



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

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

(11)



1-0029524

(51)⁷ A01H 5/00; C12N 15/09

(13) B

(21) 1-2013-02876

(22) 18/03/2011

(86) PCT/JP2011/056548 18/03/2011

(87) WO2012/127558 27/09/2012

(45) 25/09/2021 402

(43) 27/01/2014 310A

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

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

(72) LIN Shaoyang (CN).

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

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

(57) Mục đích của sáng chế là tạo ra cây lúa mới chín sớm hơn cây trồng ban đầu, và phương pháp làm cho cá thể cây lúa chín sớm hơn. Sáng chế đề cập đến cây lúa *Koshihikari kazusa* No. 5 có số đơn đăng ký cây trồng 25586, cá thể thể hệ con thu được bằng cách lai chéo hai cá thể được chọn từ nhóm bao gồm cá thể cây trồng được đề cập trên đây và cá thể thể hệ con của chúng, và phương pháp làm cho cá thể cây lúa chín sớm hơn, bao gồm bước thay thế vùng của nhiễm sắc thể thứ ba của cây lúa tương ứng với vùng từ bazơ số 31.720.064 đến bazơ số 3.724.043 của nhiễm sắc thể thứ ba của cây lúa Nipponbare bằng mảnh nhiễm sắc thể tạo thành từ vùng tương ứng của cây lúa *Koshihikari kazusa* No. 5 hoặc cây lúa Habataki.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

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

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

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

Cùng với tiến bộ gần đây trong các lĩnh vực như công nghệ phân tích axit nucleic, gen của các thực vật khác nhau như loài cỏ có tên thale cress, cây lúa và lúa mì đã được phân tích, và thông tin di truyền thu được đã được công bố. Việc cải thiện cây trồng bằng cách nhập gen từ loài khác nhờ sử dụng phương pháp tái tổ hợp di truyền đang được thực hiện rộng rãi dựa vào các thông tin di truyền đã biết này. Tuy nhiên, mặc dù việc cải thiện cây trồng bằng công nghệ tái tổ hợp di truyền tuy có ưu điểm là có thể nhập được tính trạng của loài có quan hệ xa, điều mà việc lai chéo thường là không thực hiện được, nhưng nó lại có nhược điểm là không thể kiểm soát một cách đầy đủ độ an toàn của cây trồng thu được.

Do vậy, đối với cây trồng dùng làm thực phẩm bao gồm cây lúa, nhiều loại cây trồng mới đang được tạo ra bằng phương pháp không phải tái tổ hợp di truyền. Ví dụ, tài liệu patent 1 bộc lộ phương pháp tạo ra cây trồng mới có tính trạng đích, mà không làm biến đổi các tính trạng tốt của cây trồng ban đầu, bằng cách không chế vùng thay

thể bằng mảnh nhiễm sắc thể lấy từ cây trồng cho gen chuyển, đây là cách thay thế bằng mảnh nhiễm sắc thể ngoại sinh hữu ích theo phương pháp không phải là phương pháp tái tổ hợp di truyền.

Đặc biệt là với cây lúa, mong muốn cây trồng dùng để nhân giống là cây trồng chín sớm hơn một chút hoặc muộn hơn so với cây trồng bình thường mà vẫn giữ được chất lượng và hiệu suất tốt như cây trồng bình thường. Cây lúa Koshihikari được trồng ở chủ yếu các cánh đồng lúa ở Nhật vì đây là giống cây được người tiêu dùng ưa chuộng, và trong trường hợp chỉ trồng giống cây Koshihikari ở quy mô lớn thì việc thu hoạch bị tập trung dồn dập trong một khoảng thời gian ngắn và cần nhiều lao động. Không thể đảm bảo rằng mỗi cá thể có thể được thu hoạch ở thời điểm tối ưu, đặc biệt trong trường hợp thu hoạch cây lúa với lượng lớn, vì việc thu hoạch cây quá sớm hoặc quá muộn có ảnh hưởng đến hương vị và hiệu suất hồi thóc, nên đây là một vấn đề đáng quan tâm đối với người nông dân trồng lúa. Một phương pháp có thể áp dụng để làm thay đổi thời gian thu hoạch là thay đổi thời gian gieo mạ. Tuy nhiên, vì cây lúa Koshihikari rất nhạy với ánh sáng, nên ngay cả khi thay đổi thời gian gieo mạ chỉ 2 hoặc 3 ngày, nhưng thời gian thu hoạch cây lúa vẫn không thay đổi. Mặt khác, thời gian thu hoạch lại có thể thay đổi trong phạm vi rộng khi thay đổi thời gian gieo mạ lên tới 10 ngày hoặc nhiều hơn. Tuy nhiên, trong trường hợp thời gian gieo mạ có sự thay đổi đáng kể, thời gian sinh trưởng trở nên ngắn hơn, do đó làm nảy sinh vấn đề là không thể thu được năng suất thích hợp. Nếu có thể trồng cây trồng chín sớm hơn một chút hoặc muộn hơn một chút so với cây trồng bình thường, thì có thể thay đổi thời điểm thu hoạch, nên có thể tiến hành công việc thu hoạch trong khoảng thời gian dài hơn vì thời điểm thu hoạch đã thay đổi cho mỗi cây trồng.

Tuy nhiên, việc phát triển của cây trồng có thể chín sớm hơn một chút hoặc muộn hơn một chút so với cây trồng bình thường, cụ thể là cây trồng Koshihikari là cây đã được điều chỉnh một chút để thay đổi một chút thời điểm trổ bông hoặc thời điểm thu hoạch, là vấn đề rất khó về mặt kỹ thuật. Điều này là vì khó phát hiện được sự khác biệt nhỏ về thời điểm trổ bông và phát hiện gen cụ thể liên quan đến tính trạng này. Để phát hiện được tính trạng quy định sự khác biệt nhỏ thời điểm trổ bông, không những cần đến cánh đồng có điều kiện cụ thể tại đó như đất trồng và điều kiện bón phân cây lúa, nước, khí hậu và các điều kiện khác của môi trường trên cánh đồng phải

rất đồng nhất, mà còn cần đến trạng thái hạt được dùng để gieo mạ cũng phải đồng nhất, và điều này thì rất khó thực hiện. Trên thực tế, ở cánh đồng lúa ở Nhật, ngay cả khi cây trồng đồng nhất về mặt di truyền, được gieo mạ và cấy lúa vào cùng một ngày, thì vẫn có sự dao động thời điểm trổ bông khoảng 7 ngày. Nói một cách khác, khoảng thời gian kể từ ngày đầu tiên đến ngày cuối phát hiện được sự trổ bông có thể lên tới 7 ngày. Ngay cả khi trồng trên cánh đồng có điều kiện rất giống nhau để thử nghiệm, thường vẫn có sự xê dịch từ 3 đến 5 ngày.

Tài liệu đã biết

Tài liệu patent

Tài liệu patent 1: JP 4409610

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề sáng chế giải quyết

Mục đích của sáng chế là tạo ra cây lúa mới chín sớm hơn cây trồng ban đầu, và phương pháp làm cho cá thể cây lúa chín sớm hơn.

Cách thức giải quyết vấn đề

Là kết quả của việc thực hiện các nghiên cứu quy mô rộng nhằm giải quyết vấn đề nêu trên, các tác giả sáng chế đã phát hiện được rằng thời gian thu hoạch có thể sớm hơn Koshihikari bằng cách thay thế mảnh nhiễm sắc thể của một vùng nhất định có mặt ở nhiễm sắc thể thứ ba của cây lúa Habataki vào cây lúa Koshihikari, nhờ đó hoàn thành sáng chế.

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

(1) cây lúa *Koshihikari kazusa* No. 5 (cây trồng *Oryza sativa* L. là *Koshihikari kazusa* No. 5) có số đơn đăng ký cây trồng 25586;

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

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

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

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

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

SNP tương ứng với SNP thứ 32.363.157 của nhiễm sắc thể thứ ba của cây lúa Nipponbare (A ở cây lúa Koshihikari và T ở cây lúa Habataki) được chọn làm dấu chuẩn ADN M4,

SNP tương ứng với SNP thứ 32.384.799 của nhiễm sắc thể thứ ba của cây lúa Nipponbare (T ở cây lúa Koshihikari và G ở cây lúa Habataki) được chọn làm dấu chuẩn ADN M5,

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

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

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

(5) phương pháp làm cho cá thể cây lúa chín sớm hơn, bao gồm: thay thế vùng tương ứng với vùng từ bazơ số 31.720.064 đến bazơ số 32.314.677 của nhiễm sắc thể thứ ba của cây lúa Nipponbare bằng mảnh nhiễm sắc thể tạo thành từ vùng tương ứng của cây lúa *Koshihikari kazusa* No. 5 hoặc cây lúa Habataki trên nhiễm sắc thể thứ ba của cá thể cây lúa;

(6) phương pháp làm cho cá thể cây lúa chín sớm hơn như được mô tả trong mục (5) nêu trên, trong đó mảnh nhiễm sắc thể này được thay thế sao cho đầu tận phía trước của mảnh nhiễm sắc thể này có mặt trong vùng tương ứng với vùng từ bazơ số 31.689.691 đến bazơ số 31.720.064 của nhiễm sắc thể thứ ba của cây lúa Nipponbare, và đầu tận phía sau của mảnh nhiễm sắc thể này có mặt trong vùng tương ứng với vùng từ bazơ số 32.314.677 đến bazơ số 32.363.156 của nhiễm sắc thể thứ ba của cây lúa Nipponbare;

(7) phương pháp làm cho cá thể cây lúa chín sớm hơn, bao gồm: thay thế vùng tương ứng với vùng từ bazơ số 3.689.690 đến bazơ số 32.363.157 của nhiễm sắc thể thứ ba của cây lúa Nipponbare bằng mảnh nhiễm sắc thể tạo thành từ vùng tương ứng của cây lúa *Koshihikari kazusa* No. 5 hoặc cây lúa Habataki trên nhiễm sắc thể thứ ba của cá thể cây lúa;

(8) phương pháp làm cho cá thể cây lúa chín sớm hơn như được mô tả trong điểm (7) nêu trên, trong đó mảnh nhiễm sắc thể này được thay thế sao cho đầu tận phía trước của mảnh nhiễm sắc thể này có mặt trong vùng tương ứng với vùng từ bazơ số 31.521.443 đến bazơ số 3.689.690 của nhiễm sắc thể thứ ba của cây lúa Nipponbare, và đầu tận phía sau của mảnh nhiễm sắc thể này có mặt trong vùng tương ứng với vùng từ bazơ số 32.363.157 đến bazơ số 32.384.798 của nhiễm sắc thể thứ ba của cây lúa Nipponbare;

(9) cây lúa được tạo ra bằng phương pháp làm cho cá thể cây lúa chín sớm hơn như được mô tả trong phương pháp bất kỳ từ điểm (4) đến điểm (8) nêu trên;

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

(11) phương pháp làm cho cá thể cây lúa chín muộn hơn, bao gồm: thay thế vùng tương ứng với vùng từ bazơ số 32.309.502 đến bazơ số 32.314.677 của nhiễm sắc thể thứ ba của cây lúa Nipponbare bằng mảnh nhiễm sắc thể tạo thành từ vùng tương ứng của cây lúa *Koshihikari kazusa* No. 5 hoặc cây lúa Habataki trên nhiễm sắc thể thứ ba của cá thể cây lúa;

(12) cây lúa thu được từ phương pháp làm cho cá thể cây lúa chín muộn hơn như

được mô tả trong điểm (11) nêu trên; và,

(13) cá thể thế hệ con thu được bằng cách lai chéo hai cá thể được chọn từ nhóm bao gồm cá thể cây trồng như được mô tả trong điểm (12) nêu trên và cá thể thế hệ con của cá thể cây trồng như được mô tả trong điểm (12) nêu trên.

Hiệu quả của sáng chế

Mặc dù cây trồng mới theo sáng chế ở dạng cây lúa *Koshihikari kazusa* No. 5 chín sớm hơn *Koshihikari*, các đặc tính ngoài thời gian thu hoạch, như chất lượng hoặc năng suất, là gần giống như các đặc tính của *Koshihikari*.

Ngoài ra, các cá thể cây lúa có thể được làm chín sớm hơn cây trồng ban đầu bằng cách sử dụng phương pháp theo sáng chế làm cho cá thể cây lúa chín sớm hơn.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

FIG. 1 là hình vẽ thể hiện sơ đồ hệ gen của *Koshihikari*, có dị tương đồng QTS4 và dạng đồng nhất QTS4.

FIG. 2 là hình vẽ thể hiện kết quả khảo sát thời gian trở bông của *Koshihikari*, dị tương đồng QTS4 và dạng đồng nhất QTS4.

FIG. 3 là hình vẽ thể hiện bằng sơ đồ hệ gen của *Koshihikari* và dạng đồng nhất QTS14.

FIG. 4 là hình vẽ thể hiện các kết quả khảo sát thời gian trở bông của *Koshihikari* và dạng đồng nhất QTS14.

FIG. 5 là hình vẽ thể hiện sơ đồ các vị trí của vùng QTS4, vùng QTS14 và các dấu chuẩn ADN trên nhiễm sắc thể thứ ba của *Koshihikari*.

FIG. 6 là hình vẽ thể hiện sơ đồ hệ gen của *Koshihikari kazusa* No. 5.

FIG. 7 là hình vẽ thể hiện kết quả khảo sát thời gian trở bông của *Koshihikari kazusa* No. 5, *Koshihikari*, dạng đồng nhất QTS4 và dạng đồng nhất QTS14.

Mô tả chi tiết sáng chế

Cây trồng có mảnh nhiễm sắc thể cải biến theo sáng chế dùng để chỉ cây trồng mà trong đó chỉ một phần của nhiễm sắc thể của cây trồng ban đầu được thay bằng mảnh nhiễm sắc thể thu được từ cây trồng cho gen chuyển. Ở đây, không có giới hạn

cụ thể nào về cây trồng cho gen chuyển miễn là nó là cây trồng khác cây trồng ban đầu, và có thể là cây trồng thuộc thực vật của cùng một loài như cây trồng ban đầu, có thể là cây trồng thuộc thực vật thuộc loài khác cây trồng ban đầu, hoặc có thể là cây trồng không phải là cây trồng thực vật như của động vật. Ngoài ra, theo sáng chế, cây trồng dùng để chỉ quần thể thuộc vào cùng một loài thực vật và có thể được phân biệt một cách rõ ràng so với các cây trồng của cùng một loài về một tính trạng nhất định do có thành phần di truyền khác nhau.

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

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

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

Theo sáng chế và phần mô tả của đơn này, “vùng từ bazơ số X đến bazơ số Y của nhiễm sắc thể của cây lúa Nipponbare” là vùng được xác định dựa trên trình tự bazơ của ADN của hệ gen của cây lúa Nipponbare được RGB công bố (Phiên bản 4: IRGSP-build4-06/04/21).

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

Để lai được cây trồng mới mà chín sớm hơn một chút hoặc muộn hơn một chút cây trồng thông thường, trước hết các tác giả sáng chế thực hiện phân tích locus tính trạng số lượng (QTL: quantitative tính trạng locus) về thời gian trổ bông trong quần thể độc lập bằng cách lai chéo cây lúa Habataki và cây lúa Koshihikari. Kết quả là, QTL mà dẫn đến sự chín muộn do làm chậm lại thời gian trổ bông được xác định là nằm ở vùng QTS4 trong phần nhánh cánh tay dài của nhiễm sắc thể thứ ba. Cây lúa

mà chín muộn hơn cây trồng Koshihikari ban đầu được dự đoán là sẽ thu được bằng cách thay thế gen nằm trong vùng tương ứng của Koshihikari bằng gen thu được từ Habataki.

Do đó, tạo ra một giống có mảnh nhiễm sắc thể cải biến mà trong đó vùng QTS4 của Koshihikari (vùng tương ứng với vùng từ bazơ số 32.309.502 đến bazơ số 32.314.677 của nhiễm sắc thể thứ ba của cây lúa Nipponbare) được thay bằng mảnh nhiễm sắc thể thu được từ Habataki bằng cách lai chéo ngược lại với Koshihikari. Vào thời điểm này, thu được các cá thể thuộc cả dạng dị tương đồng QTS4, mà trong đó chỉ vùng QTS4 của một nhiễm sắc thể tương đồng được thay bằng mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ Habataki, và dạng đồng nhất QTS4, mà trong đó vùng QTS4 của cả hai nhiễm sắc thể tương đồng được thay bằng mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ Habataki. FIG. 1 là hình vẽ thể hiện bằng sơ đồ hệ gen của Koshihikari, dị tương đồng QTS4 và dạng đồng nhất QTS4. Hơn nữa, khi xác định thời gian trổ bông của mỗi cây lúa trên cánh đồng nằm ở quận Chiba (ngày gieo mạ 6/5/2010, ngày cấy lúa 1/6/2010), thời gian trổ bông của Koshihikari là từ 31/7 đến 5/8, trong khi đó thời gian trổ bông của dạng dị tương đồng QTS4 là từ 9/8 đến 12/8, trong khi đó thời gian trổ bông của dạng đồng nhất QTS4 là từ 11/8 đến 16/8 như được thể hiện trên FIG. 2. Nói cách khác, dạng dị tương đồng QTS4 và dạng đồng nhất QTS4 rõ ràng là chín muộn hơn cây trồng Koshihikari ban đầu, và xu thế đó được xác định là mạnh hơn đối với dạng đồng nhất QTS4 hơn là dạng dị tương đồng QTS4.

Ngoài ra, trong phân tích QTL liên quan đến thời gian trổ bông, QTL mà dẫn đến sự chín sớm do thời gian trổ bông xảy ra trước được xác định là nằm ở vùng QTS14 của nhánh cánh tay dài của nhiễm sắc thể thứ ba của cây lúa Habataki (vùng tương ứng với vùng từ bazơ số 31.720.064 đến bazơ số 3.724.043 của nhiễm sắc thể thứ ba của cây lúa Nipponbare). Dự đoán rằng thu được cây lúa chín sớm hơn cây trồng Koshihikari ban đầu bằng cách thay thế gen nằm trong vùng tương ứng của Koshihikari bằng gen thu được từ Habataki.

Do đó, tạo ra giống có mảnh nhiễm sắc thể cải biến mà trong đó vùng QTS14 của Koshihikari được thay bằng mảnh gen thu được từ Habataki bằng cách lai chéo ngược lại với Koshihikari. FIG. 3 là hình vẽ thể hiện bằng sơ đồ hệ gen của Koshihikari và dạng đồng nhất QTS14. Hơn nữa, khi xác định thời gian trổ bông của mỗi cây lúa trên

cánh đồng nằm ở quận Chiba (ngày gieo mạ 6/5/2010, ngày cấy lúa 1/6/2010), trong khi thời gian trổ bông của Koshihikari là từ 5/8 đến 8/8, thì thời gian trổ bông của dạng đồng nhất QST14 là từ 24/7 đến 26/7 như được thể hiện trên FIG. 4. Nói cách khác, dạng đồng nhất QTS14 được xác định rõ ràng là chín sớm hơn cây trồng Koshihikari ban đầu.

Dựa trên các kết quả này, các tác giả sáng chế cho rằng có thể phát triển cây trồng mới tạo ra sự khác biệt đôi chút về thời gian trổ bông so với thời gian trổ bông của Koshihikari bằng cách thay thế và đưa vào cả mảnh nhiễm sắc thể mà gây ra biểu hiện của tính trạng chín muộn trong vùng QTS4 có nguồn gốc từ Habataki (được nêu trong bản mô tả này là mảnh nhiễm sắc thể này gây ra chín muộn) và mảnh nhiễm sắc thể mà gây ra biểu hiện của tính trạng chín sớm chứa trong vùng QTS14 có nguồn gốc từ Habataki (được nêu trong bản mô tả này như là mảnh nhiễm sắc thể này gây ra hiện tượng chín sớm) cho mảnh nhiễm sắc thể tương ứng của Koshihikari.

Vùng QTS4 và vùng QTS14 là các vùng nằm kề cận nhau. Kết quả là, các tác giả sáng chế đã thử tạo ra cây lúa mà chín sớm hơn một chút hoặc muộn hơn một chút so với Koshihikari bằng cách thay thế và đưa mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ Habataki thuộc vùng chứa cả hai vùng này và vùng nằm giữa chúng vào Koshihikari.

Trong trường hợp cải thiện cây trồng thực vật bằng phương pháp không phải bằng phương pháp tái tổ hợp di truyền, nếu như mảnh nhiễm sắc thể đưa vào thu được từ cây trồng cho gen chuyển là quá lớn, thì có nguy cơ là đưa một lượng lớn các gen khác có chức năng không rõ ràng khác với gen của tính trạng đích, cũng như có nguy cơ làm suy giảm các tính trạng được ưu tiên có ở cây trồng ban đầu. Do đó, các tác giả sáng chế tạo ra cây trồng mới theo phương pháp như được mô tả trong Tài liệu patent 1 để tạo ra cây trồng mới mang tính trạng đích, mà không biến đổi các tính trạng được ưu tiên có ở cây trồng ban đầu, bằng cách khổng chế vùng thay thế bằng cách sử dụng mảnh nhiễm sắc thể thu được từ cây trồng cho gen chuyển.

Cụ thể hơn, năm dạng dấu chuẩn ADN được thể hiện ở FIG. 5 bằng mối liên hệ vị trí được xác định trước tiên dựa trên thông tin di truyền của cây lúa đã biết. Cụ thể là, dấu chuẩn ADN M2 được thiết lập nằm ở đầu tận phía trước của vùng chứa vùng QTS4 và vùng QTS14 (còn được gọi là “vùng (QTS4+QTS14)”) hoặc ở phía trước của nó, dấu chuẩn ADN M1 được thiết lập ở phía trước dấu chuẩn ADN M2, dấu

chuẩn ADN M4 được thiết lập nằm ở đầu tận phía sau của vùng (QTS4+QTS14) hoặc vùng nằm sau đó, dấu chuẩn ADN M5 được thiết lập nằm sau dấu chuẩn ADN M4, và dấu chuẩn ADN M3 được thiết lập trong vùng (QTS4+QTS14). Tiếp theo, tiến hành lai chéo ngược lại trên giống có mảnh nhiễm sắc thể cải biến mà trong đó chỉ một phần của nhiễm sắc thể Koshihikari chứa vùng (QTS4+QTS14) được thay bằng mảnh nhiễm sắc thể thu được từ Habataki, và chọn lọc các cá thể được ưu tiên dựa trên năm dạng dấu chuẩn ADN M1 đến M5 được đề cập trên đây từ quần thể lai thu được. Sau đó, bằng cách lặp lại các bước tương tự một cách thích hợp chọn lọc các cá thể được ưu tiên dựa trên các dấu chuẩn ADN M1 đến M5 bằng cách tiến hành tự lai chéo hoặc lai chéo ngược lại trên các cá thể này, thu được cá thể thế hệ con sao cho đầu tận phía trước của vùng được thay bằng mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ Habataki (“L” trên FIG. 5) có mặt giữa các dấu chuẩn ADN M1 và M2, và đầu tận phía sau của vùng này có mặt giữa các dấu chuẩn ADN M4 và M5. Như được thể hiện trên FIG. 5, trong cá thể thế hệ con này, các dấu chuẩn ADN M1 và M5 là cùng một typ như cây trồng Koshihikari ban đầu, còn các dấu chuẩn ADN M2, M3 và M4 là cùng một typ như Habataki.

Ở đây, trong phương pháp tạo ra cây trồng mới như được mô tả trong Tài liệu patent 2, nếu như khoảng cách d1 giữa các dấu chuẩn ADN M1 và M2 là dài, khoảng cách mà theo đó đầu tận phía trước của mảnh nhiễm sắc thể L thu được từ cây trồng cho gen chuyển (mảnh nhiễm sắc thể thu được từ Habataki trong đơn này) có thể trở nên lớn, làm cho khó xác định chiều dài của mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ Habataki L được đưa vào. Mặt khác, nếu như khoảng cách d1 là ngắn, khoảng cách mà theo đó đầu tận phía trước của mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ Habataki L có thể có mặt là nhỏ, nhờ đó có thể dễ dàng xác định được chiều dài của mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ Habataki L được đưa vào. Tương tự, nếu như khoảng cách d3 giữa các dấu chuẩn ADN M4 và M5 là dài, khoảng cách mà nằm theo đó đầu tận phía sau của mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ Habataki L có thể trở nên lớn, đó đó khó xác định chiều dài của mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ Habataki L được đưa vào, trong khi đó nếu như khoảng cách d3 là ngắn, khoảng cách mà nằm theo đó đầu tận phía sau của mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ Habataki L có thể có mặt là nhỏ, nhờ đó có thể dễ dàng xác định chiều dài của mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ

Habataki L được đưa vào.

Khi chiều dài của mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ Habataki L tăng lên, có nguy cơ tăng gen có mặt vùng không phải là vùng QTS4 và vùng QTS14 được nhập vào cây trồng Koshihikari ban đầu cùng với gen đích có mặt ở vùng QTS4 và vùng QTS14. Vì việc đưa gen không phải là gen đích vào dẫn đến việc thay thế các gen không phải là gen đích có mặt ở cây trồng ban đầu, có nguy cơ là các tính trạng tốt hơn có ở cây trồng ban đầu bị mất đi một cách không chủ ý. Như vậy, chiều dài của mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ Habataki L tốt hơn là không dài hơn chiều dài cần thiết so với vùng ngắn nhất chứa vùng QTS4 và vùng QTS14 (vùng từ đầu tận phía trước của QTS14 đến đầu tận phía sau của QTS4, và còn được gọi là “vùng (QTS4+QTS14)”).

Các tác giả sáng chế đã tạo ra nhiều tập hợp các dấu chuẩn ADN M1 đến M5 và tạo ra nhiều cá thể được nhập mảnh nhiễm sắc thể có chiều dài khác nhau chứa vùng (QTS4+QTS14), tiếp đó là khảo sát thời gian trổ bông của mỗi cá thể. Kết quả là, tất cả các cá thể này là các cá thể chín sớm mà trong đó thời gian trổ bông là sớm hơn một chút so với thời gian trổ bông của Koshihikari. Hơn nữa, khi các tính trạng không phải là thời gian trổ bông của mỗi cá thể (như hương vị hoặc năng suất) được so sánh với các tính trạng của Koshihikari, các cá thể tạo ra bằng cách sử dụng mỗi trong số tập hợp các dấu chuẩn ADN M1 đến M5 (cây lúa *Koshihikari kazusa* No. 5. (cây trồng *Oryza sativa* L. là *Koshihikari kazusa* No. 5)) được thể hiện trong Bảng 1, cụ thể là bằng cách sử dụng SNP (đa hình đơn nucleotit) tương ứng với SNP thứ 31.521.442 của nhiễm sắc thể thứ ba của cây lúa Nipponbare (A ở cây lúa Koshihikari và C ở cây lúa Habataki) làm dấu chuẩn ADN M1 (Dấu chuẩn ADN M1-Ac), bằng cách sử dụng SNP tương ứng với SNP thứ 31.689.690 của nhiễm sắc thể thứ ba của cây lúa Nipponbare (C ở cây lúa Koshihikari và T ở cây lúa Habataki) làm dấu chuẩn ADN M2 (Dấu chuẩn ADN M2-Ct), bằng cách sử dụng SNP tương ứng với SNP thứ 3.208.924 của nhiễm sắc thể thứ ba của cây lúa Nipponbare (A ở cây lúa Koshihikari và G ở cây lúa Habataki) làm dấu chuẩn ADN M3 (Dấu chuẩn ADN M3-Ag), bằng cách sử dụng SNP tương ứng với SNP thứ 32.363.157 của nhiễm sắc thể thứ ba của cây lúa Nipponbare (A ở cây lúa Koshihikari và T ở cây lúa Habataki) làm dấu chuẩn ADN M4 (Dấu chuẩn ADN M4-Gc), và bằng cách sử dụng SNP tương ứng với SNP thứ 32.384.799

của nhiễm sắc thể thứ ba của cây lúa Nipponbare (T ở cây lúa Koshihikari và G ở cây lúa Habataki) làm dấu chuẩn ADN M5 (Dấu chuẩn ADN M5-Tg), được xác định là có các tính trạng ngoài tính trạng thời gian trổ bông là giống như các tính trạng Koshihikari như được chỉ ra ở Ví dụ 1 sẽ được mô tả sau đây (xem các Bảng 2 đến 5). Ngoài ra, cây lúa *Koshihikari kazusa* No. 5 là cá thể được tạo ra bằng cách sử dụng tập hợp dấu chuẩn ADN mà trong đó chiều dài của mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ Habataki được đưa vào là ngắn nhất trong số các tập hợp dấu chuẩn ADN được dùng để phát triển cây trồng mới.

Bảng 1

Dấu chuẩn ADN	Vị trí ở nhiễm sắc thể thứ ba	Typ ở trên Koshihikari	Typ ở trên Habataki	Trình tự
M1-Ac	31.521.442	A	C	đoạn mỗi xuôi: CATTCAGTTCTCTCAACTGC
				đoạn mỗi ngược: GAGATTTTCGAAGGTTCTTCGC
				đoạn mỗi SNP: TTCCTAACCCAGCTGTGAT
M2-Ct	3.689.690	C	T	đoạn mỗi xuôi: AAAACAGCCACACCTGATCG
				đoạn mỗi ngược: AACATCCTCTGCTTCCTCAG
				đoạn mỗi SNP: TATCGCTAGCCTCCATTTCT
M3-Ag	3.208.924	A	G	đoạn mỗi xuôi: GAATGGAATGAGCCATACTCC
				đoạn mỗi ngược: CTGCATCTACACGCTATACC
				đoạn mỗi SNP: GTGATGGAAAAGTTGGAAGTTTGAA
M4-Gc	32.363.157	A	T	đoạn mỗi xuôi: ACGTGGGGTACAGCACTTTGA
				đoạn mỗi ngược: GTCAGGAAAGTTGGAAGAGG
				đoạn mỗi SNP: GATCTCTGACAATATCAAGAAGCT
M5-Tg	32.384.799	T	G	đoạn mỗi xuôi: TCTGAGTATCTGACTCCACG
				đoạn mỗi ngược: CTCTCCTGTCTTAGAAGAAGAC
				đoạn mỗi SNP: CAAAGTTGGCAACTCGGCATA

Koshihikari kazusa No. 5 là cây trồng mới được tạo ra theo phương pháp như được mô tả trong tài liệu patent 1, và mặc dù chín hơi sớm hơn *Koshihikari*, nhưng nó là cây trồng rất tốt ở chỗ nó vẫn giữ được hương vị và các tính trạng tốt khác của *Koshihikari*. Do đó, người nộp đơn đã xin đăng ký giống cây trồng cho *Koshihikari kazusa* No. 5 theo điều Luật về Hạt giống và Cây trồng Nhật Bản (Seed and Seedlings Law of Japan (số 83, 29/5/1998) (đơn đăng ký cây trồng nộp ngày 28/1/2011, số đơn đăng ký giống cây trồng: 25586).

Dựa trên các kết quả này, các cá thể cây lúa này rõ ràng là chín sớm hơn cây trồng ban đầu do thay thế ít nhất vùng từ dấu chuẩn ADN M2-Ct đến dấu chuẩn ADN M4-At (cụ thể là, vùng tương ứng với vùng từ bazơ số 3.689.690 đến bazơ số 32.363.157 của nhiễm sắc thể thứ ba của cây lúa Nipponbare) bằng mảnh nhiễm sắc thể tạo thành từ vùng tương ứng của cây lúa Habataki trên nhiễm sắc thể thứ ba của cá thể cây lúa. Ngoài ra, vì vùng tương ứng của cây lúa *Koshihikari kazusa* No. 5 được tạo ra từ mảnh nhiễm sắc thể tạo thành từ vùng tương ứng của cây lúa Habataki, vùng này cũng có thể được thay bằng mảnh nhiễm sắc thể tạo thành từ vùng tương ứng của cây lúa *Koshihikari kazusa* No. 5. Ngoài ra, một cá thể cây lúa mà đã được chuyển thành dạng chín sớm hơn bằng cách đưa mảnh nhiễm sắc thể tạo thành từ vùng tương ứng của cây lúa Habataki là cây trồng mà trong đó vùng tương ứng có trình tự bazơ là đồng nhất hoặc tương tự cây lúa *Koshihikari*, và mặc dù phương pháp này không chỉ giới hạn ở cây lúa *Koshihikari*, xét đến sự ưa thích của người tiêu thụ và các yếu tố tương tự, tốt hơn nếu đó là cây lúa *Koshihikari* hoặc cây trồng mới tạo ra bằng cách sử dụng cây lúa *Koshihikari* như là cây trồng bố-mẹ.

Ngoài ra, có thể tạo ra cá thể cây lúa làm chín sớm hơn cây trồng ban đầu mà không có ảnh hưởng đáng kể đến các tính trạng không phải là thời gian trổ bông bằng cách đưa mảnh nhiễm sắc thể vào nhiễm sắc thể thứ ba của cá thể cây lúa sao cho đầu tận phía trước của mảnh nhiễm sắc thể này thu được từ cây lúa Habataki cho gen chuyển (hoặc thu được từ cây lúa *Koshihikari kazusa* No. 5) có mặt trong vùng nằm sau dấu chuẩn ADN M1-Ac và kéo dài đến dấu chuẩn ADN M2-Ct (cụ thể là, vùng tương ứng với vùng từ bazơ số 31.521.443 đến bazơ số 3.689.690 của nhiễm sắc thể thứ ba của cây lúa Nipponbare), và đầu tận phía sau của nó có mặt trong vùng kéo dài từ dấu chuẩn ADN M4-At đến phía trước dấu chuẩn ADN M5-Tg (cụ thể là, vùng

tương ứng với vùng từ bazơ số 32.363.157 đến bazơ số 32.384.798 của nhiễm sắc thể thứ ba của cây lúa Nipponbare).

Khi khảo sát các gen ở trong vùng QTS4, gen QTL ảnh hưởng đến thời gian trổ bông Hd6 phát hiện được ở cây lúa Nipponbare và cây lúa Caracas được nhận thấy là nằm trong vùng kề cận 32,3 Mbp của nhiễm sắc thể thứ ba của vùng đó. Hd6 đã được báo cáo là chứa vùng mã hoá gen alpha cấu trúc siêu phân tử casein kinaza II (Takahashi, et al., PNAS (2001), Vol. 98, No. 14, p.7922-7927). Ngoài ra, vùng mã hoá gen đó ở cây lúa Habataki có trình tự khác với alen của cây lúa Koshihikari. Theo đó, gen nguồn gốc chịu trách nhiệm cho việc tạo sự chín muộn trong vùng QTS4 được cho là gen cấu trúc siêu phân tử alpha casein kinaza II này. Trên thực tế, khi phân tích trình tự bazơ trong vùng kề cận 32,3 Mbp của nhiễm sắc thể thứ ba của cây lúa *Koshihikari kazusa* No. 5, toàn bộ vùng này mã hoá gen ở cây lúa Habataki được khẳng định là chứa trong mảnh nhiễm sắc thể thu được từ cây lúa Habataki là đã được vào nhiễm sắc thể cá thể cây lúa này bằng cách thay thế.

Ngoài ra, gen cấu trúc siêu phân tử alpha casein kinaza II này đã được lập bản đồ vào vùng từ bazơ số 32.309.502 đến bazơ số 32.314.677 của nhiễm sắc thể thứ ba trong mảnh alen của cây lúa Nipponbare, và ở vùng từ bazơ số 32.350.406 đến bazơ số 32.362.686 trong mảnh alen của cây lúa Caracas đã được được công bố. Do đó, có thể tạo ra cá thể cây lúa chín muộn hơn bằng cách thay thế vùng tương ứng với vùng từ bazơ số 32.309.502 đến bazơ số 32.314.677 của nhiễm sắc thể thứ ba của cây lúa Nipponbare bằng mảnh nhiễm sắc thể tạo thành từ vùng tương ứng của cây lúa *Koshihikari kazusa* No. 5 hoặc cây lúa Habataki trên nhiễm sắc thể thứ ba của cá thể cây lúa.

Tương tự, khi khảo sát gen chứa trong vùng QTS14, vùng mã hoá gen C quy định sắc tố thực vật nằm trong vùng kề cận 31,7 Mbp của nhiễm sắc thể thứ ba của vùng đó. Gen này đã được báo cáo là chủ yếu tham gia ảnh hưởng đến thời gian ra hoa của cây (patent Mỹ số 7566815). Theo đó, gen nguyên nhân chịu trách nhiệm cho sự chín sớm ở vùng QTS14 được cho là gen C quy định sắc tố thực vật.

Ngoài ra, gen C quy định sắc tố thực vật đã được lập bản đồ trong vùng từ bazơ số 31.720.064 đến bazơ số 3.724.043 của nhiễm sắc thể thứ ba ở cây lúa Nipponbare. Do đó, cá thể cây lúa có thể được làm chín sớm hơn bằng cách thay thế vùng tương

ứng với vùng từ bazơ số 31.720.064 đến bazơ số 3.724.043 của nhiễm sắc thể thứ ba của cây lúa Nipponbare bằng mảnh nhiễm sắc thể tạo thành từ vùng tương ứng của cây lúa *Koshihikari kazusa* No. 5 hoặc cây lúa Habataki trên nhiễm sắc thể thứ ba của cá thể cây lúa.

Nếu vùng chứa gen nguyên nhân của sự chín muộn ở vùng QTS4 và gen nguyên nhân gây ra sự chín sớm ở vùng QTS14 được thay bằng mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ Habataki, thì sự chín sớm được cho là được tạo ra theo cùng cách như cây lúa *Koshihikari kazusa* No. 5 ngay cả trong trường hợp cá thể cây lúa mà trong đó vùng ngắn hơn vùng này từ dấu chuẩn ADN M2-Ct đến dấu chuẩn ADN M4-At được thay bằng mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ Habataki. Ví dụ, cá thể cây lúa được cho là có thể tạo ra chín sớm hơn cây trồng ban đầu bằng cách thay thế vùng tương ứng với vùng từ bazơ số 31.720.064 đến bazơ số 32.314.677 của nhiễm sắc thể thứ ba của cây lúa Nipponbare bằng mảnh nhiễm sắc thể tạo thành từ vùng tương ứng của cây lúa *Koshihikari kazusa* No. 5 hoặc cây lúa Habataki trong nhiễm sắc thể của cá thể cây lúa. Ngoài ra, vào thời điểm đó, cá thể cây lúa này được cho là có thể tạo ra chín sớm hơn cây trồng ban đầu mà không có ảnh hưởng đáng kể đến các tính trạng không phải là thời gian trổ bông bằng cách đưa mảnh nhiễm sắc thể vào nhiễm sắc thể thứ ba của cá thể cây lúa sao cho đầu tận phía trước của mảnh nhiễm sắc thể này có mặt trong vùng tương ứng với vùng từ bazơ số 31.689.691 đến bazơ số 31.720.064 của nhiễm sắc thể thứ ba của cây lúa Nipponbare, và đầu tận phía sau của mảnh nhiễm sắc thể này có mặt trong vùng tương ứng với vùng từ bazơ số 32.314.677 đến bazơ số 32.363.156 của nhiễm sắc thể thứ ba của cây lúa Nipponbare.

Cây lúa *Koshihikari kazusa* No. 5 là cây trồng mới mà trong đó thời gian trổ bông diễn ra hơi sớm hơn mà không có ảnh hưởng đáng kể đến các tính trạng của *Koshihikari* khác như năng suất. Kết quả là, ngay cả khi *Koshihikari* và *Koshihikari kazusa* No. 5 được gieo mạ ở khoảng thời gian gần như giống nhau, vì *Koshihikari kazusa* No. 5 trổ bông sớm hơn vài ngày so với thời gian trổ bông của *Koshihikari*, có thể thu hoạch *Koshihikari* sau khi đã thu hoạch trước đó *Koshihikari kazusa* No. 5. Do thay đổi thời gian thu hoạch theo cách này, thì ngoài việc có thể kéo dài công việc thu hoạch ngay cả trong trường hợp trồng trên quy mô lớn, vì việc thu hoạch có thể được thực hiện ở thời điểm phù hợp hơn, có thể thu hoạch được cây lúa có hương vị tốt hơn.

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

Ngoài ra, năm typ dấu chuẩn ADN như được mô tả trong Bảng 1 (Dấu chuẩn ADN M1-Ac, dấu chuẩn ADN M2-Ct, dấu chuẩn ADN M3-Ag, dấu chuẩn ADN M4-At và dấu chuẩn ADN M5-Tg) bao gồm thông tin hệ gen duy nhất cho cây lúa *Koshihikari kazusa* No. 5. Do đó, cây lúa *Koshihikari kazusa* No. 5 có thể được phân biệt bằng cách sử dụng thích hợp năm typ dấu chuẩn AND này.

Cụ thể hơn, phương pháp phân biệt cây lúa theo sáng chế là phương pháp để xác định xem liệu cá thể cây lúa nhất định có phải là cây trồng đặc thù hay không, trong đó một hoặc nhiều dấu chuẩn ADN được chọn từ nhóm bao gồm dấu chuẩn ADN M1-Ac, dấu chuẩn ADN M2-Ct, dấu chuẩn ADN M3-Ag, dấu chuẩn ADN M4-At và dấu chuẩn ADN M5-Tg được định typ bằng cách phân tích hệ gen của cá thể cây lúa, và trong trường hợp kết quả định typ thu được phù hợp với kết quả cho cây lúa *Koshihikari kazusa* No. 5, cụ thể là trong trường hợp dấu chuẩn ADN M1-Ac là adenin (A), dấu chuẩn ADN M2-Ct là thymin (T), dấu chuẩn ADN M3-Ag là guanin (G), dấu chuẩn ADN M4-At là T và dấu chuẩn ADN M5-Tg là T, thì cá thể cây lúa này có thể được xác định là cây lúa *Koshihikari kazusa* No. 5.

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

Ví dụ thực hiện sáng chế

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

Ví dụ 1

Tạo ra cây trồng mới mà trong đó thời gian thu hoạch là sớm hơn so với cây trồng Koshihikari ban đầu bằng cách sử dụng giống có mảnh nhiễm sắc thể cải biến như là cá thể bố-mẹ mà trong đó chỉ một phần của nhiễm sắc thể Koshihikari chứa vùng (QTS4+QTS14) được thay bằng mảnh nhiễm sắc thể thu được từ Habataki.

Trước hết, giống có mảnh nhiễm sắc thể cải biến và Koshihikari được lai chéo, và thu hoạch 10 cá thể thế hệ con (hạt giống) mà trong đó dấu chuẩn ADN M3-Ag là vùng nhiễm sắc thể dị tương đồng gồm alen có nguồn gốc từ Koshihikari và alen có nguồn gốc từ Habataki. Hạt giống thu được được trồng tiếp đó là để tự nhân giống (tự lai chéo) và thu hoạch các cá thể thế hệ con ở dạng hạt giống.

Hạt giống thu hoạch được này được trồng tiếp tục. Sau khi trồng đến giai đoạn có thể cấy vào cánh đồng, thu hồi ADN từ lá của mỗi cá thể, và các cá thể được trồng này được chọn lọc mà trong đó dấu chuẩn ADN M1-Ac là vùng nhiễm sắc thể đồng nhất gồm alen có nguồn gốc từ Koshihikari, và các dấu chuẩn ADN M2-Ct và M3 (Dấu chuẩn ADN M3-Ag) là vùng nhiễm sắc thể dị tương đồng gồm alen có nguồn gốc từ Koshihikari và alen có nguồn gốc từ Habataki.

Sau đó, các cá thể được trồng và chọn lọc này được để tự nhân giống (tự lai chéo) tiếp đó là thu hoạch thêm các cá thể thế hệ con ở dạng hạt giống. Hạt giống thu hoạch được này được gieo trồng tiếp, và sau khi trồng đến giai đoạn có thể cấy vào cánh đồng, thu hồi ADN từ lá của mỗi cá thể được trồng này, và từng cá thể được trồng này được chọn lọc mà trong đó dấu chuẩn ADN M1-Ac và dấu chuẩn ADN M5-Tg là vùng nhiễm sắc thể đồng nhất đối với alen có nguồn gốc từ Koshihikari, và dấu chuẩn ADN M2-Ct, dấu chuẩn ADN M3 (Dấu chuẩn ADN M3-Ag) và dấu chuẩn ADN M4-At là vùng nhiễm sắc thể đồng nhất với alen có nguồn gốc từ Habataki. Cá thể được trồng và chọn lọc này là cây trồng mới mà trong đó vùng (QTS4+QTS14) đã được thay bằng mảnh nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ Habataki, và các tác giả sáng chế đặt tên cây trồng mới này là “*Koshihikari kazusa* No. 5”. FIG. 6 là hình vẽ thể hiện

bằng sơ đồ hệ gen của *Koshihikari kazusa* No. 5.

Hơn nữa, khi xác định thời gian trổ bông của *Koshihikari kazusa* No. 5 trên cánh đồng nằm ở quận Chiba (ngày gieo mạ 6/5/2010, ngày cấy lúa 1/6/2010), trong khi thời gian trổ bông của *Koshihikari* là từ 5/8 đến 8/8, thời gian trổ bông của *Koshihikari kazusa* No. 5 là từ 27/7 đến 30/7. FIG. 7 thể hiện các kết quả xác định được về thời gian trổ bông của *Koshihikari kazusa* No. 5 cùng với kết quả cho *Koshihikari*, dạng đồng nhất QTS4 và dạng đồng nhất QTS14. Mặc dù *Koshihikari kazusa* No. 5 rõ ràng là chín hơi sớm hơn cây trồng *Koshihikari* ban đầu, nhận thấy rõ ràng từ FIG. 7 là thời gian trổ bông của chúng là chậm hơn thời gian trổ bông của dạng đồng nhất QTS14.

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

Bảng 2

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

Bảng 3

Giai đoạn	Tình trạng	Giá trị đặc tính cây trồng (So sánh với Cây trồng chuẩn)									Chú giải (các giá trị đo được)	Các đặc tính của cây trồng đối chứng	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9		Koshihikari	Nipponbare
70	Cộng: chiều dài (không kể bông, không kể cây lúa nước)	Rất ngắn		Ngắn		<u>Trung bình</u>		Dài		Rất dài	5 89,3 m	6 92,1 cm	4 74,7 cm
	Cộng: sắc tố anthocyanin ở đốt	<u>Không có</u>								Có màu	1	1	1
72-90	Ngon cây: Chiều dài trực chính			<u>Ngắn</u>		<u>Trung bình</u>		Dài			3 12,7 cm	4 14,4 cm	4 14,2 cm
70	Ngon cây: số lượng			ít	—	<u>Trung bình</u>		Nhiều			4 7,7	4 8,3	4 8,8
70-80	Ngon cây: Phân bố râu	<u>Chỉ ở phần đầu</u>		Nửa trên		Toàn bộ					1	1	1
60-80	Bông con: Amt. của lông cuối phiến lá ở mây ngoài	Không có hoặc rất ít		ít		<u>Trung bình</u>		Nhiều		Rất nhiều	Giống như Koshihikari		
80-90	Bông con: Màu của đầu mây ngoài (màu của đầu nhỏ)	<u>Màu trắng</u>	Màu vàng	Màu nâu	Màu đỏ	Màu tím	Màu đen				1	1	1
90	Ngon cây: Uôn cong của trục chính	Hướng thẳng góc		Hướng nghiêng		<u>Độc xuống</u>		Uôn cong			5	5	5

	Ngon cây: hình dạng	Dạng lưỡi trích	Hình <u>thoi</u>	Hình que	Hình cái chối	Phình ra				2	2	2
	Thời gian chín	Rất sớm		Sớm	—	Trung bình	Muộn		Rất muộn	4 9/11	5 9/17	6 9/29
	Màu của mày ngoài	Màu vàng- màu trắng	Màu vàng	Màu nâu	Hơi đỏ màu tím	Màu tím	Màu đen			1	1	1
	Màu của mày ngoài: Kiểu	<u>Không</u> <u>có</u>	ông màu vàng	ông màu nâu	Đỏ màu tím	ông màu tím				1	1	1

Bảng 4

Giai đoạn	Tính trạng	Giá trị đặc tính cây trồng (So sánh với Cây trồng chuẩn)									Chú giải	Các đặc tính của cây trồng đối chứng
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	(các giá trị giá đo được)	Koshihikari Nipponbare
92	Màu ngoài: Sắc tố anthocyanin ở đỉnh	<u>Không có hoặc rất nhạt</u>		Nhạt		Trung bình		Sẫm màu		Rất sẫm màu	1	1
	Màu: Chiều dài			<u>Ngắn</u>		Trung bình		Dài			3 1,93 mm	3 1,92 mm
	Màu: Có màu	<u>Màu vàng-màu trắng</u>	Màu vàng	Màu đỏ	Màu tím						1	1

	Vỏ: trọng lượng 1000 hạt (chín)		Nhỏ		Trung bình	—	Lớn			⁶ 22,8 g	⁶ 23,1 g	⁷ 26,4 g
	Vỏ: Phản ứng phenol của mây ngoài	<u>Không có</u>	Nhặt		Trung bình		Sẫm màu	Reacts		1	1	1
	Hạt thóc không xay : Chiều dài		Ngắn		<u>Trung bình</u>		Dài			⁵ 5,2 mm	⁵ 5,2 mm	⁶ 5,4 mm
	Hạt thóc không xay : Chiều rộng		Hẹp		<u>Trung bình</u>		Dầy			⁵ 2,9 mm	⁵ 2,9 mm	⁵ 2,9 mm
	Hạt thóc không xay : hình dạng (từ mặt bên)	Tròn	Dạng bán hình thoi	Hình thoi	Dài hình thoi					2 1,8 mm	2 1,8 mm	2 1,9 mm
	Hạt thóc không xay : Có màu	Màu trắng	Đốm màu nâu	Màu nâu sẫm	Màu đỏ nhạt	Màu đỏ	đốm màu tím	Màu tím	Màu tím sẫm /màu đen	2	2	2
	Hạt thóc không xay : Hương thơm	<u>Không có hoặc rất ít</u>	Mạnh	ít						1	1	1

Bảng 5

Giai đoạn	Tình trạng	Giá trị đặc tính cây trồng (So sánh với Cây trồng chuẩn)										Chú giải	Các đặc tính của cây trồng đối chứng	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	(các giá trị đo được)		Koshihikari	Nipponbare
GIII	Số thân chính của hạt	Rất ít		ít	—	Trung bình		Nhiều		Rất nhiều	4 135		5 151	4 123
	Chiều dài gióng thân chính 1	Rất ngắn		Ngắn		Trung bình		Dài		Rất dài	7 34,0 cm		8 36,6 cm	8 36,1 cm
	Chiều dài gióng thân chính 2	Rất ngắn		Ngắn		Trung bình		Dài		Rất dài	5 21,9 cm		6 22,5 cm	5 17,9 cm
	Chiều dài gióng thân chính 3	Rất ngắn		Ngắn		Trung bình		Dài		Rất dài	5 16,9 cm		6 18,0 cm	4 11,1 cm
	Chiều dài gióng thân chính 4	Rất ngắn		Ngắn		Trung bình	—	Dài		Rất dài	6 10,2 cm		7 10,5 cm	5 7,5 cm
	Chiều dài gióng thân chính 5	Rất ngắn		Ngắn	—	Trung bình		Dài		Rất dài	4 5,4 cm		4 3,9 cm	3 2,0 cm
	Chiều dài gióng thân chính 6	Rất ngắn		Ngắn		Trung bình		Dài		Rất dài	--		--	--
	Chiều dài vỏ thân chính	Rất mỏng		Mỏng		Trung bình		Dày		Rất dày	5 2,24 mm		5 2,24 mm	5 2,24 mm
	Chiều dài vỏ thân chính	Rất ngắn		Ngắn		Trung bình		Dài		Rất dài	3 7,37 mm		3 7,39 mm	3 7,69 mm
	Chiều rộng vỏ thân chính	Rất hẹp		Hẹp		Trung bình		Rộng		Rất rộng	5 3,39 mm		5 3,29 mm	5 3,43 mm

Ứng dụng công nghiệp

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

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Cây lúa, trong đó trong nhiễm sắc thể của cây lúa Koshihikari có vùng tương ứng với vùng từ bazơ số 3.689.690 đến bazơ số 32.363.157 trên nhiễm sắc thể thứ ba của cây lúa Nipponbare được thay đồng nhất bằng mảnh nhiễm sắc thể tạo thành từ vùng tương ứng của cây lúa Habataki trên nhiễm sắc thể thứ ba của cá thể cây lúa, và đầu tận phía trước của mảnh nhiễm sắc thể này có mặt trong vùng tương ứng với vùng từ bazơ số 31.521.443 đến bazơ số 31.689.690 của nhiễm sắc thể thứ ba của cây lúa Nipponbare và đầu tận phía sau của mảnh nhiễm sắc thể này có mặt trong vùng tương ứng với vùng từ bazơ số 32.363.157 đến bazơ số 32.384.798 của nhiễm sắc thể thứ ba của cây lúa Nipponbare.

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

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

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

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

SNP tương ứng với SNP thứ 32.363.157 của nhiễm sắc thể thứ ba của cây lúa Nipponbare (A ở cây lúa Koshihikari và T ở cây trồng Habataki) được chọn làm dấu chuẩn ADN M4,

SNP tương ứng với SNP thứ 32.384.799 của nhiễm sắc thể thứ ba của cây lúa Nipponbare (T ở cây lúa Koshihikari và G ở cây lúa Habataki) được chọn làm dấu chuẩn ADN M5, và

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

trong trường hợp kết quả định typ thu được làm sao cho dấu chuẩn ADN M1 là A

(adenin), dấu chuẩn ADN M2 là T (thymin), dấu chuẩn ADN M3 là guanin (G), dấu chuẩn ADN M4 là T và dấu chuẩn ADN M5 là T, thì cá thể cây lúa này được nhận diện là cây lúa *Koshihikari kazusa* No. 5.

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

4. Phương pháp làm cho cá thể cây lúa chín sớm hơn, bao gồm bước thay thế đồng nhất vùng tương ứng với vùng từ bazơ số 31.720.064 đến bazơ số 32.314.677 của nhiễm sắc thể thứ ba của cây lúa Nipponbare bằng mảnh nhiễm sắc thể tạo thành từ vùng tương ứng của cây lúa theo điểm 1 hoặc cây lúa Habataki trên nhiễm sắc thể thứ ba của cá thể cây lúa.

5. Phương pháp làm cho cá thể cây lúa chín sớm hơn theo điểm 4, trong đó mảnh nhiễm sắc thể này được thay thế sao cho đầu tận phía trước của mảnh nhiễm sắc thể này có mặt trong vùng tương ứng với vùng từ bazơ số 31.689.691 đến bazơ số 31.720.064 của nhiễm sắc thể thứ ba của cây lúa Nipponbare và đầu tận phía sau của mảnh nhiễm sắc thể này có mặt trong vùng tương ứng với vùng từ bazơ số 32.314.677 đến bazơ số 32.363.156 của nhiễm sắc thể thứ ba của cây lúa Nipponbare.

6. Phương pháp làm cho cá thể cây lúa chín sớm hơn, bao gồm bước thay thế đồng nhất vùng tương ứng với vùng từ bazơ số 3.689.690 đến bazơ số 32.363.157 của nhiễm sắc thể thứ ba của cây lúa Nipponbare bằng mảnh nhiễm sắc thể tạo thành từ vùng tương ứng của cây lúa theo điểm 1 hoặc cây lúa Habataki trên nhiễm sắc thể thứ ba của cá thể cây lúa.

7. Phương pháp làm cho cá thể cây lúa chín sớm hơn theo điểm 6, trong đó mảnh nhiễm sắc thể này được thay thế sao cho đầu tận phía trước của mảnh nhiễm sắc thể này có mặt trong vùng tương ứng với vùng từ bazơ số 31.521.443 đến bazơ số 3.689.690 của nhiễm sắc thể thứ ba của cây lúa Nipponbare, và đầu tận phía sau của mảnh nhiễm sắc thể này có mặt trong vùng tương ứng với vùng từ bazơ số 32.363.157 đến bazơ số 32.384.798 của nhiễm sắc thể thứ ba của cây lúa Nipponbare.

8. Cây lúa được tạo ra bằng phương pháp làm cho cá thể cây lúa chín sớm hơn theo

điểm bất kỳ trong số các điểm từ 3 đến 7.

9. Phương pháp làm cho cá thể cây lúa chín muộn hơn, bao gồm bước thay thế đồng nhất vùng tương ứng với vùng từ bazơ số 32.309.502 đến bazơ số 32.314.677 của nhiễm sắc thể thứ ba của cây lúa Nipponbare bằng mảnh nhiễm sắc thể tạo thành từ vùng tương ứng của cây lúa theo điểm 1 hoặc cây lúa Habataki trên nhiễm sắc thể thứ ba của cá thể cây lúa.

10. Cây lúa thu được từ phương pháp làm cho cá thể cây lúa chín muộn hơn theo điểm 9.

FIG. 1

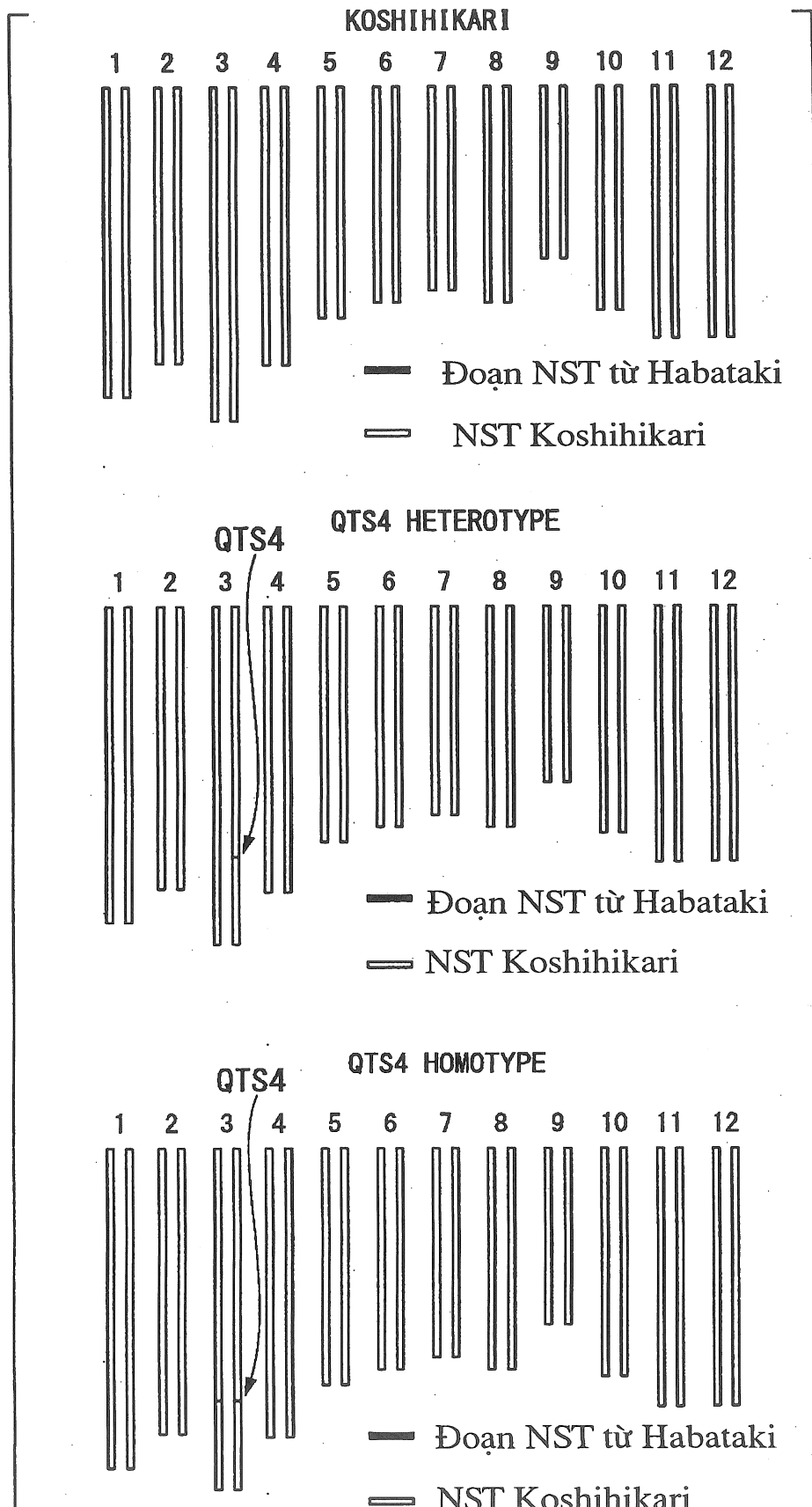


FIG. 2

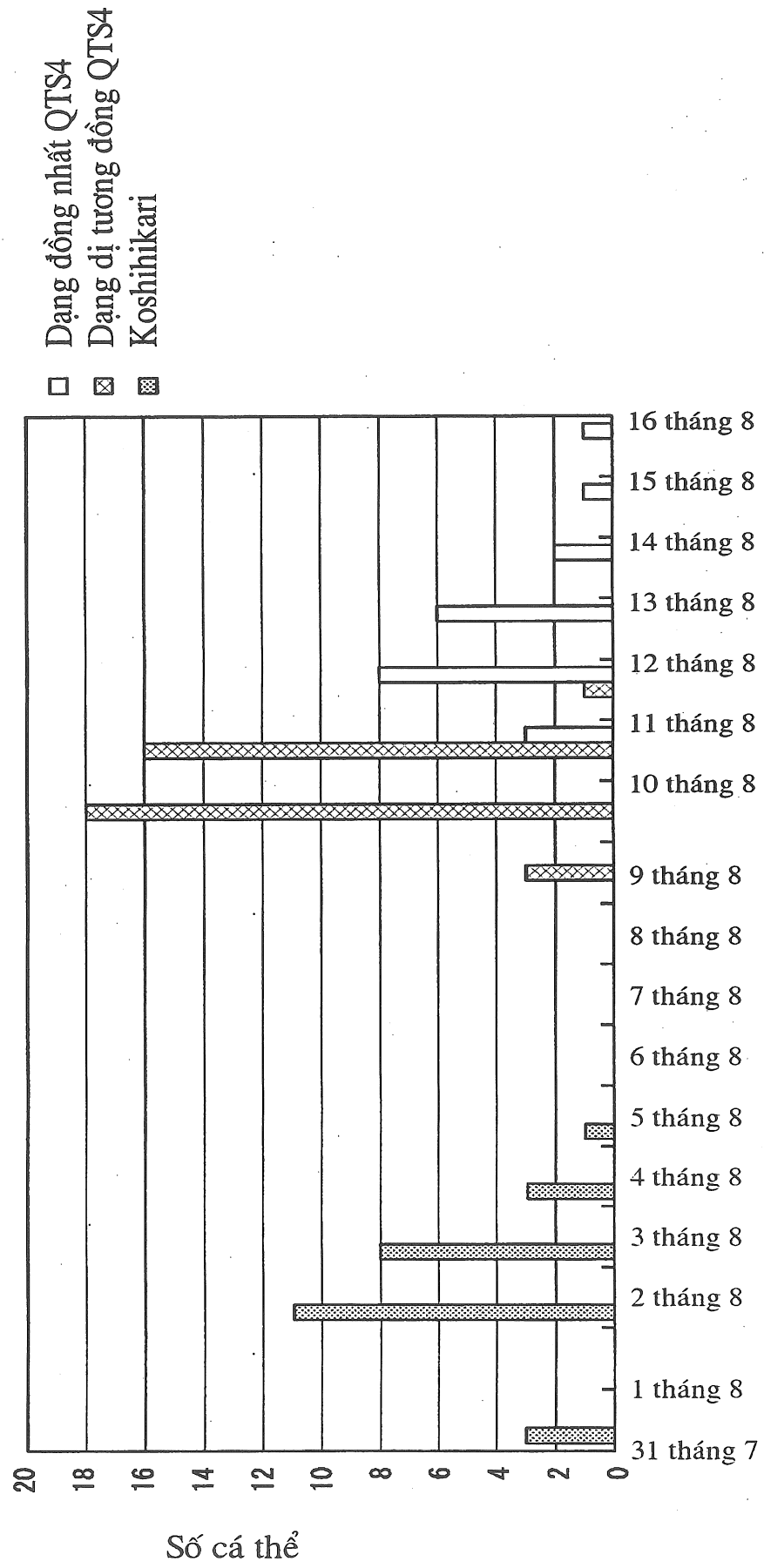


FIG. 3

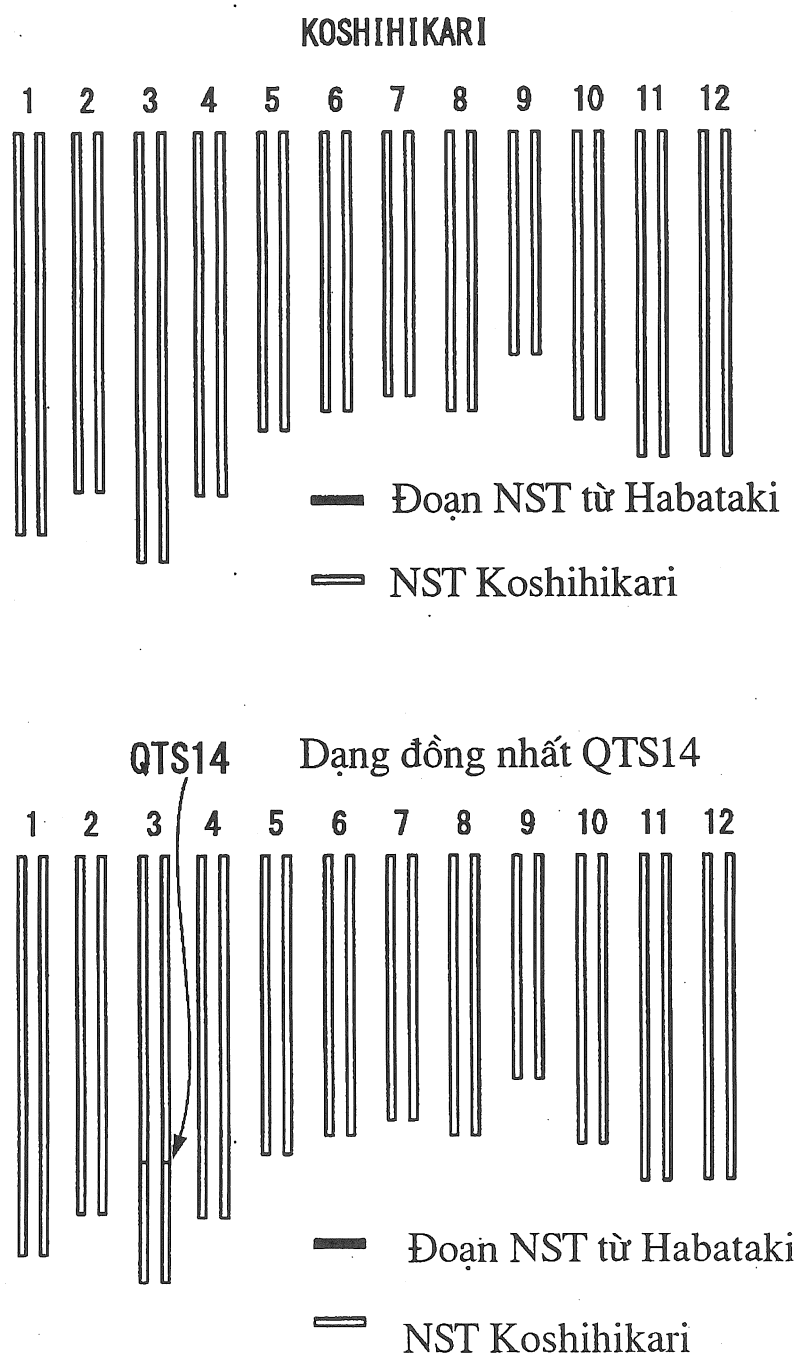


FIG. 4

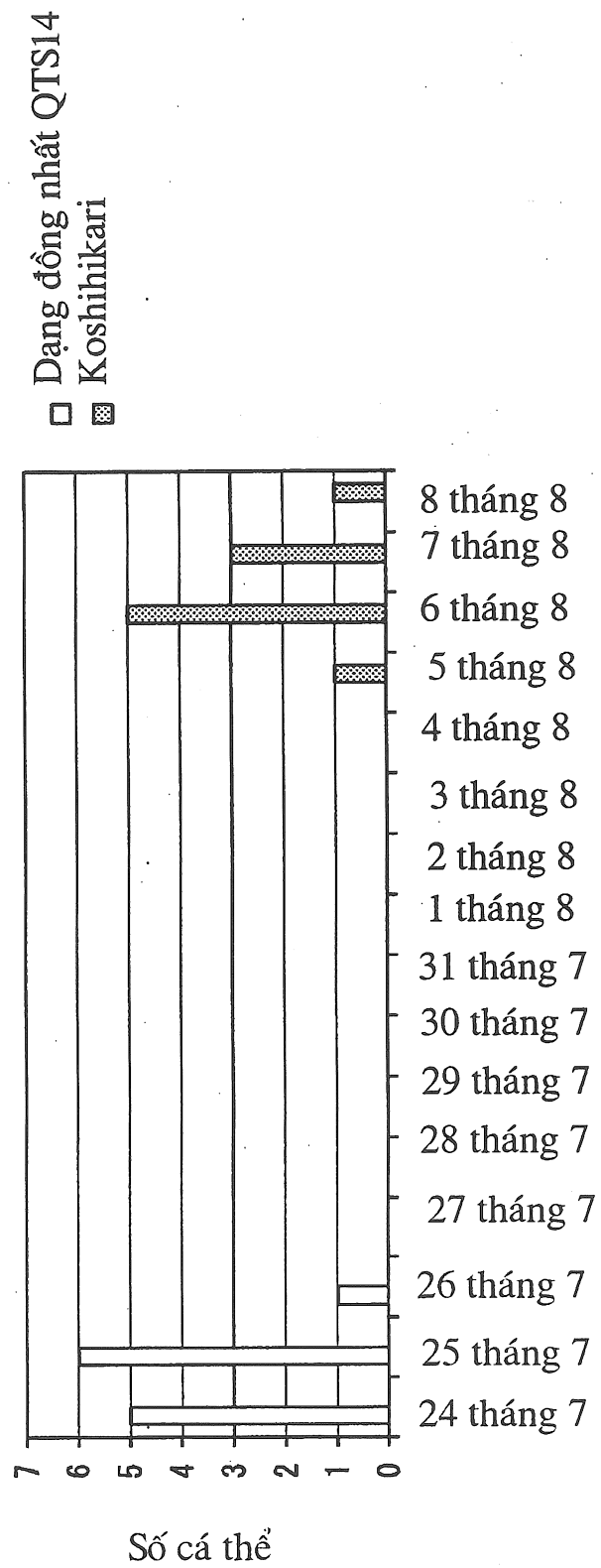


FIG. 5

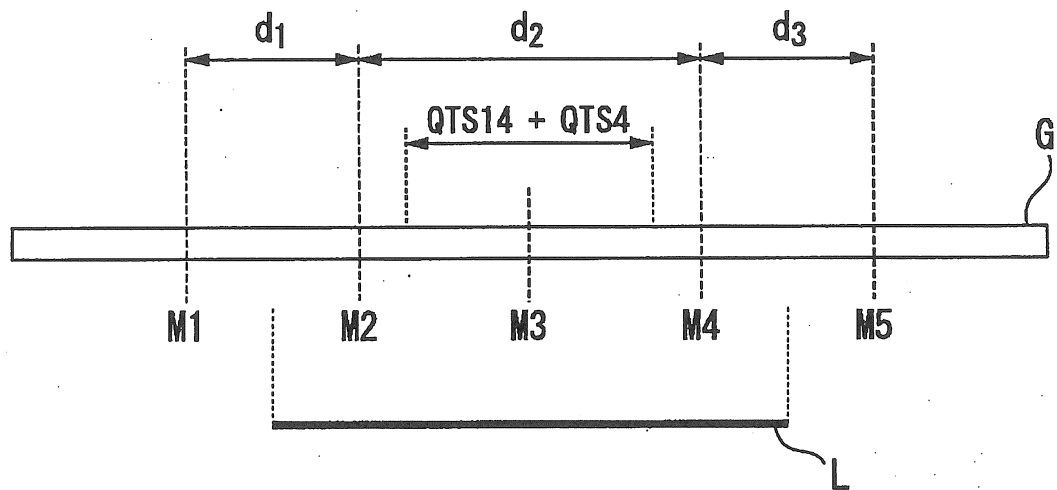


FIG. 6

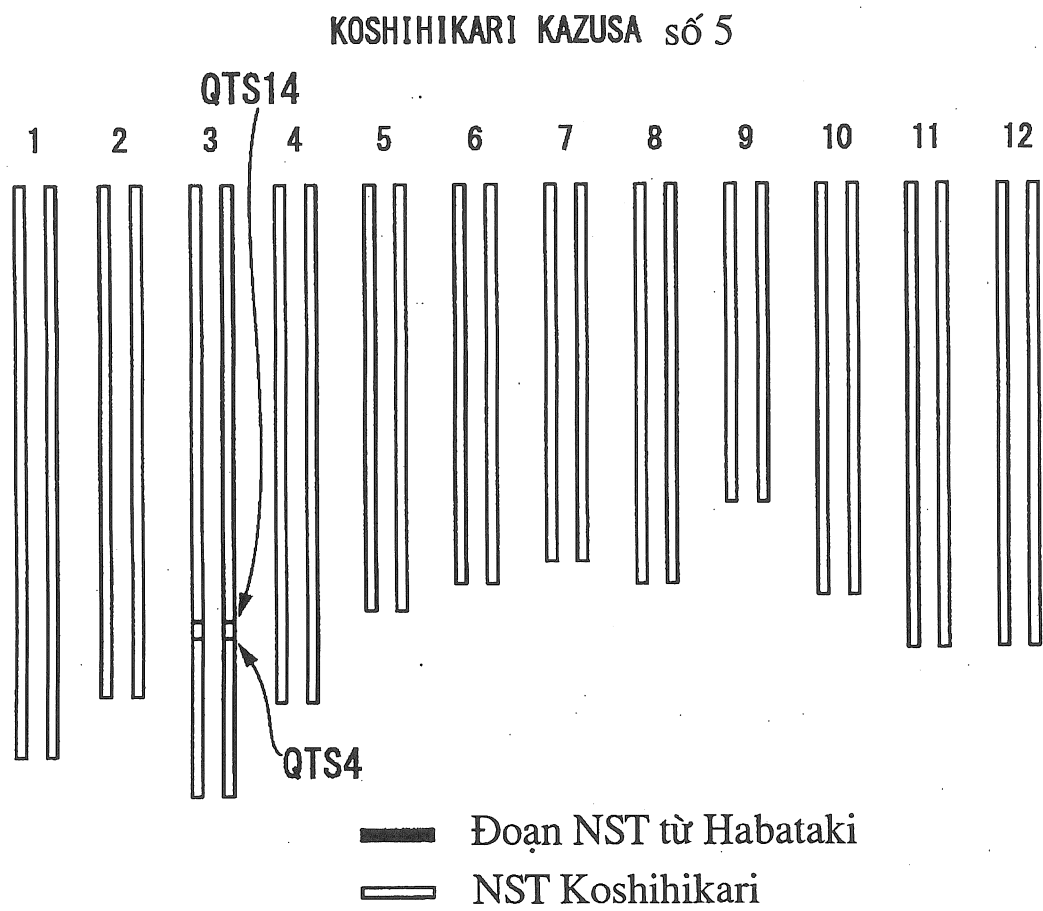
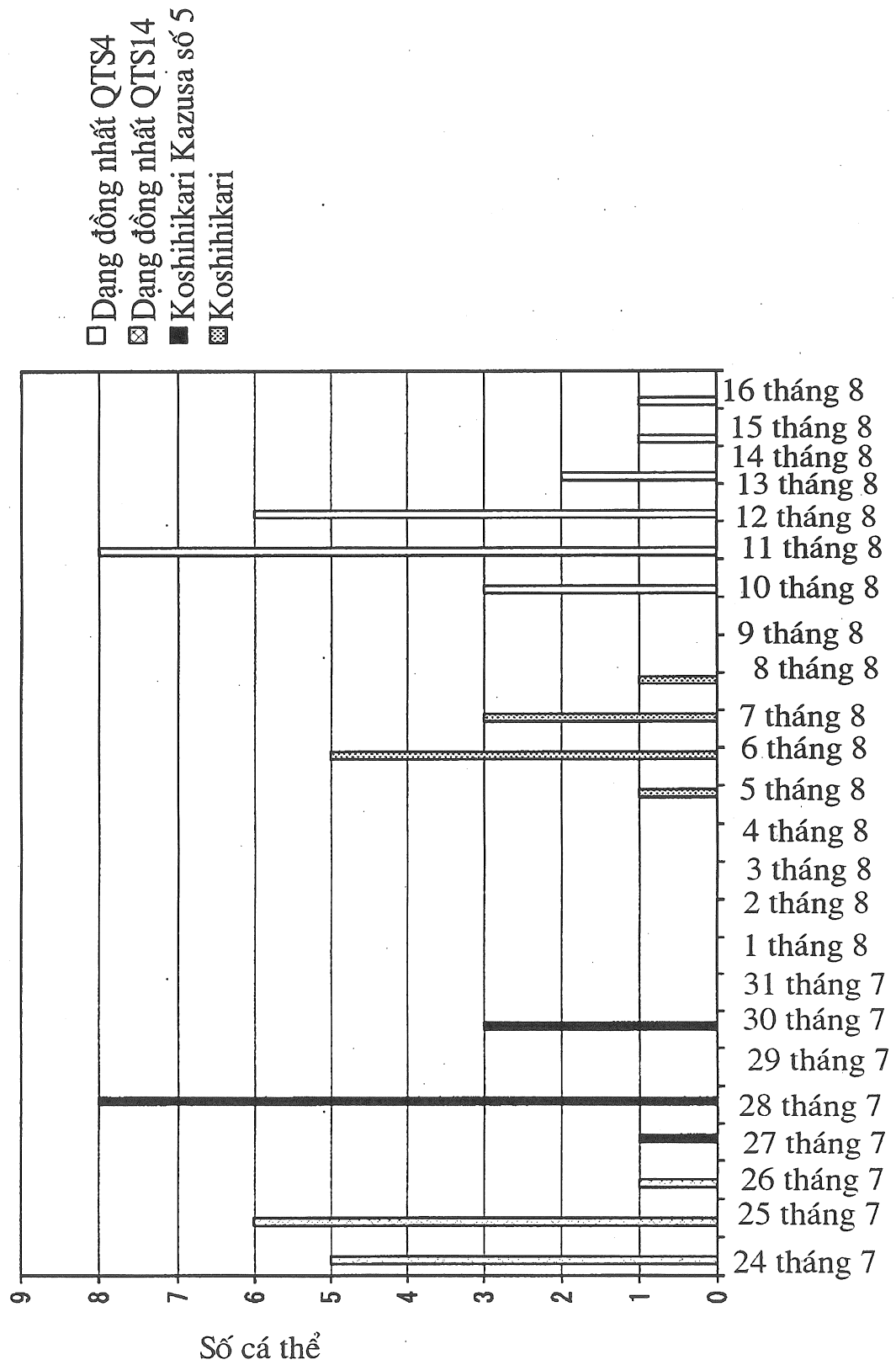


FIG. 7



Thời gian trở bông

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Honda Motor Co., Ltd.
 <120> Cây lúa chuyển gen, phương pháp phân biệt cây lúa và phương pháp làm cho cá thể cây lúa chín sớm hoặc muộn
 <130> OSP-48661
 <160> 15
 <170> PatentIn version 3.1

<210> 1
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Oryza sativa
 <220>
 <223> Dấu chuẩn ADN: Đoạn mỗi vị trên của M1-Ac
 <400> 1

cattcagttc tctcaactgc 20

<210> 2
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Oryza sativa
 <220>
 <223> Dấu chuẩn ADN: Đoạn mỗi vị dưới của M1-Ac
 <400> 2

gagatttttcg aaggttcttc gc 22

<210> 3
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Oryza sativa
 <220>
 <223> Dấu chuẩn ADN: đoạn mỗi SNP của M1-Ac
 <400> 3

ttcctaaccc agctgtgat 19

<210> 4
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Oryza sativa
 <220>
 <223> Dấu chuẩn ADN: Đoạn mỗi vị trên của M2-Ct
 <400> 4

aaaacagcca cacctgatcg 20

<210> 5
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Oryza sativa

<220>
 <223> Dấu chuẩn ADN: Đoạn mỗi vị dưới của M2-Ct
 <400> 5
 aacatcctct gcttcctcag 20

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

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

<210> 8
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Oryza sativa
 <220>
 <223> Dấu chuẩn ADN: Đoạn mỗi vị dưới của M3-Ag
 <400> 8
 ctgcatctac acgctatacc 20

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

<210> 10
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Oryza sativa
 <220>
 <223> Dấu chuẩn ADN: Đoạn mỗi vị trên của M4-At
 <400> 10
 acgtggggta cagcactttg a 21

<210> 11
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Oryza sativa
 <220>
 <223> Dấu chuẩn ADN: Đoạn mỗi vị dưới của M4-At
 <400> 11
 gtcaggaaag ttggaagagg 20

<210> 12
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Oryza sativa
 <220>
 <223> Dấu chuẩn ADN: đoạn mỗi SNP của M4-At
 <400> 12
 gatctctgac aatatcaaga agct 24

<210> 13
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Oryza sativa
 <220>
 <223> Dấu chuẩn ADN: Đoạn mỗi vị trên của M5-Tg
 <400> 13
 tctgagtatc tgactccacg 20

<210> 14
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Oryza sativa
 <220>
 <223> Dấu chuẩn ADN: Đoạn mỗi vị dưới của M5-Tg
 <400> 14
 ctctcctgtc ttagaagaag ac 22

<210> 15
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Oryza sativa
 <220>
 <223> Dấu chuẩn ADN: đoạn mỗi SNP của M5-Tg
 <400> 15
 caaagttggc aactcggcat a 21