1 có mặt trong vùng này là gen gây ra kiểm soát sự chuyển thành cây phát triển sớm. Sau đó, Habataki được lai ngược với cây lúa Koshihikari để tạo ra dòng có đoạn nhiễm sắc thể thay thế trong đó vùng chứa gen Hd1 của cây lúa Koshihikari được thay thế bằng mảnh gen có nguồn gốc từ Habataki.

Sau đó, theo phương pháp thiết kế hệ gen thực vật theo sáng chế, điều hoà chiều dài của vùng mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ Habataki của dòng có đoạn nhiễm sắc thể thay thế thu được để thiết kế hệ gen. Cụ thể, dấu chuẩn ADN SP-2513 ở vùng gen Hd1 được thiết lập là dấu chuẩn ADN M1 (Hd1), dấu chuẩn ADN SP-586 ở vùng gen Hd1 được thiết lập là dấu chuẩn ADN M2 (Hd1), dấu chuẩn ADN SP-2254 ở vùng gen Hd1 được thiết lập là dấu chuẩn ADN M3 (Hd1), dấu chuẩn ADN SP-1603 ở vùng gen Hd1 được thiết lập là dấu chuẩn ADN M4 (Hd1), và dấu chuẩn ADN SP-604 ở vùng gen Hd1 được thiết lập là dấu chuẩn ADN M5 (Hd1). Các dấu chuẩn ADN này được thể hiện ở FIG. 20 và Bảng 9. Khoảng cách d1 giữa các dấu chuẩn ADN M1 (Hd1) và M2 (Hd1) là vào khoảng 344 kbp, khoảng cách d2 giữa các dấu chuẩn ADN M2 (Hd1) và M4 (Hd1) là vào khoảng 1.508 kbp, và khoảng cách d3 giữa các dấu chuẩn ADN M4 (Hd1) và M5 (Hd1) là vào khoảng 1.279 kbp. Do đó, chiều dài của mảnh nhiễm sắc thể L_2 có nguồn gốc từ Habataki ở nhiễm sắc thể cây lúa Koshihikari là $1.507 \text{ kbp} < L_2 < 3.131 \text{ kbp}$.

Bảng 9

	Dấu chuẩn	Loại	Vị trí	Trình tự
M1 (Hd1)	SP-2513	SNP	8.818.923	Trình tự xuôi: gcgaaaagatgaggatgtacac
				Trình tự ngược: ccgtaggcctttgtcaagtg
				SP-2513Ct: cttaatggtggcttatgtc
M2 (Hd1)	SP-586	SNP	9.163.148	Trình tự xuôi: gctaggacaagcttatttcagc
				Trình tự ngược: tcacgccgatcaagaacg
				SP-586Ca: cataatttatcgccattttcgcat
M3 (Hd1)	SP-2254	SNP	9.379.247	Trình tự xuôi: aggcccttgtagtggtac
				Trình tự ngược: gtacacaatagttggtgcacc
				SP-2254Cg: catgataaggtactcctgg
M4 (Hd1)	SP-1603	SNP	10.671.067	Trình tự xuôi: cctagtcctaagatctcatg
				Trình tự ngược: gatagacatgacggagaagtg
				SP-1603Tc: gggtggtgttatcttagt
M5 (Hd1)	SP-604	SNP	11.949.717	Trình tự xuôi: gcgcaaattccttcagtcac
				Trình tự ngược: cagtttcaggtggaagacc
				SP-604Tc: caagtttctctctcatttc

Sau đó, ghép đôi dòng có đoạn nhiễm sắc thể thay thế thu được và cây lúa Koshihikari để thu hoạch ba cá thể thế hệ con (hạt giống) trong đó dấu chuẩn ADN M3 là vùng dị nhiễm sắc gồm một alen có nguồn gốc từ cây lúa Koshihikari và một alen có nguồn gốc từ Habataki. Tất cả các hạt thu được được trồng, được tự thụ phấn (được tự ghép đôi), và thu hoạch hạt giống là cá thể thế hệ con tiếp theo.

Các hạt giống được thu hoạch được được trồng tiếp. Sau khi cây con được phát triển đến mức độ mà cây con có thể bứng trồng vào cánh đồng, chiết ADN từ lá cây của mỗi cá thể được trồng, và chọn lọc cá thể được trồng trong đó dấu chuẩn ADN M1 (Hd1) là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây lúa Koshihikari, và các dấu chuẩn ADN M2 (Hd1) và M3 (Hd1) là vùng dị nhiễm sắc gồm một alen có nguồn gốc từ cây lúa Koshihikari và một alen có nguồn gốc từ Habataki.

Tự thụ phấn (tự ghép đôi) cá thể được trồng chọn lọc này, và thu hoạch hạt giống mà là cá thể thế hệ con tiếp theo. Các hạt giống được thu hoạch được được trồng tiếp, cho cây con phát triển đến mức độ mà có thể bứng trồng vào cánh đồng, chiết ADN từ lá

cây của mỗi cá thể được trồng, và chọn lọc cá thể được trồng trong đó các dấu chuẩn ADN M1 (Hd1) và M5 (Hd1) là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ cây lúa Koshihikari, và các dấu chuẩn ADN M2 (Hd1), M3 (Hd1) và M4 (Hd1) là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ Habataki. Cá thể được trồng chọn lọc này là cây trồng mới trong đó vùng nằm giữa dấu chuẩn ADN M1 (Hd1) và dấu chuẩn ADN M5 (Hd1) của vùng Hd1 của cây lúa Koshihikari được thay thế bằng mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ Habataki. Các tác giả đặt tên cây trồng mới này là cây lúa “Koshihikari eichi 3go”.

FIG. 21 là lược đồ thể hiện hệ gen của cây lúa Koshihikari eichi 3go.

Các tính trạng giữa cây lúa Koshihikari eichi 3go, cây lúa Koshihikari và Nihonbare được so sánh và được nghiên cứu như ở ví dụ 1 (được thực hiện ở Aichi Prefecture vào năm 2005 đến 2006). Các kết quả nghiên cứu được trình bày ở các bảng 10 đến 12. Trong các Bảng “(2005)” dùng để chỉ giá trị đo được vào năm 2005, và “(2006)” dùng để chỉ giá trị đo được vào năm 2006, một cách tương ứng. Thời gian trổ bông của cây lúa Koshihikari và Nihonbare là cây trồng đối chứng lần lượt là 7 tháng 8 và 17 tháng 8, trong khi đó thời gian trổ bông của cây lúa Koshihikari eichi 3go là 27 tháng 7, sớm hơn 10 ngày so với cây trồng đối chứng. Ngoài ra, thời gian chín của cây lúa Koshihikari và Nihonbare lần lượt là 18 tháng 9 và 28 tháng 9, trong khi đó thời gian chín của cây lúa Koshihikari eichi 3go là 7 tháng 9, và nhận thấy rằng thời gian trổ bông là sớm hơn, thời gian chín là sớm hơn. Ngoài ra, do thời gian trổ bông sớm hơn, chiều dài phần thân của cây lúa Koshihikari eichi 3go được giảm đi. Mặt khác, các tính trạng khác của cây lúa Koshihikari eichi 3go về cơ bản là giống như các tính trạng của cây lúa Koshihikari, và cây lúa Koshihikari eichi 3go còn có tính trạng tốt là khó mọc mầm trước khi thu hoạch có ở cây lúa Koshihikari.

Bảng 10

Giai đoạn	Tình trạng	Trị số đặc tính của cây trồng (so sánh với cây trồng chuẩn)								Nhận xét	Trị số đặc tính của cây trồng đối chứng	
		1	2	3	4	5	6	7	8		cây lúa Koshihikari (Aichi Prefecture, 2005-2006)	Nihonbare (Aichi Prefecture, 2006)
40	Lá: Màu anthoxyanin	Không có mặt								9	1	1
	Lá: phần bố màu anthoxyanin	Chỉ ở phần ngọn	Chỉ ở phần mép	Như vết đốm	Toàn bộ lá cây						1	1
	Lá: Màu anthoxyanin của lông cuối phiến lá	Không có mặt								Có mặt	1	1
60	Lá cây dạng lá cỏ: Dạng của phiến lá (Quan sát ban đầu)	Mọc đứng		Nửa mọc đứng		Nằm ngang		Uốn ngược lại			3	3
90	Lá cây dạng lá cỏ: Dạng của phiến lá (Quan sát lúc sau)	Mọc đứng		Nửa mọc đứng		Nằm ngang		Uốn ngược lại		4	4	4
55	Thời gian trổ bông (ngày 50% trổ bông)	Cực sớm		Sớm		Trung bình		Muộn		2 27/7	3 7/8	4 17/8
65	Mây ngoài: Màu anthoxyanin của phần trên (quan sát ban đầu)	Không có mặt hoặc cực xám		Màu xanh xám		Trung bình		Mạnh		1	1	1

Bảng 11

Giai đoạn	Tình trạng	Trị số đặc tính của cây trồng (so sánh với cây trồng chuẩn)									Nhận xét	Trị số đặc tính của cây trồng đối chứng	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9		Koshihikari (Aichi Prefecture, 2005-2006)	Nihonbare (Aichi Prefecture, 2006)
70	Thân cây: Chiều dài (dự tính cho bông, dự tính cho cây lúa nổi) Thân cây: Màu anthoxyanin của nốt Bông: Chiều dài của trục chính Bông: Số bông	Rất ngắn		Ngắn		Trung bình		Dài		Rất dài	4 83,7 cm	6 105,0 cm	5 86,8 cm
72-90		Không có mặt								Có mặt	1	1	1
70				Ngắn		Trung bình		Dài			4 18,0 cm	4 17,0 cm	4 16,4 cm
70-80				Ít		Trung bình		Nhiều			5 18,0 bông	5 15,1 bông	5 12,0 bông
60-80	Bông: phân bố râu ngọn Bông nhỏ: Nhiều hoặc ít tím lông ở mây ngoài	Chỉ ở phần ngọn Không có mặt hoặc rất ít		Chỉ ở nửa trên Ít		Toàn bộ Trung bình					1	1	1
80-90	Bông nhỏ: Màu của đầu mút mây ngoài (màu của đầu nhỏ) Bông: Mức độ uốn cong của trục chính Bông: dạng bông	Màu trắng Mộc đứng Dạng đầu cây giáo	Màu vàng	Màu nâu	Màu đỏ	Màu tím nhạt	Màu đen	Nhiều		Rất nhiều	Tương đương với Koshihikari 1	1	1
90				Ngileng		Dốc xuống		Uốn cong			5	5	5
	Giai đoạn chín Màu của mây	Cục sớm Màu trắng hơi vàng		Sớm	Giống như bông hoa	Ồ		Muộn		Rất muộn	2 7 Tháng 9	2 18/9	2 28/9
	Màu của mây: kiểu	Không có mặt	Rãnh màu vàng	Rãnh màu nâu	Đốm màu tím nhạt	Rãnh tím nhạt	Màu tím nhạt				1	1	1

Bảng 12

Giai đoạn	Tính trạng	Trị số đặc tính của cây trồng (so sánh với cây trồng chuẩn)									Nhận xét	Trị số đặc tính của cây trồng đối chứng
		1	2	3	4	5	6	7	8	9		
92	Mây ngoài: Màu anthoxyanin của phần trên	Không có mặt hoặc cực xám		Màu xanh xám		Trung bình		Đậm		Rất đậm	Trị số được đo ở Aichi Prefecture (2005-2006)	Koshihikari (Aichi Prefecture, 2005-2006)
	Mây ngoài: chiều dài			Ngắn		Trung bình		Dài			1	Nihonbare (Aichi Prefecture, 2006)
	Mây ngoài: Màu sắc	Màu trắng hơi vàng	Màu vàng	Màu đỏ	Màu tím nhạt						2	
	Thóc: khối lượng 1.000 hạt (chín)			Nhẹ		Trung bình		Nặng			1,9 mm	2
	Thóc: Phản ứng phenol của mây hoa trên	Không có		Màu xanh xám		Trung bình		Mạnh			1	1
	Gạo không xát : Chiều dài			Ngắn		Trung bình		Dài			5	5
	Gạo không xát : Chiều rộng			Mỏng		Trung bình		Dày			26,0 g	24,3 g
	Gạo không xát : Hình dạng (quan sát từ phía bên)	Tròn	Nửa hình tròn	Nửa hình thoi	Hình thoi dài	Trung bình					1	1
	Gạo không xát : Màu sắc	Màu trắng	Màu nâu nhạt	Đốm màu nâu	Màu nâu sẫm	Màu đỏ nhạt	Màu đỏ	đốm màu tím nhạt	Màu tím nhạt	Màu tím sẫm/màu đen	5	5
	Gạo không xát : Mùi thơm	Không có hoặc rất yếu	Nhẹ	Mạnh							2,96 mm	2,91 mm
											2	2
											2,05 mm	1,87 mm
											2	2
											1	1

Thật ra, cây lúa Koshihikari eichi 3go được trồng ở Hokkaido và, kết quả là, sự phát triển của cây lúa Koshihikari eichi 3go là sớm hơn cây lúa Koshihikari 24 ngày. Ngoài ra, cây lúa Koshihikari eichi 3go được chín vào khoảng thời gian gần như bình thường không như cây lúa Koshihikari. Ngoài ra từ các kết quả này, rõ ràng là có thể tạo ra cây trồng mới có tính trạng mục tiêu mà không làm thay đổi tính trạng được ưa thích có ở cây trồng ban đầu, bằng cách thiết kế hệ gen bằng cách sử dụng phương pháp thiết kế hệ gen thực vật theo sáng chế, và tạo ra cây trồng bằng cách sử dụng phương pháp tạo ra cây trồng mới theo sáng chế.

Sau đó, nhận thấy rằng vùng chứa gen Hd1 của Habataki có chức năng điều hoà đáng quan tâm đến cây lúa Koshihikari. Tức là vùng chứa gen Hd1 của Habataki có chức năng chuyển hoá cây lúa Koshihikari thành cây phát triển sớm trong vùng nằm ở phía bắc xa hơn Nagoya, nhưng có chức năng chuyển hoá cây lúa Koshihikari thành cây phát triển muộn trong vùng nằm ở phía nam Okinawa. Ví dụ, khi cây lúa Koshihikari eichi 3go được trồng ở Nagoya, sự phát triển của cây lúa Koshihikari eichi 3go được chuyển hoá thành sự phát triển sớm hơn cây lúa Koshihikari vào khoảng 10 ngày.

Mặt khác, cây lúa Koshihikari eichi 3go được trồng ở khu bãi cỏ phía Nam South Lawnsen ở Hồ Chí Minh của Vietnam có khí hậu nhiệt đới và, kết quả là, sự phát triển của cây lúa Koshihikari eichi 3go được chuyển hoá thành sự phát triển muộn hơn cây lúa Koshihikari 11 ngày. Tức là, được tìm ra rằng có thể trồng tốt hơn cây lúa Koshihikari eichi 3go ở cả vùng phía bắc và vùng phía nam.

Cây lúa Koshihikari là cây trồng có đặc tính tuyệt vời, tốt khi xét về mùi vị, nhưng ở các tỉnh phía bắc, thời gian từ khi gieo hạt đến lúc trổ bông là quá dài, và cây lúa Koshihikari không thể được trổ bông và chín một cách an toàn. Ngược lại, ở các tỉnh phía nam, vì cây lúa Koshihikari có thời gian trổ bông quá ngắn, và không thể thu được hiệu suất cao, vùng trồng của cây lúa này là bị giới hạn. Ví dụ, khi cây lúa Koshihikari được trồng ở các tỉnh có khí hậu nhiệt đới, thời gian trổ bông diễn ra chỉ trong khoảng 35 ngày, và trong nhiều trường hợp không thu được hiệu suất đủ cao. Trái lại, cây lúa Koshihikari eichi 3go được tạo ra bằng cách sử dụng phương pháp tạo ra cây trồng mới theo sáng chế có đặc tính phát triển tốt trong phạm vi vùng trồng rộng, mà vẫn duy trì được tính trạng tốt của cây lúa Koshihikari chẳng hạn như mùi vị

và các tính trạng tương tự.

Ví dụ 4

Để cải thiện đặc tính về hiệu suất và tính chống chịu không bị đè rạp ở cây lúa Koshihikari eichi 3go được tạo ra ở Ví dụ 3, tạo ra cây trồng mới là cây lúa Koshihikari kazusa 4go có tất cả vùng nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ Habataki lần lượt có ở cây lúa Koshihikari eichi 2go, cây lúa Koshihikari eichi 3go, và cây lúa Koshihikari eichi 4go, bằng cách sử dụng phương pháp thứ tư theo sáng chế.

Cụ thể, ghép đôi cây lúa Koshihikari eichi 3go và cây lúa Koshihikari eichi 2go, trồng hai trong số những cá thể thế hệ con thu được (hạt giống), và những cá thể này được tự thụ phấn (được tự ghép đôi). Từ những cá thể thế hệ con thu được bằng phương pháp tự thụ phấn này, thu được 100 hạt mà là cá thể thế hệ con tiếp theo. Trồng tất cả 100 hạt này, khảo sát các dấu chuẩn ADN của những cá thể thế hệ con tương ứng, và chọn lọc một cá thể trồng được trong đó cả hai dấu chuẩn ADN M3 (Hd1) và dấu chuẩn ADN M3 (Gn1) là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ Habataki. Cá thể này được xác định là P2 (HG).

Dựa vào dấu chuẩn ADN của những cá thể thế hệ con tương ứng, cho phát triển những cá thể tương ứng, chiết ADN từ lá cây được lấy mẫu từ cây con, và tiến hành phân tích bằng cách sử dụng ADN này.

Mặt khác, ghép đôi cây lúa Koshihikari eichi 4go và cây lúa Koshihikari eichi 2go, trồng năm cá thể thế hệ con thu được (hạt giống), và tự thụ phấn (tự ghép đôi) các cá thể này. Từ những cá thể thế hệ con thu được bằng phương pháp tự thụ phấn này, thu được 150 hạt là cá thể thế hệ con tiếp theo. Tất cả 150 hạt này được đem đi trồng, và khảo sát các dấu chuẩn ADN của những cá thể thế hệ con tương ứng, và chọn lọc cá thể trong đó cả dấu chuẩn ADN M3 (Sd1) và dấu chuẩn ADN M3 (Gn1) là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ Habataki. Cá thể này được xác định là P2 (SG).

Sau đó, P2 (HG) và P2 (SG) được ghép đôi, và trồng hai cá thể thế hệ con (hạt giống) thu được, và tự thụ phấn (tự ghép đôi) các cây này. Từ những cá thể thế hệ con thu được phương pháp tự thụ phấn này, thu được 100 hạt là cá thể thế hệ con tiếp theo. Trồng tất cả 100 hạt giống này, khảo sát các dấu chuẩn ADN từ những cá thể thế hệ con tương ứng, và chọn lọc một cá thể được trồng trong đó cả dấu chuẩn ADN M3 (Hd1) và dấu chuẩn ADN M3 (Sd1) là vùng đồng nhiễm sắc của alen có nguồn gốc từ

Habataki. Các tác giả đặt tên cây trồng mới này là cây lúa “Koshihikari kazusa 4go”. FIG. 22 là lược đồ thể hiện hệ gen của cây lúa Koshihikari kazusa 4go. Ở nhiễm sắc thể của cây lúa Koshihikari kazusa 4go, tất cả vùng gen Hd1, vùng Sd1 và vùng gen Gn1 được thay thế bằng mảnh đồng nhiễm sắc có nguồn gốc từ Habataki.

Tính trạng giữa cây lúa Koshihikari kazusa 4go Koshihikari và Nihonbare được so sánh và được nghiên cứu như ở ví dụ 1. Các kết quả này được trình bày ở các bảng từ 13 đến 16. Cây lúa Koshihikari kazusa 4go có chiều dài thân ngắn hơn và tính chống chịu không bị đẽ rạp cao hơn khi so với cây lúa Koshihikari và Nihonbare là các cây trồng đối chứng, giống như cây lúa Koshihikari eichi 4go. Ngoài ra, giống như cây lúa Koshihikari eichi 3go, thời gian trổ bông của cây lúa Koshihikari kazusa 4go là sớm hơn 9 ngày, và thời gian chín của cây lúa Koshihikari kazusa 4go là sớm hơn thời gian chín của cây lúa Koshihikari và Nihonbare. Ngoài ra, giống như cây lúa Koshihikari eichi 2go, mật độ sắp đặt hạt của cây lúa Koshihikari kazusa 4go là cao hơn, và số lượng hạt ở thân chính của cây lúa Koshihikari kazusa 4go là cao hơn ở cây lúa Koshihikari và Nihonbare. Tức là ở cây lúa Koshihikari kazusa 4go, mật độ sắp đặt hạt là cao hơn so với chiều dài của bông của chúng. Ngoài ra, khối lượng cho 1000 hạt thóc (chín) của cây lúa Koshihikari kazusa 4go là cao hơn khối lượng của cây lúa Koshihikari là cây trồng ban đầu. Đặc biệt, cây lúa Koshihikari kazusa 4go có hệ số thu hoạch bông rất cao hơn hệ số của cây lúa Koshihikari và Nihonbare, và nhận thấy rằng đặc tính thu hoạch của cây lúa Koshihikari kazusa 4go là rất tốt. Mặt khác, cây lúa Koshihikari kazusa 4go có các tính trạng khác về cơ bản là giống như các tính trạng của cây lúa Koshihikari.

Bảng 13

Giai đoạn	Tình trạng	Trị số đặc tính của cây trồng (so sánh với cây trồng chuẩn)										Nhận xét	Trị số đặc tính của cây trồng đối chứng	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	Trị số được đo		Koshihikari	Nihonbare
40	Lá: Màu anthoxyanin	Không có mặt								Có mặt	1	1	1	1
	Lá: phần ngọn	Chỉ ở phần ngọn	Chỉ ở phần mép	Như vết đốm	Toàn bộ lá cây						1	1	1	1
	Lá: Màu anthoxyanin của lông cuối phiến lá	Không có mặt								Có mặt	1	1	1	1
	Lá cây dạng lá cỏ: Dáng của phiến lá (Quan sát ban đầu)	Mọc đứng		Nửa mọc đứng		Nằm ngang		Uốn ngược lại			3	3	3	3
60	Lá cây dạng lá cỏ: Dáng của phiến lá (Quan sát lúc sau)	Mọc đứng		Nửa mọc đứng		Nằm ngang		Uốn ngược lại			4	4	4	4
90	Thời gian trở bông (ngày 50% trở bông)	Cực sớm		Sớm		Trung bình		Muộn			2 30/7	3 8/8	4 19/8	4 19/8
65	Mây ngoài: Màu anthoxyanin của phần trên (quan sát ban đầu)	Không có hoặc cực xám		Màu xanh xám		Trung gian		Mạnh		Rất mạnh	1	1	1	1

Bảng 14

Giai đoạn	Tính trạng	Trị số đặc tính của cây trồng (so sánh với cây trồng chuẩn)									Nhận xét	Trị số đặc tính của cây trồng đối chứng	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9		Koshihikari	Nihonbare
70	Thân cây: Chiều dài (dự tính cho bông, dự tính cho cây lúa nổi)	Rất ngắn		Ngắn		Trung bình			Dài	Rất dài	3 72,0 cm	6 105,2 cm	4 80,2 cm
	Thân cây: Màu anthoxyanin của nốt	Không có mặt								Có mặt	1	1	1
72-90	Bông: Chiều dài của trục chính			Ngắn		Trung bình			Dài		4 15,1 cm	4 14,7 cm	4 14,6 cm
70	Bông: Số bông			Ít		Trung bình			Nhiều		5 13,4 bông	5 12,4 bông	5 14 bông
70-80	Bông: phân bố râu ngọn	Chỉ ở phần ngọn		Chỉ ở nửa trên		Toàn bộ					1	1	1
60-80	Bông nhỏ: Nhiều hoặc ít tím lông ở mày ngoài	Không có mặt hoặc rất ít		Ít		Trung bình			Nhiều	Rất nhiều	Tương đương với Koshihikari		
80-90	Bông nhỏ: Màu của đầu mút mày ngoài (màu của đầu nhỏ)	Màu trắng	Màu vàng	Màu nâu	Màu đỏ	Màu tím nhạt	Màu đen				1	1	1
90	Bông: Múc độ uốn cong của trục chính	Mọc đứng		Ngừng		Dốc xuống			Uốn cong		5	5	5
	Bông: dạng bông	Dạng đầu cây giáo	Giống như hình thoi	Giống như con dơi	Giống như bông hoa	Ồ					2	2	2
	Giai đoạn chín	Cục sớm		Sớm		Trung bình			Muộn	Rất muộn	4 9/9	5 17/9	6 29/9
	Màu của mày	Màu trắng hơi vàng	Màu vàng	Màu nâu	Màu tím nhạt đỏ sẫm	Màu tím nhạt	Màu đen				1	1	1
	Màu của mày: kiểu	Không có	Rãnh màu vàng	Rãnh màu nâu	đốm màu tím nhạt	Rãnh màu tím nhạt					1	1	1

Bảng 15

Giai đoạn	Tính trạng	Trị số đặc tính của cây trồng (so sánh với cây trồng chuẩn)									Nhận xét	Trị số đặc tính của cây trồng đối chứng	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9			
92	Mây ngoài: Màu anthoxyanin của phần trên	Không có mặt hoặc cực xám		Màu xanh xám		Trung bình		Sẫm		Rất sẫm	1	1	
	Mây ngoài: chiều dài			Ngắn		Trung bình		Dài			2	2	
	Mây ngoài: Màu sắc	Màu trắng hơi vàng	Màu vàng	Màu đỏ	Màu tím nhạt						1	1	
	Thóc: khối lượng 1.000 hạt (chín)			Nhẹ		Trung bình		Nặng			6	5	
	Thóc: Phản ứng phenol của máy hoa trên	Không có mặt		Màu xanh xám		Trung bình		Sẫm		Có mặt	23,6 g	22,9 g	
	Gạo không xát : Chiều dài			Ngắn		Trung bình		Dài			1	1	
	Gạo không xát : Chiều rộng			Mỏng		Trung bình		Dày			5	5	
	Gạo không xát : Hình dạng (quan sát từ phía bên)	Tròn	Nửa hình tròn	Nửa hình thoi	Hình thoi	Hình thoi dài					2,85 mm	2,81 mm	
	Gạo không xát : Màu sắc	Màu trắng	Màu nâu nhạt	Đốm màu nâu	Màu nâu sẫm	Màu đỏ nhạt	Màu đỏ	Đốm màu tím nhạt	Màu tím nhạt	Màu tím sẫm/màu đen	1,96 mm	1,98 mm	
	Gạo không xát : Mùi thơm	Không có mặt hoặc rất yếu	Nhẹ	Mạnh							2	2	
GII	Mật độ sắp đặt hạt		Rất thưa	Thưa	Hơi thưa	Trung bình	Hơi nặng	Nặng	Rất nặng		7	6	
											10,5 hạt/cm ²	9,7 hạt/cm ²	
													5
													7,8 hạt/cm ²

Bảng 16

Giai đoạn	Tính trạng	Trị số đặc tính của cây trồng (so sánh với cây trồng chuẩn)								Nhận xét	Trị số đặc tính của cây trồng đối chứng	
		1	2	3	4	5	6	7	8		Koshihikari	Nihonbare
GIII	Số hạt ở thân chính	Rất nhỏ		Nhỏ		Trung bình		Nhiều		9	5	4
	Chiều dài giống thứ nhất ở thân chính	Rất ngắn		Ngắn		Trung bình		Dài		Rất dài	8	8
	Chiều dài giống thứ hai ở thân chính	Rất ngắn		Ngắn		Trung bình		Dài		Rất dài	33,3 cm	34,7 cm
	Chiều dài giống thứ ba ở thân chính	Rất ngắn		Ngắn		Trung bình		Dài		Rất dài	5	5
	Chiều dài giống thứ tư ở thân chính	Rất ngắn		Ngắn		Trung bình		Dài		Rất dài	21,42 cm	17,35 cm
	Chiều dài giống thứ năm ở thân chính	Rất ngắn		Ngắn		Trung bình		Dài		Rất dài	4	5
	Chiều dài giống thứ sáu ở thân chính	Rất ngắn		Ngắn		Trung bình		Dài		Rất dài	12,22 cm	14,35 cm
	Chiều dài giống thứ bảy ở thân chính	Rất ngắn		Ngắn		Trung bình		Dài		Rất dài	3	5
	Chiều dài giống thứ tám ở thân chính	Rất ngắn		Ngắn		Trung bình		Dài		Rất dài	7,26 cm	8,375 cm
	Chiều dài giống thứ chín ở thân chính	Rất ngắn		Ngắn		Trung bình		Dài		Rất dài	3	5
	Dày của cây lúa thân chính	Rất mỏng		Mỏng		Trung bình		Dày		Rất dày	1	2
	Chiều dài của cây lúa thân chính	Rất ngắn		Ngắn		Trung bình		Dài		Rất dài	0 cm	1 cm
	Chiều rộng của cây lúa thân chính	Rất mỏng		Mỏng		Trung bình		Rộng		Rất rộng	5	5
	Hệ số thu hoạch bông	Rất thấp		Thấp		Trung bình		Cao		Rất cao	8	2
											56,8	36,9
											5	5
											3,26 mm	3,27 mm
											5	5
											44,6	36,9
											56,8	36,9
											5	5

Tức là bằng cách so sánh tính trạng giữa cây lúa Koshihikari kazusa 4go, cây lúa Koshihikari và Nihonbare, khẳng định được rằng cây lúa Koshihikari kazusa 4go có tính trạng được dự tính khi thiết kế hệ gen đó là gen Sd1, gen Hd1 và gen Gn1 được thay thế bằng gen có nguồn gốc từ Habataki mà không gây ảnh hưởng đến các tính trạng khác của cây lúa Koshihikari như là cây trồng ban đầu.

Do đó, từ các kết quả này, rõ ràng là, bằng cách ghép đôi cây trồng mới được tạo ra bằng cách sử dụng phương pháp tạo ra cây trồng mới theo sáng chế, có thể thu được cá thể thế hệ con trong đó tích lũy tất cả các mảnh đồng nhiễm sắc có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai mà cây mẹ là cây mang hạt và cây cha là cây cho phần sở hữu, một cách tương ứng, và ngoài ra còn thấy rõ ràng rằng có thể tạo ra được cây trồng mới có nhiều dạng tính trạng mục tiêu mà không làm thay đổi tính trạng được ưa thích có ở cây trồng ban đầu.

Sau đó, thể hiện tỷ lệ thay thế hệ gen cây lúa Koshihikari (tỷ lệ của hệ gen cây lúa Koshihikari là cây trồng ban đầu chiếm trong toàn bộ hệ gen) liên quan đến mỗi cây trồng là cây lúa Koshihikari kazusa 4go và cây lúa Koshihikari eiichi từ 2 đến 4go được tạo ra trong các ví dụ.

Chiều dài của mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ Habataki ở cây lúa Koshihikari eiichi từ 2 đến 4go được tạo ra ở các ví dụ 1 đến 3 được trình bày ở Bảng 17. Chiều dài nhỏ nhất có thể của mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ Habataki là d2 và chiều dài tối đa của chúng là d1 + d2 + d3.

Bảng 17

	Khoảng cách giữa các dấu chuẩn (kbp)			Tối thiểu (kbp)	Tối đa (kbp)
	d1	d2	d3	d2	d1+d2+d3
Koshihikari eiichi 2go	201,3	37,0	6,9	37,0	245,2
Koshihikari eiichi 3go	344,2	1507,9	1278,7	1507,9	3130,8
Koshihikari eiichi 4go	1,6	90,4	750,2	90,4	841,9

Từ chiều dài của mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ Habataki trong Bảng 17, tính toán tỷ lệ thay thế hệ gen lạ [chiều dài mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ Habataki/chiều dài toàn bộ hệ gen X 100(%)] và tỷ lệ thay thế hệ gen cây lúa Koshihikari [100% - tỷ lệ thay thế hệ gen lạ]. Các kết quả được trình bày ở Bảng 18.

Chiều dài hệ gen đầy đủ được thiết lập là 430 Mbp.

Bảng 18

	Tỷ lệ thay thế hệ gen lạ (%)		tỷ lệ thay thế hệ gen Koshihikari (%)	
	Tối đa	Tối thiểu	Tối đa	Tối thiểu
Koshihikari eiichi 2go	0,0570	0,0086	99,9914	99,9430
Koshihikari eiichi 3go	0,7281	0,3507	99,6493	99,2719
Koshihikari eiichi 4go	0,1958	0,0210	99,9790	99,8042
Koshihikari kazusa 4go	0,9809	0,3803	99,6197	99,0191

Như được chỉ ra trên Bảng 18, vì tất cả cây trồng mới được tạo ra bằng phương pháp theo sáng chế có tỷ lệ thay thế hệ gen Koshihikari đủ cao (do tỷ lệ thay thế bằng hệ gen là đủ thấp), tính trạng không phải là tính trạng do gen mục tiêu tái tổ hợp là tương đương với tính trạng của cây lúa Koshihikari (cây trồng ban đầu), và có thể nói rằng cây trồng mới dòng đồng genotyp của cây lúa Koshihikari.

Cây lúa Koshihikari kazusa 4go là cây trồng mới được tạo ra bằng cách sử dụng phương pháp tạo ra cây trồng mới theo sáng chế, và là cây trồng mới rất tốt, tốt về tính chống chịu không bị đẽ rập, và có sản lượng cao và vùng trồng rộng trong khi đó vẫn giữ được tính trạng tốt chẳng hạn như mùi vị ở cây lúa Koshihikari. Sau đó, người nộp đơn đã nộp lưu (Ngày chấp nhận nhận đơn 1/7/2008) cây lúa Koshihikari kazusa 4go như là cây trồng mới ở Cơ quan lưu giữ sinh vật cho việc nộp patent quốc tế International Patent Organism Depository, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (Tsukuba Center Chuou 6th, Higashi 1-1-1, Tsukuba-shi, Ibaragi-ken, Japan (mã số bưu điện 305-8566)), và mẫu này được chuyển tới Phòng lưu giữ quốc tế - International Deposition ở Viện này (Ngày chấp nhận nhận đơn 30/6/2009). Số lưu giữ ở Cơ quan lưu giữ quốc tế là FERM AMP-11140.

Ứng dụng công nghiệp

Vì khi sử dụng phương pháp tạo ra cây trồng mới theo sáng chế, có thể kiểm soát được vùng của mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ cây trồng ngoại lai được đưa vào, và có thể cây trồng mới có một hoặc nhiều dạng tính trạng mục tiêu mà không làm thay đổi tính trạng được ưa thích có ở cây trồng ban đầu, nên có thể sử dụng phương pháp này, đặc biệt, trong lĩnh vực chọn giống cây trồng.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Cây trồng *Oryza sativa* L. Koshihikari kazusa 4go, có số lưu giữ tại cơ quan lưu giữ quốc tế FERM BP-11140.

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

3. Phương pháp phân biệt cây trồng thực vật liệu một cá thể thực vật có phải hay không phải là cây trồng cụ thể, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

thiết lập SP-4009 là dấu chuẩn ADN M1, thiết lập G2003 là dấu chuẩn ADN M2, thiết lập G2002 là dấu chuẩn ADN M3, thiết lập SP-462 là dấu chuẩn ADN M4, và thiết lập SP-1259 là dấu chuẩn ADN M5;

định typ một hoặc nhiều dấu chuẩn ADN được chọn từ nhóm bao gồm các dấu chuẩn ADN từ M1 đến M5 bằng cách phân tích hệ gen cá thể thực vật; và

phân biệt được rằng cá thể thực vật này là cây trồng *Oryza sativa* L. Koshihikari eichi 4go hoặc cây trồng *Oryza sativa* L. Koshihikari kazusa 4go khi kết quả định typ thu được là phù hợp với kết quả cây trồng *Oryza sativa* L. Koshihikari eichi 4go hoặc cây trồng *Oryza sativa* L. Koshihikari kazusa 4go.

4. Phương pháp phân biệt liệu một cá thể thực vật có phải hay không phải là cây trồng cụ thể, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

thiết lập SP-2032 là dấu chuẩn ADN M1, thiết lập SP-170 là dấu chuẩn ADN M2, thiết lập SP-4028 là dấu chuẩn ADN M3, thiết lập SP4038 là dấu chuẩn ADN M4, và thiết lập SP-4030 là dấu chuẩn ADN M5;

định typ một hoặc nhiều dấu chuẩn ADN được chọn từ nhóm bao gồm các dấu chuẩn ADN từ M1 đến M5 bằng cách phân tích hệ gen cá thể thực vật; và

phân biệt được rằng cá thể thực vật này là cây trồng *Oryza sativa* L. Koshihikari eichi 2go hoặc cây trồng *Oryza sativa* L. Koshihikari kazusa 4go khi kết quả định typ thu được là phù hợp với kết quả của cây trồng *Oryza sativa* L. Koshihikari eichi 2go hoặc cây trồng *Oryza sativa* L. Koshihikari kazusa 4go.

5. Phương pháp phân biệt cây trồng thực vật, trong đó phương pháp này là phương

pháp phân biệt liệu một cá thể thực vật có phải hay không phải là cây trồng cụ thể, phương pháp này bao gồm các bước:

thiết lập P-2513 là dấu chuẩn ADN M1, thiết lập SP-586 là dấu chuẩn ADN M2, thiết lập SP-2254 là dấu chuẩn ADN M3, thiết lập SP-1603 là dấu chuẩn ADN M4, và thiết lập SP-604 là dấu chuẩn ADN M5;

định typ một hoặc nhiều dấu chuẩn ADN được chọn từ nhóm bao gồm các dấu chuẩn ADN từ M1 đến M5 bằng cách phân tích hệ gen cá thể thực vật; và

phân biệt được rằng cá thể thực vật này là cây trồng *Oryza sativa* L. Koshihikari eichi 3go hoặc cây trồng *Oryza sativa* L. Koshihikari kazusa 4go khi kết quả định typ thu được là phù hợp với kết quả của cây trồng *Oryza sativa* L. Koshihikari eichi 3go hoặc cây trồng *Oryza sativa* L. Koshihikari kazusa 4go.

FIG. 1

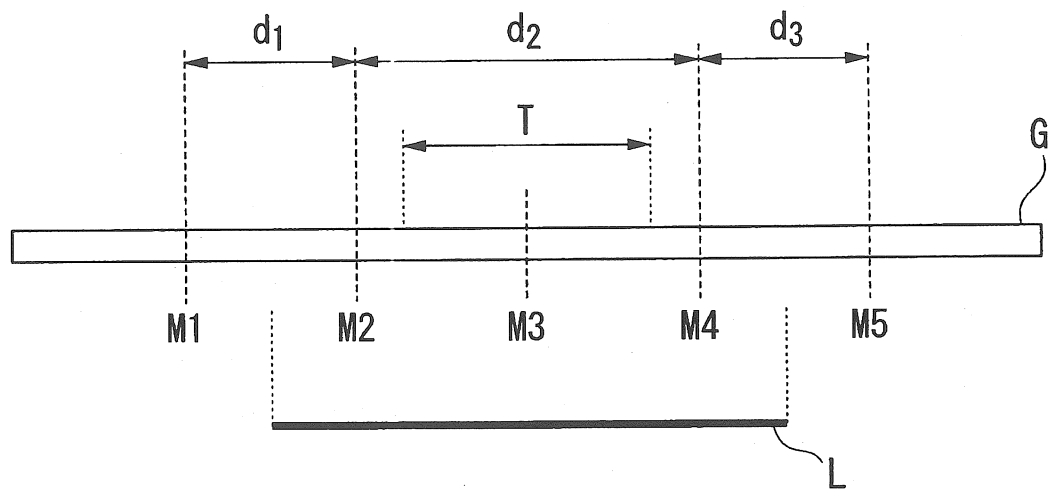


FIG. 2A

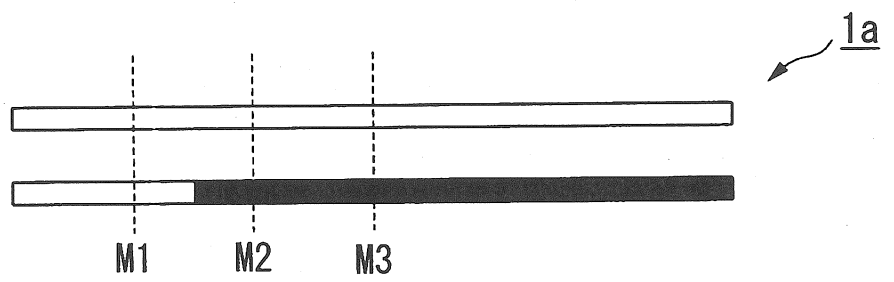


FIG. 2B

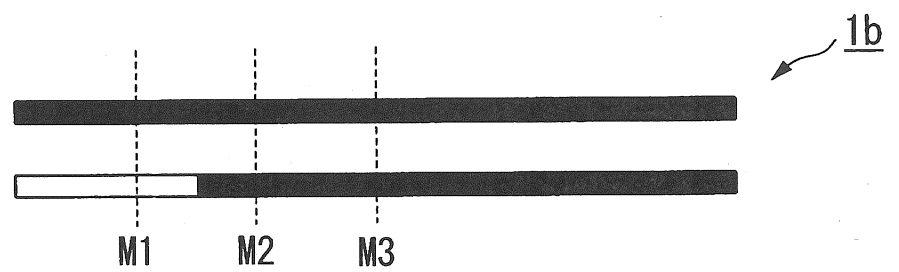


FIG. 2C

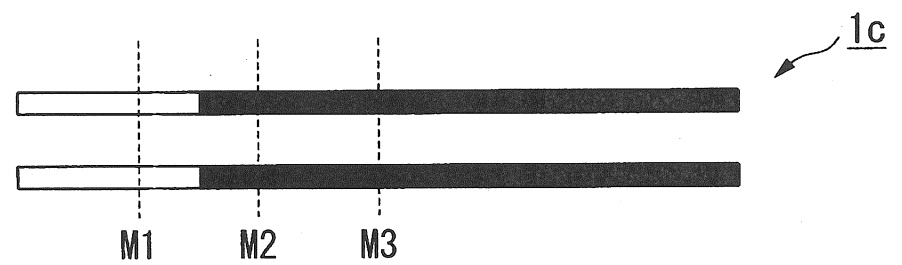


FIG. 2D

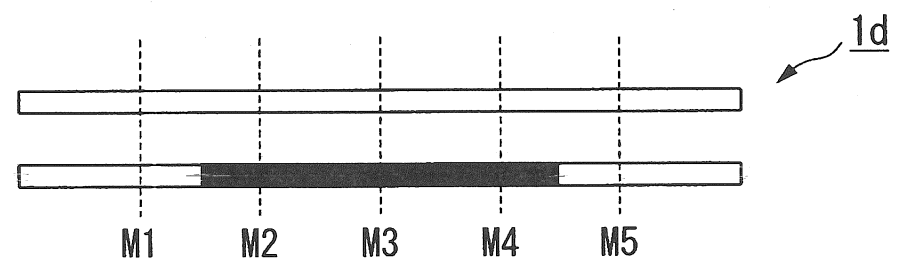


FIG. 2E

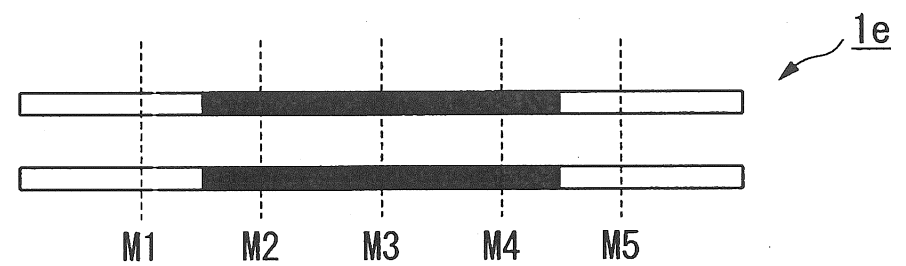


FIG. 2F

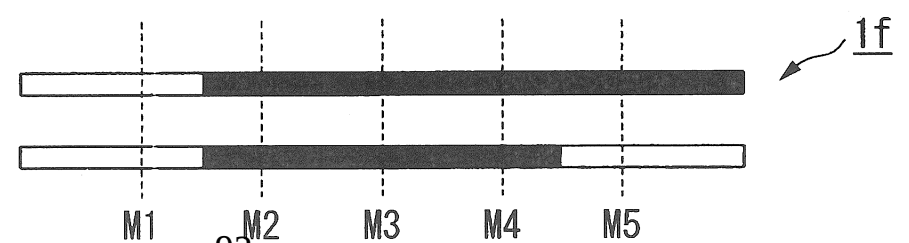


FIG. 3A

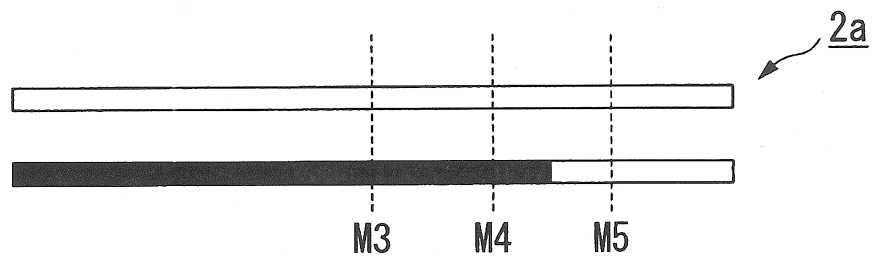


FIG. 3B

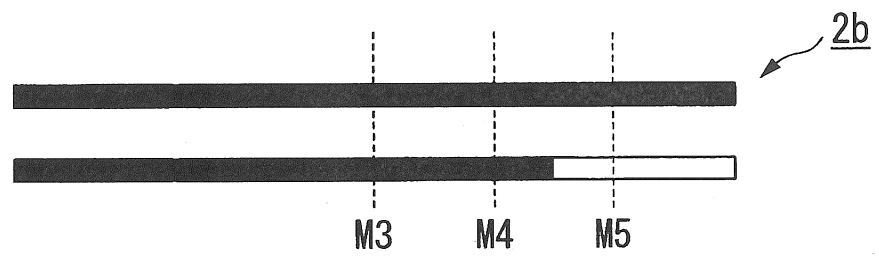


FIG. 3C

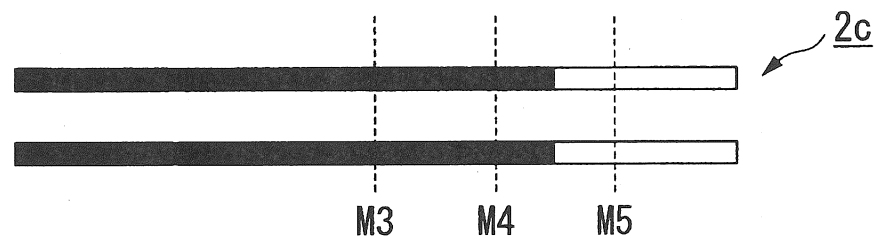


FIG. 3D

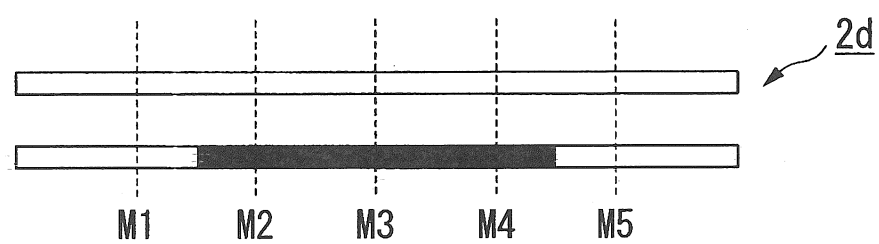


FIG. 3E

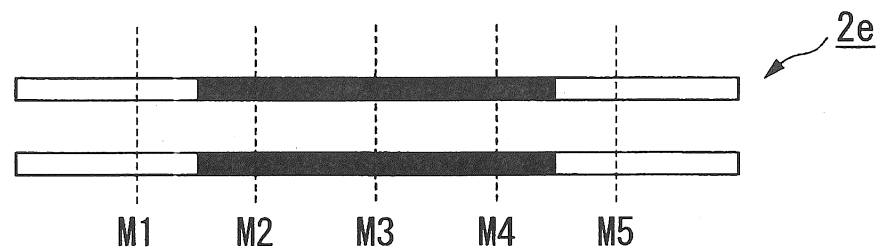


FIG. 3F

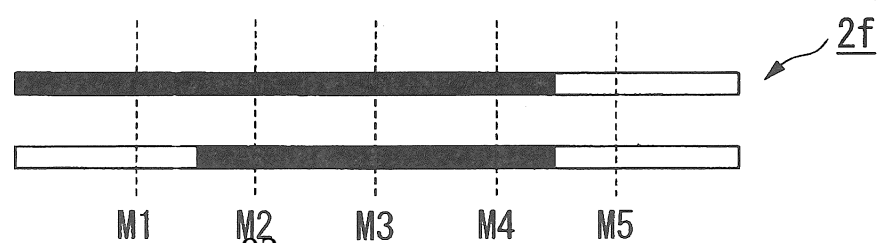


FIG. 4A

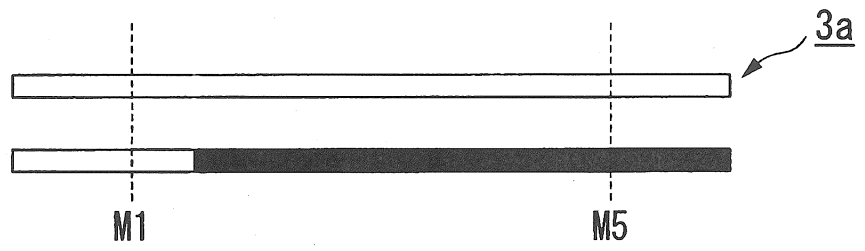


FIG. 4B

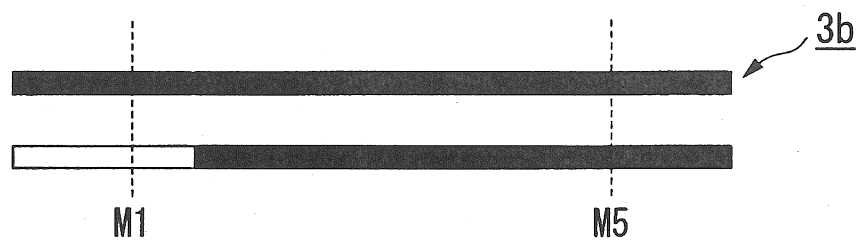


FIG. 4C

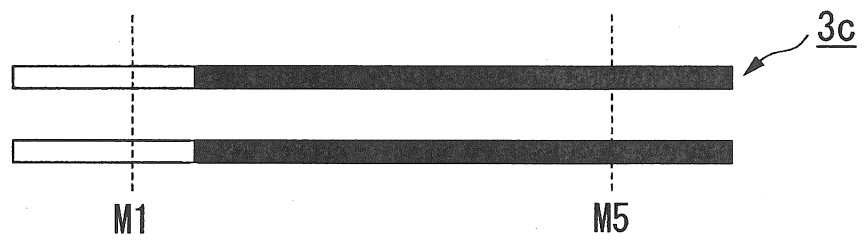


FIG. 4D

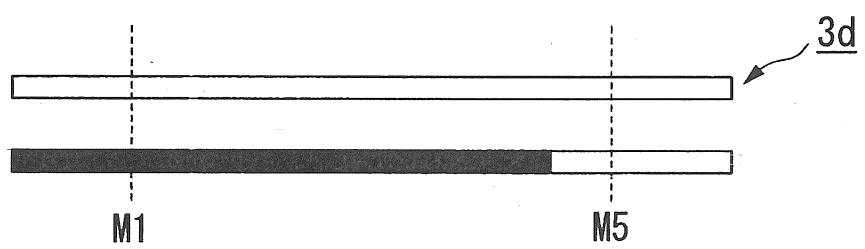


FIG. 4E

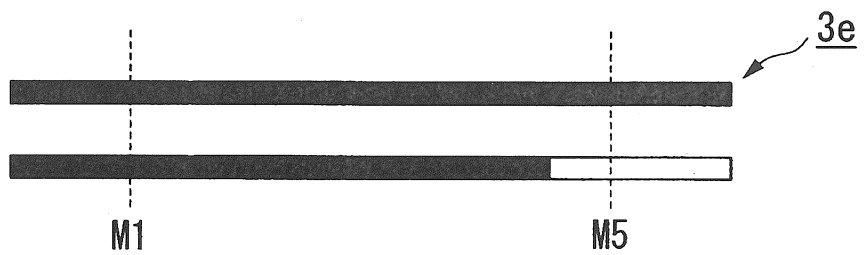


FIG. 4F

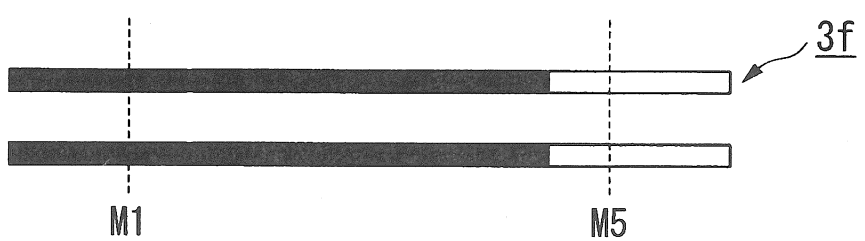


FIG. 5A

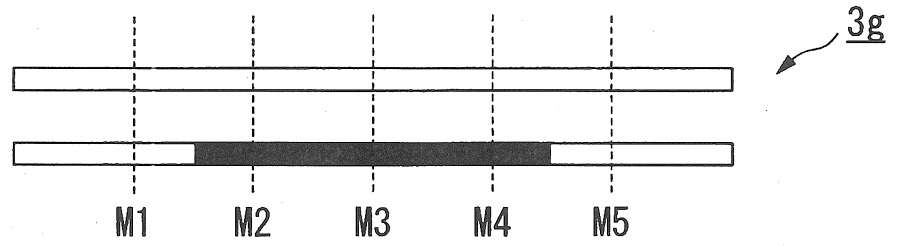


FIG. 5B

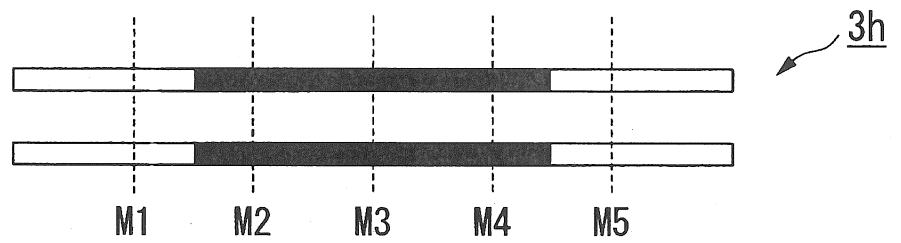


FIG. 5C

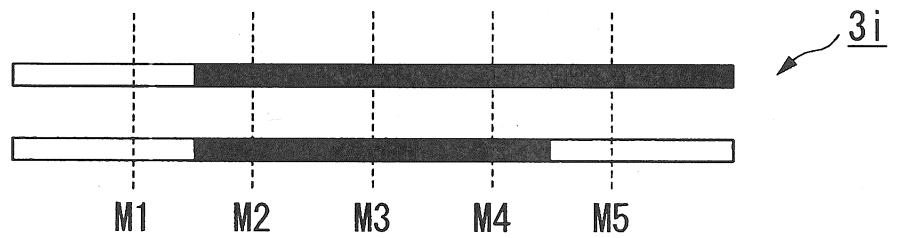


FIG. 5D

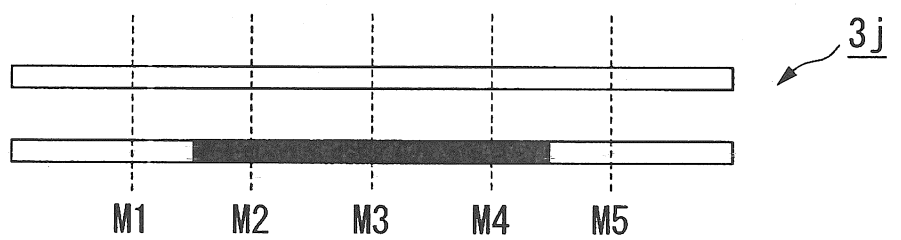


FIG. 5E

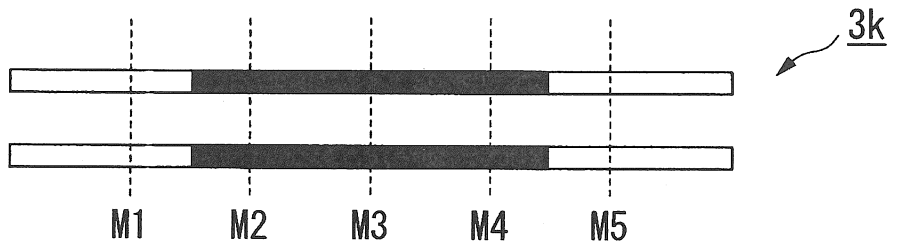


FIG. 5F

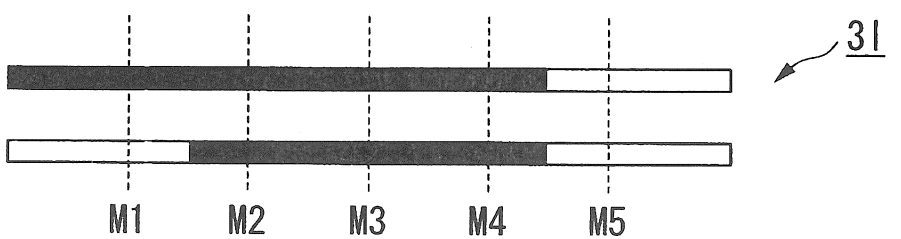


FIG. 6A

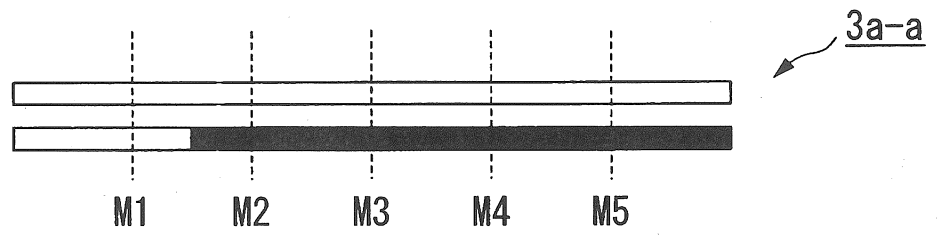


FIG. 6B

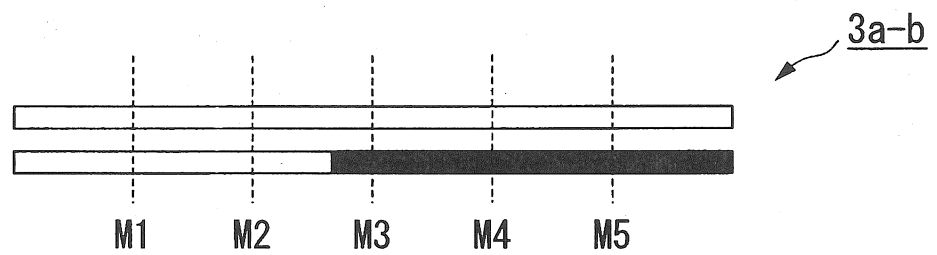


FIG. 6C

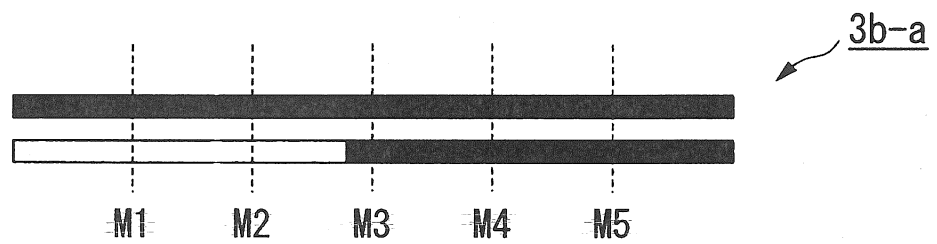


FIG. 6D

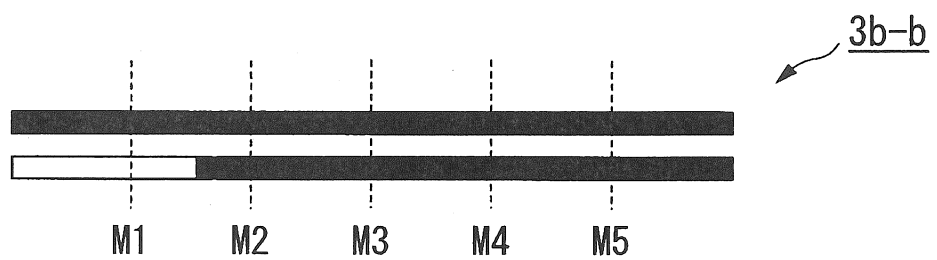


FIG. 7A

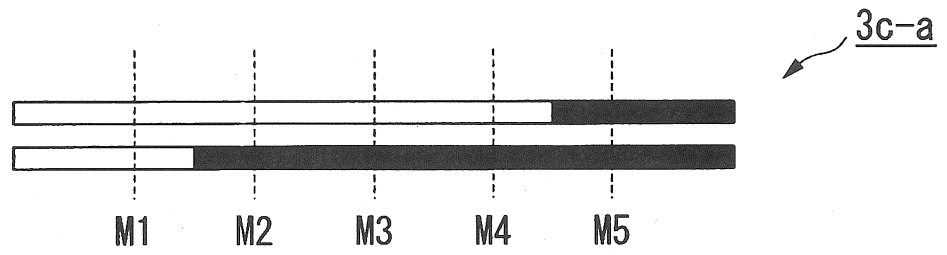


FIG. 7B

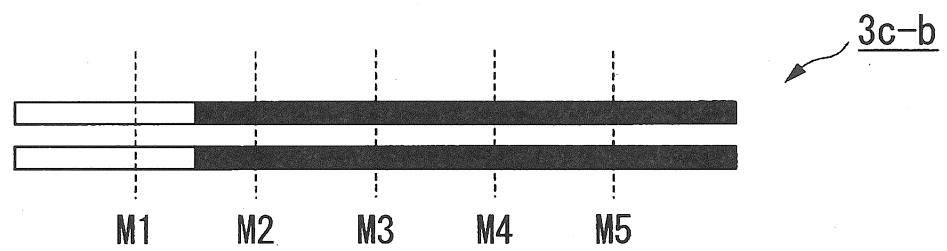


FIG. 7C

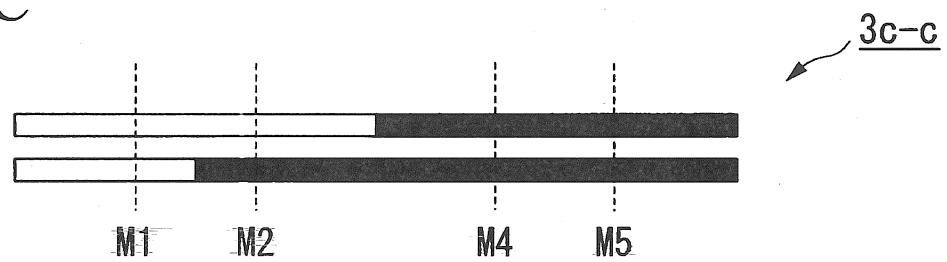


FIG. 7D

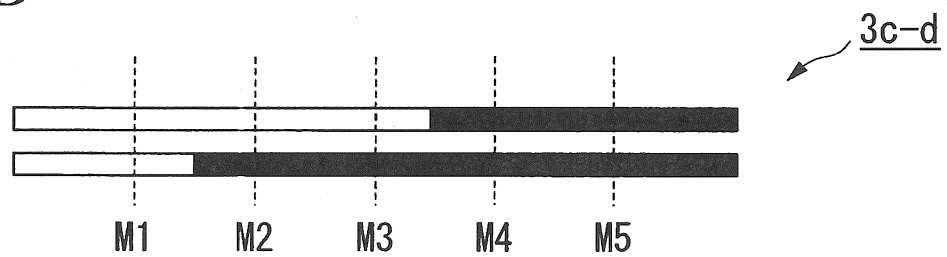


FIG. 7E

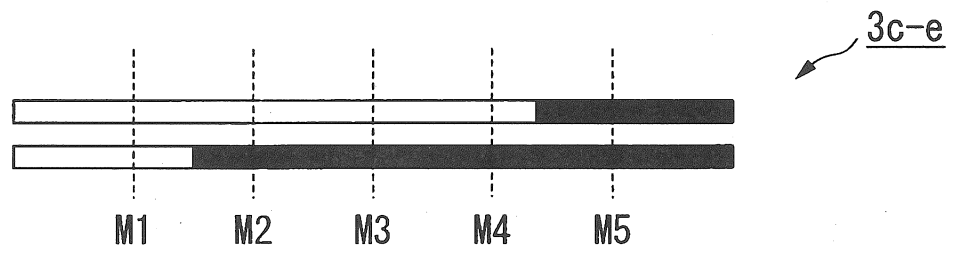


FIG. 7F

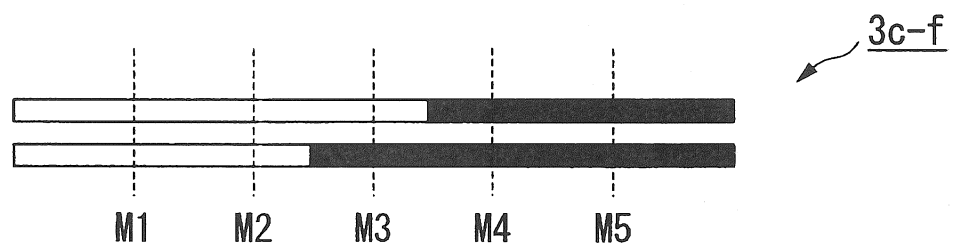


FIG. 7G

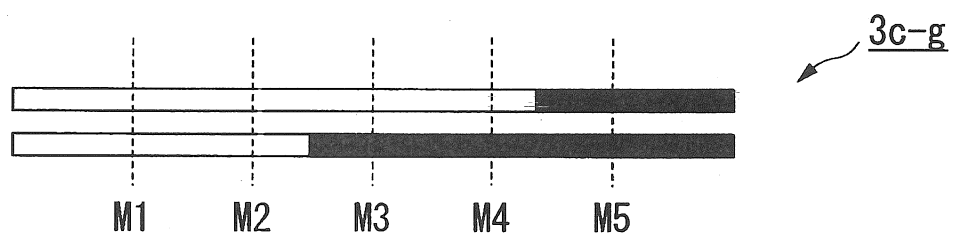


FIG. 8A

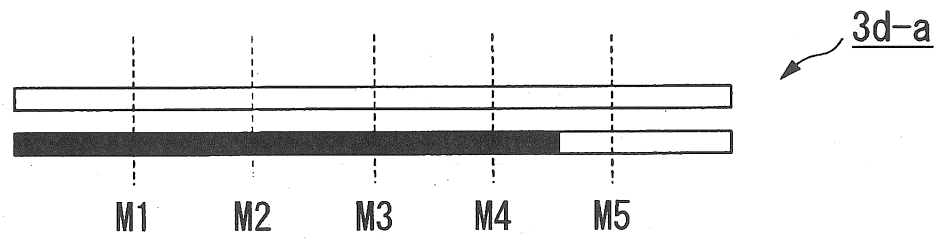


FIG. 8B

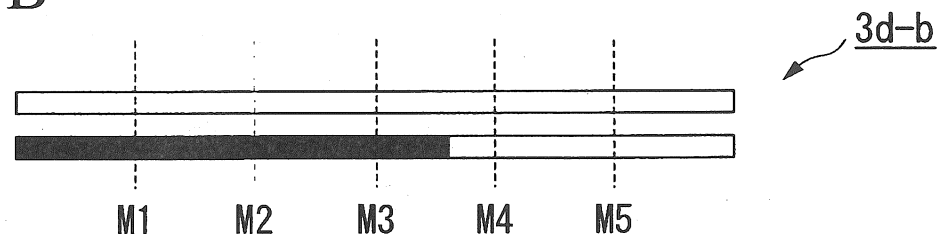


FIG. 8C

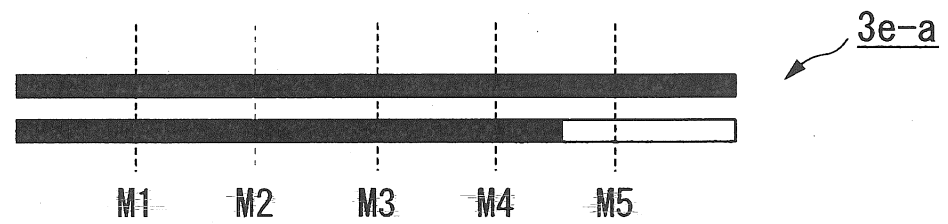


FIG. 8D

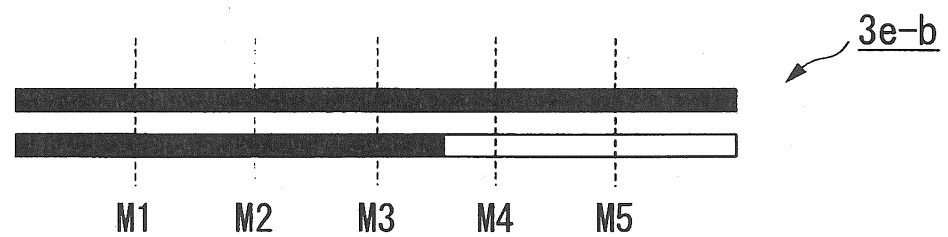


FIG. 9A

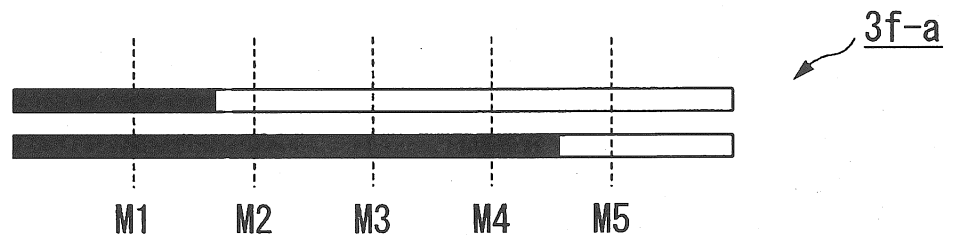


FIG. 9B

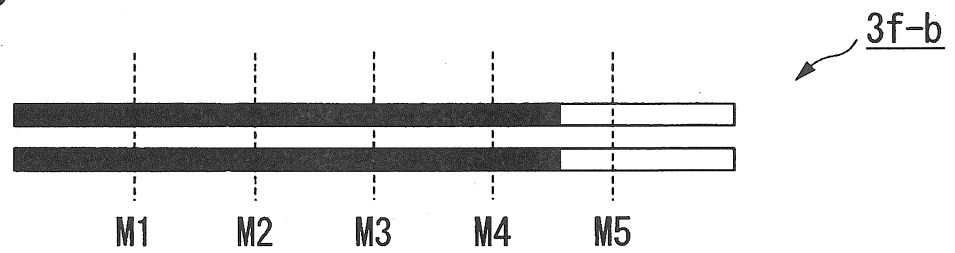


FIG. 9C

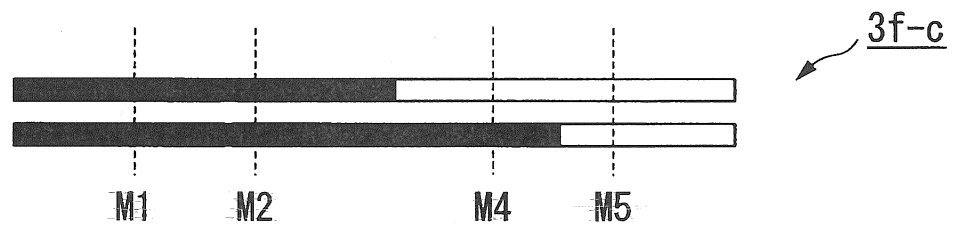


FIG. 9D

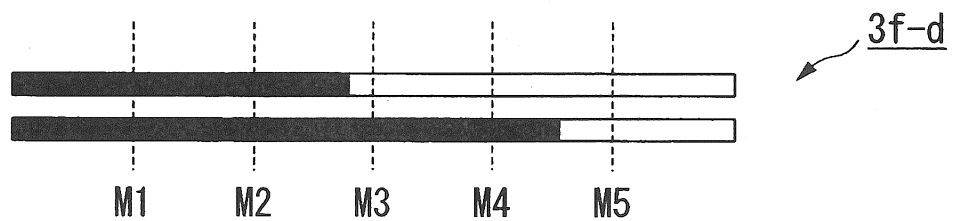


FIG. 9E

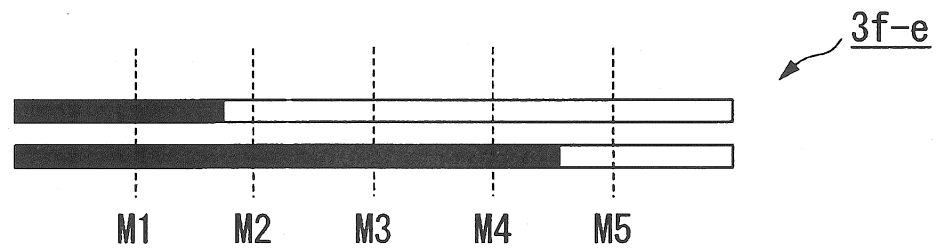


FIG. 9F

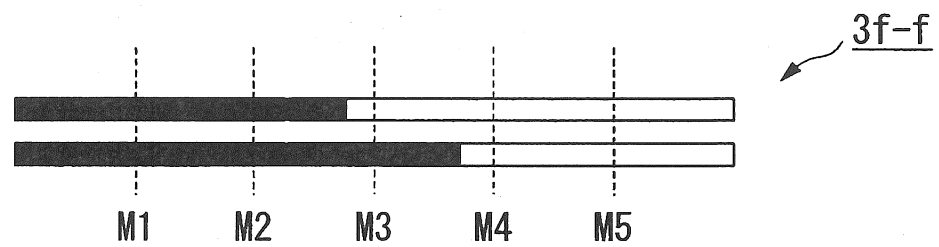


FIG. 9G

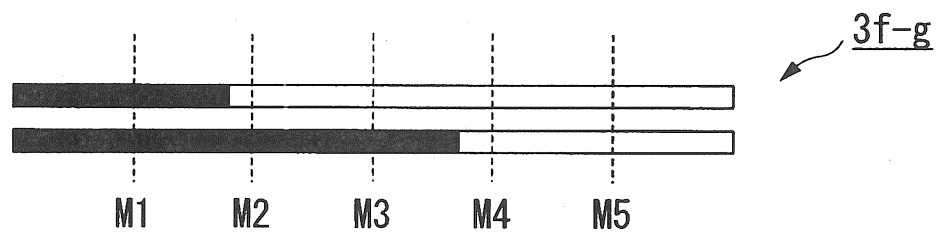


FIG. 10A

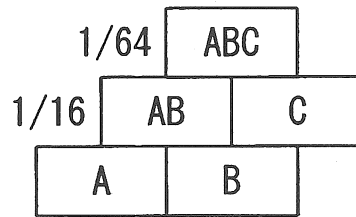


FIG. 10B

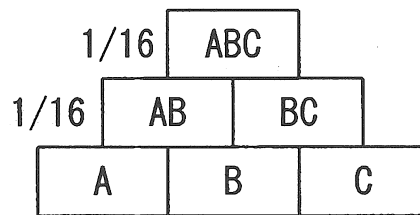


FIG. 11A

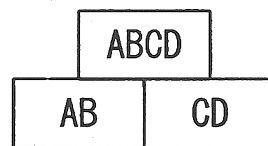


FIG. 11B

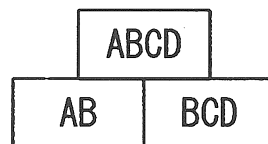


FIG. 11C

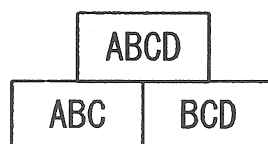


FIG. 12A

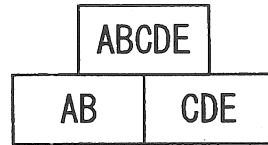


FIG. 12B

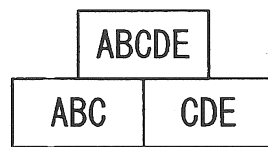


FIG. 12C

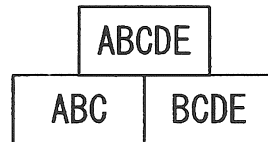


FIG. 12D

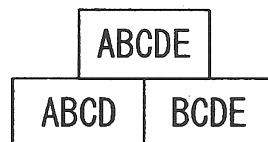


FIG. 13A

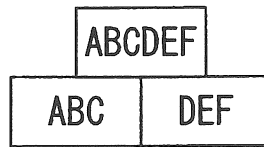


FIG. 13B

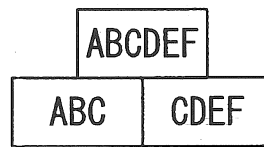


FIG. 13C

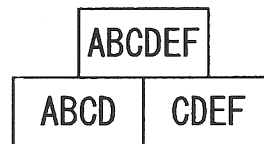


FIG. 13D

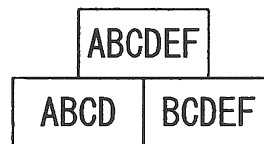


FIG. 13E

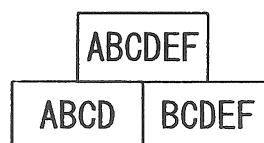


FIG. 14A

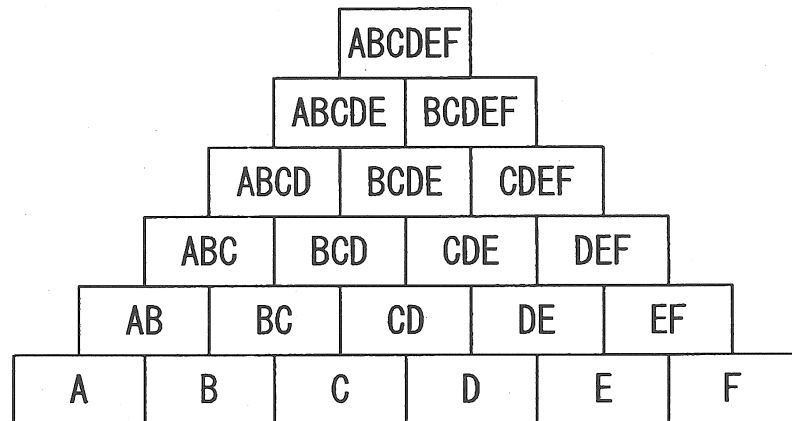


FIG. 14B

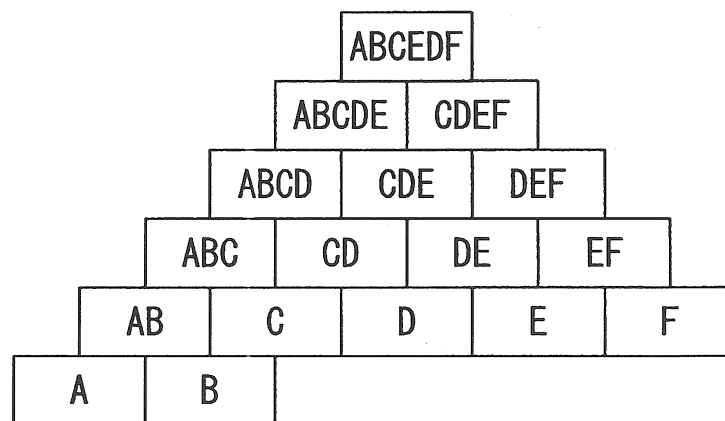


FIG. 14C

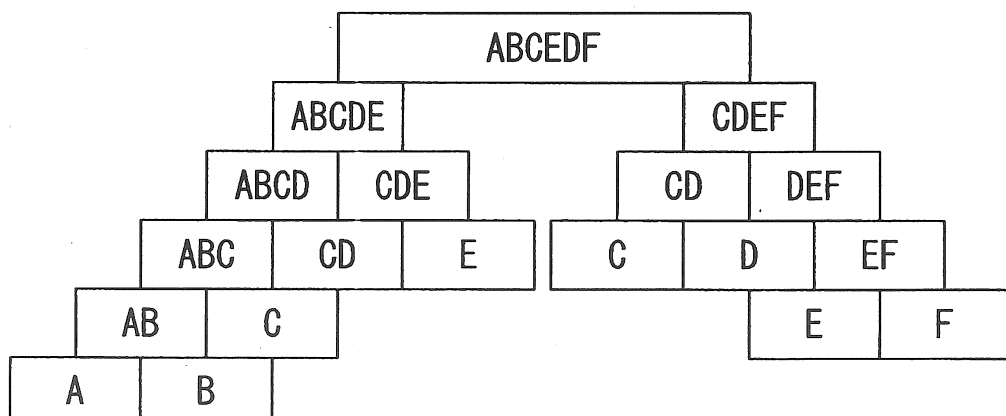


FIG. 15

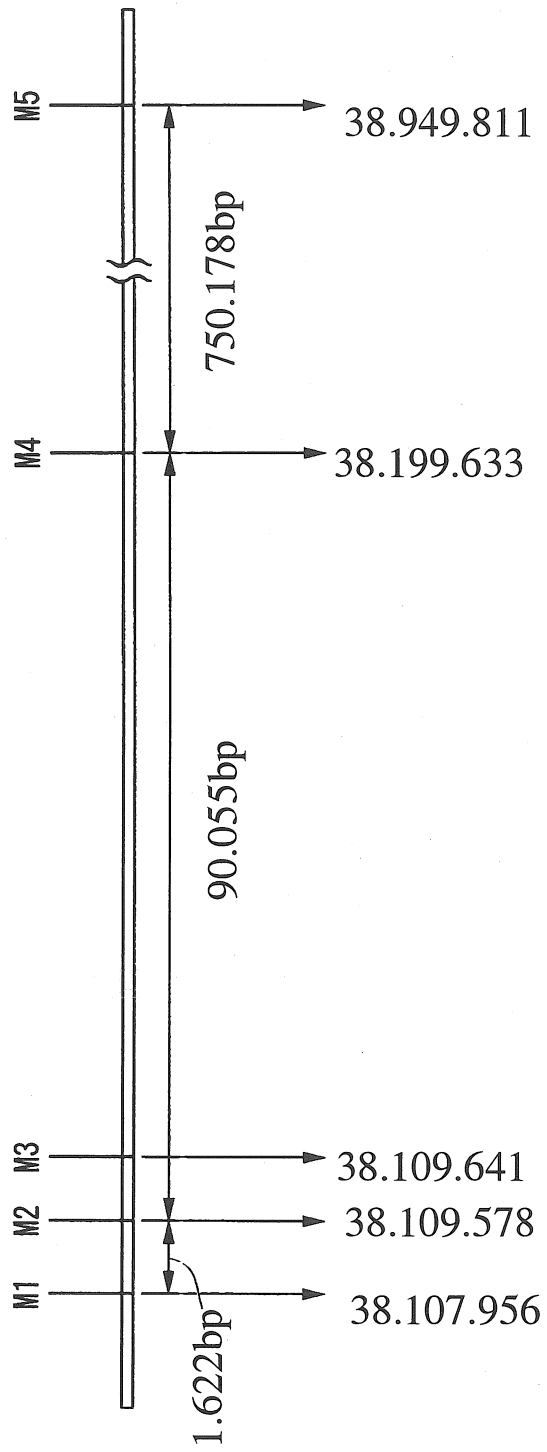


FIG. 16

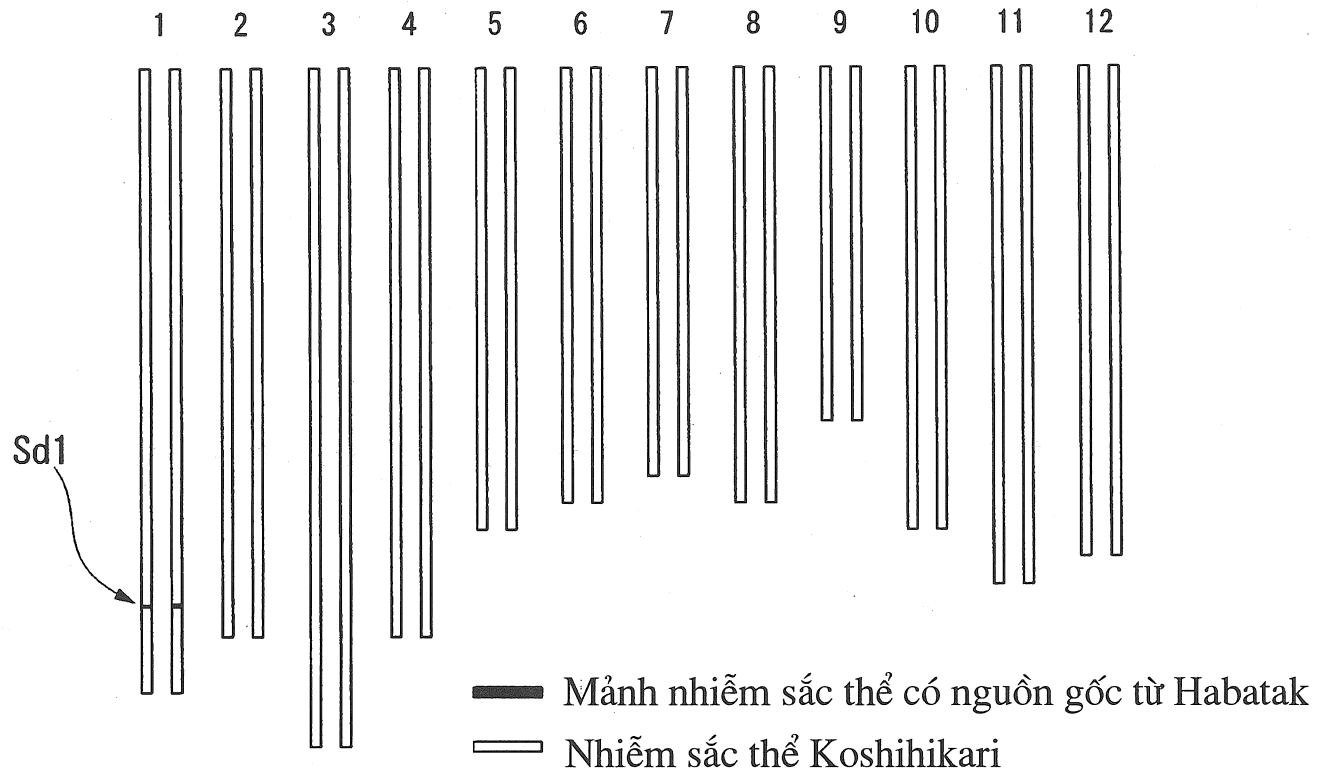


FIG. 17



FIG. 18

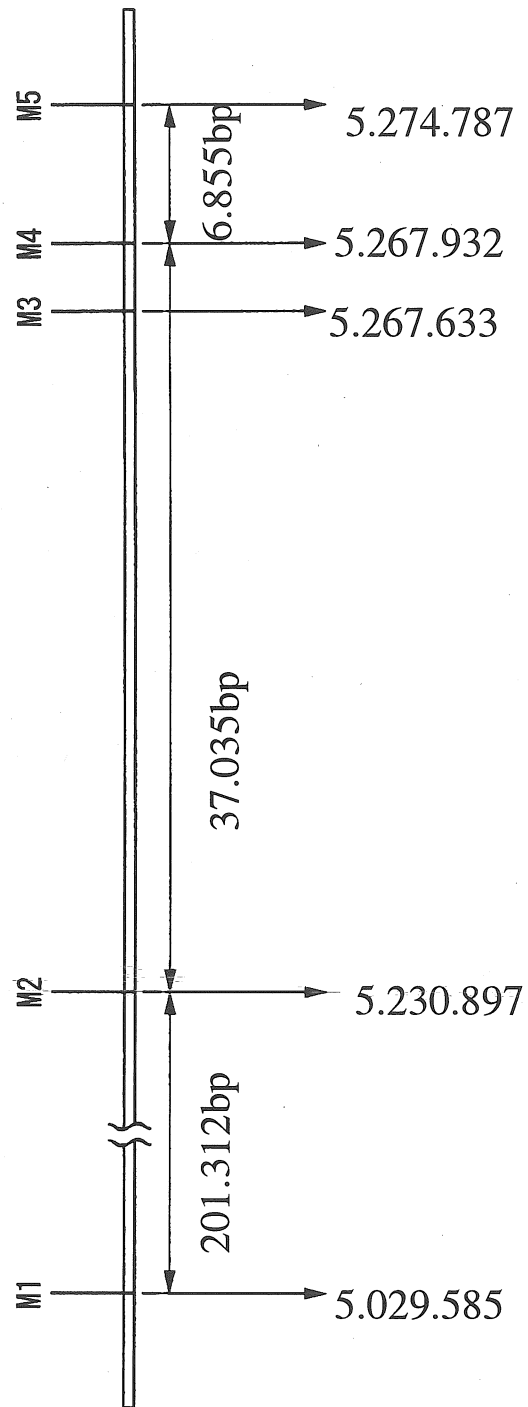


FIG. 19

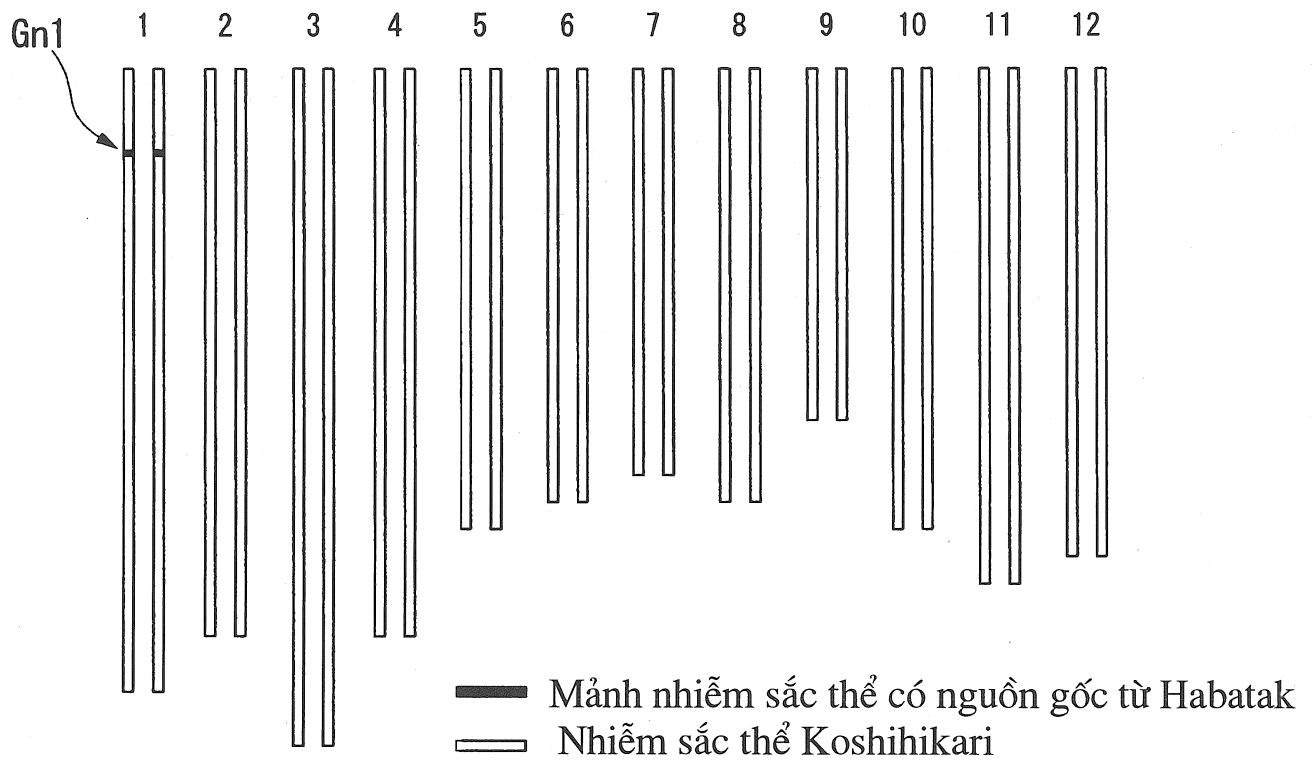


FIG. 20

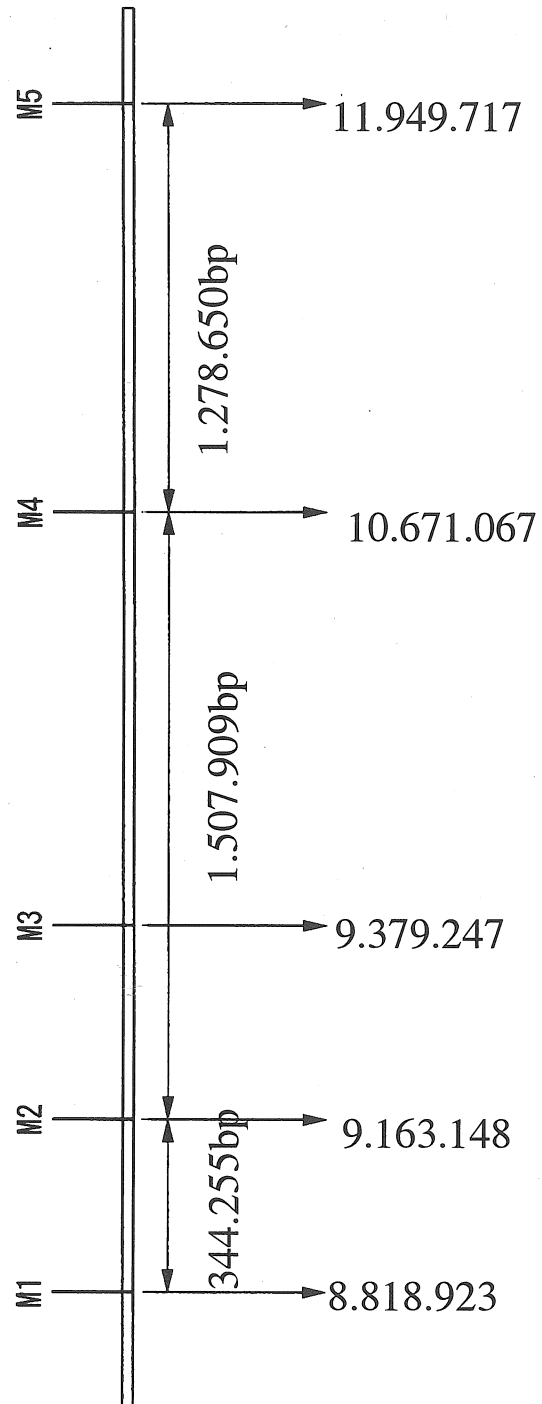


FIG. 21

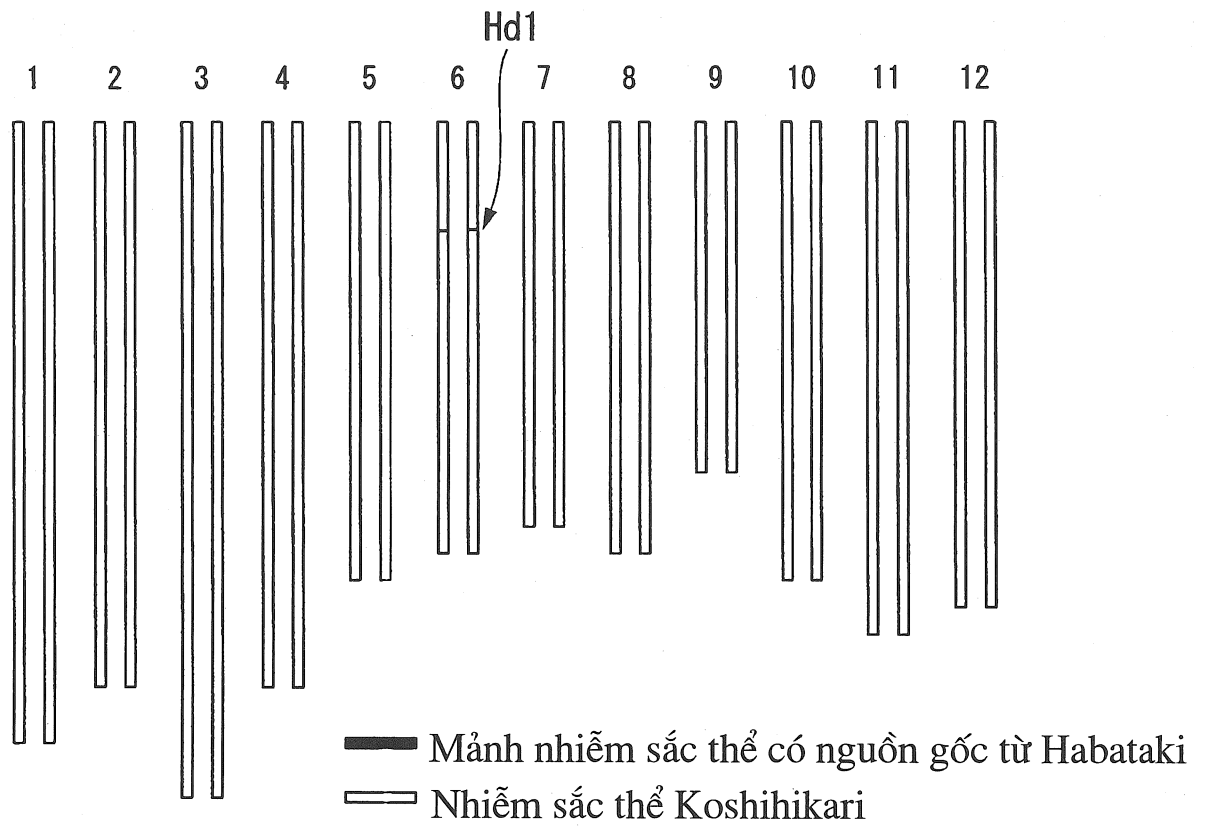


FIG. 22

