



(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)



1-0031768

(51)⁷ A01K 61/00; C12N 5/16; C12N 5/07; (13) B
A01K 67/033; C12N 15/873

(21) 1-2017-02209

(22) 13/11/2015

(86) PCT/IL2015/051096 13/11/2015

(87) WO 2016/075697 19/05/2016

(30) 62/079,195 13/11/2014 US

(45) 25/05/2022 410

(43) 25/10/2017 355A

(73) ENZOOTIC HOLDINGS LTD. (IL)

40 Eliyahu Nawi Blvd., P.O. Box 17069, 8424411 Beer Sheva, Israel

(72) SHECHTER, Assaf (IL); ROSEN, Ohad (IL); SAGI, Amir (IL).

(74) Công ty Luật TNHH WINCO (WINCO LAW FIRM)

(54) MÔI TRƯỜNG NUÔI CẤY TẾ BÀO SƠ CẤP, LOÀI GIÁP XÁC MƯỜI CHÂN GIỐNG CÁI, PHƯƠNG PHÁP THU ĐƯỢC THỂ HỆ CON TẤT CẢ CÁC GIỐNG CÁI BẰNG CÁCH TIÊM/CẤY MÔI TRƯỜNG NUÔI CẤY TẾ BÀO SƠ CẤP VÀO GIỐNG CÁI DI TRUYỀN VÀ PHƯƠNG PHÁP THU ĐƯỢC LOÀI GIÁP XÁC MƯỜI CHÂN GIỐNG ĐỰC

(57) Sáng chế đề cập đến môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp mà bao gồm môi trường nuôi cấy tế bào và tế bào thu được từ tuyến phát sinh tính đực (AG) phôi đại của loài giáp xác mười chân. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp thu được thể hệ con tất cả giống cái bằng cách tiêm/cấy ghép ban đầu môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp vào giống cái di truyền để thu được giống đực-Neo-giống đực.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến; không kể các đối tượng khác, chế phẩm chứa tế bào có khả năng đổi giới tính ở giống cái loài giáp xác mười chân và đến thế hệ con thu được, theo cách trực tiếp hoặc gián tiếp, từ loài giáp xác mười chân được đổi giới tính này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Thuộc tính của việc lựa chọn giới tính trong quá trình nhân giống động vật và khả năng tạo ra nền tảng kỹ thuật nông nghiệp xung quanh nó mà sẽ nâng cao năng suất đã được thiết lập trong các động vật nuôi cấy như gia súc, gia cầm và cá (De Vries (2008); Correa *et al.*, (2005) và Beardmore *et al.*, (2001)). Nghề nuôi trồng các loài giáp xác vẫn chủ yếu sử dụng các quần thể không đồng nhất mà ngăn chặn các mẫu vật sinh trưởng lưỡng hình giới tính nhất. Khi được tách biệt, loài giáp xác đã chứng minh tốc độ sinh trưởng được tăng cường khi năng lượng được phân phối hướng tới sinh trưởng hơn là hướng tới sự chín tuyến sinh dục và các hoạt động giới tính khác liên quan đến sinh sản. Phần lớn là, việc nuôi trồng loài giáp xác phụ thuộc riêng vào nơi nuôi dưỡng và trại sản xuất giống để cấp ấu trùng khi sinh sản không phải là một phần của giai đoạn sinh trưởng trong trang trại và phân phối năng lượng hướng đến khả năng không mong muốn của nó. Do đó, việc nuôi cấy các quần thể một giới tính, tất cả giống đực hoặc tất cả giống cái, tạo ra sản lượng cao hơn và giá trị thương mại lớn hơn. Mặc dù trong một số loài giáp xác, tất cả quần thể giống đực tạo ra sản lượng cao hơn trong các điều kiện nuôi cấy quần canh, vài nghiên cứu (Gopal *et al.*, (2010) và Otoshiet *et al.*, (2003)) đề xuất rằng trong các điều kiện nuôi cấy tăng cường và trong hầu hết các loài giáp xác mười chân được nuôi cấy ngày nay thì giống cái có thuận lợi hơn về mặt kinh tế. Trong quần thể tất cả giống cái trong các điều kiện thương mại, kích cỡ cuối cùng khi thu hoạch có sự đồng nhất ở mức cao thu được giá trị sản xuất cao hơn đến 35% so với tất cả giống đực. Hơn thế nữa, rõ ràng rằng việc tách biệt ra khỏi giống cái làm giảm sự xâm lược và ứng suất, làm giảm sự ăn thịt

đồng loại, phân phối tính đồng nhất cao hơn về kích cỡ khi bán trên thị trường và quan trọng nhất là cho phép tốc độ lưu trữ cao hơn.

Sự biệt hoá giới tính và sự phát triển của đặc điểm giới tính thứ cấp được điều khiển bằng các cơ chế khác nhau trong toàn bộ quá trình tiến hoá. Trong động vật có xương sống và một số nhóm động vật không có xương sống, các quy trình này chịu sự điều khiển của hoócmon giới tính. Sự xác nhận gần đây cho biết rằng côn trùng hầu như không có hoócmon giới tính, các tác nhân chịu trách nhiệm cho quá trình chín giới tính của động vật chân đốt vẫn còn tranh luận. Loài giáp xác mà tiến hoá gần với côn trùng có tuyến phát sinh tính đực (androgenic gland-AG) mà chịu trách nhiệm cho quá trình biệt hoá giới tính đực. Điều thú vị là, trong một số loài giáp xác, việc điều chỉnh nội tiết của quá trình biệt hoá giới tính diễn ra trước về bên ngoài kiểu hình của đặc điểm bên ngoài thứ cấp này.

Vai trò của AG trong quá trình biệt hoá giới tính đực được chứng minh trong vài loài giáp xác bằng cách quan sát các đặc điểm giới tính sơ cấp và thứ cấp sau khi loại bỏ AG hoặc cấy ghép. Trong loài vỏ giáp chân bên *Orchestiagamarella*, việc cắt bỏ AG hai bên đã làm giảm sự sinh tinh trùng và ngăn chặn sự phát triển các đặc điểm giới tính giống đực thứ cấp. Trong *Macrobrachium rosenbergii*, việc đổi chức năng giới tính hoàn toàn từ giống đực thành giống cái Neo và từ giống cái thành giống đực Neo lần lượt đạt được bằng việc cắt bỏ AG hai bên bằng phẫu thuật và cấy ghép.

Cho đến nay, không có kỹ thuật hữu hiệu nào để đạt được việc tạo ra các quần thể giáp xác mười chân một giới tính giống cái. Vẫn có nhu cầu đối với các phương pháp hữu hiệu, có hiệu quả cao và an toàn để tạo ra các quần thể giáp xác mười chân một giới tính tất cả giống cái.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo một phương án, sáng chế đề xuất môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp bao gồm: môi trường nuôi cấy tế bào và tế bào thu được từ tuyến phát sinh tính đực (AG) phi đại của loài giáp xác mười chân. Theo một phương án, môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp không chứa mảnh mô. Theo một phương án, tuyến AG phi đại cũng là tăng sinh hoặc tăng sản. Theo phương án khác, các thuật ngữ “tăng sinh” và “tăng sản” có thể sử dụng thay thế cho nhau.

Theo phương án khác, sáng chế còn đề xuất chế phẩm chứa ít nhất là 1×10^2 tế bào đơn độc thu được từ tuyến phát sinh tính đực (AG) phì đại của loài giáp xác mười chân.

Theo phương án khác, sáng chế còn đề xuất quy trình thu được môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp bao gồm môi trường nuôi cấy tế bào và tế bào thu được từ tuyến phát sinh tính đực (AG) phì đại của loài giáp xác mười chân, trong đó quy trình này bao gồm các bước: thu các tế bào đơn độc bằng quá trình phân ly enzym của tế bào AG từ tuyến phát sinh tính đực (AG) phì đại của loài giáp xác mười chân; tạo hạt tế bào AG phân ly trong môi trường nuôi cấy tế bào; và ủ tế bào thu được từ bước (b) trong thiết bị ủ không chứa CO_2 ở 26°C đến 28°C ; do đó thu được môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp bao gồm môi trường nuôi cấy tế bào và tế bào thu được từ tuyến phát sinh tính đực (AG) phì đại của loài giáp xác mười chân.

Theo phương án khác, sáng chế còn đề xuất loài giáp xác mười chân giống cái di truyền (WZ), trong đó loài này bao gồm môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp. Theo phương án khác, loài giáp xác mười chân giống cái di truyền, trong đó loài này bao gồm môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp trải qua quá trình đổi giới tính đầy đủ (thành giống đực) – giống đực Neo. Theo phương án khác, sáng chế đề xuất loài giáp xác mười chân đồng giao tử WW.

Theo phương án khác, sáng chế còn đề xuất phương pháp thu được thế hệ con tất cả giống cái, trong đó phương pháp này bao gồm bước giao phối loài giáp xác mười chân giống cái WW với giống đực (ZZ), do đó thu được thế hệ con tất cả giống cái.

Theo phương án khác, sáng chế còn đề xuất phương pháp thu được giống đực chứa nhiễm sắc thể giới tính W, trong đó phương pháp này bao gồm bước tiêm vào loài giáp xác mười chân, non hơn 80 ngày sau ấu trùng và chứa nhiễm sắc thể giới tính W, chế phẩm chứa ít nhất là 1×10^2 tế bào đơn độc thu được từ tuyến phát sinh tính đực (AG) phì đại của loài giáp xác mười chân, do đó thu được giống đực dị giao tử mang nhiễm sắc thể giới tính W.

Mô tả văn tắt các hình vẽ

Fig.1: Mô hình xác định giới tính theo sơ đồ trong quá trình tạo ra giống đực Neo, giống cái WW và thế hệ con tất cả giống cái. ♀ - là giống cái và ♂ - là giống đực.

Các chữ cái W và Z được sử dụng để minh họa mô hình xác định giới tính dựa vào nhiễm sắc thể. WZ và WW là giống cái và ZZ là giống đực. X mô tả phương pháp nhân giống và các mũi tên nhỏ cho biết thể hệ lai của mỗi phép lai. Tỷ lệ phần trăm (%) phản ánh tỷ lệ mà trong đó mỗi thể hệ lai so sánh giống đực đối lại giống cái hoặc các giống cái thông thường (WZ) đối lại các giống cái đồng hợp tử (WW). Việc tiêm dùng để chỉ việc dùng môi trường nuôi cấy dạng huyền phù chứa tế bào AG phi đại được phân ly về mặt enzym. Mũi tên lớn cho biết phần tiếp theo của biểu đồ để nhân giống các giống cái WW.

Fig.2: Ảnh hiển vi của phép so sánh mô học của tuyến phát sinh tính đực nguyên vẹn và phi đại của *M. rosenbergii*. (A) Các phần của tuyến phát sinh tính đực (AG) nguyên vẹn và (B) AG phi đại mà được nhuộm bằng cách sử dụng hematoxylin và eosin và được quan sát dưới kính hiển vi quang học. Vị trí của AG được thể hiện là (các mũi tên). Ống tinh (SD). Cột tỷ lệ là 50µm.

Fig.3: Ảnh hiển vi của môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp AG phi đại được phân ly về mặt enzym trong huyền phù từ thời gian lai *M. rosenbergii*. Tế bào AG được ghi chép (A) 2 ngày và (B) 6 ngày sau khi tạo hạt bằng cách sử dụng kính hiển vi quang học nghịch đảo. Vị trí của tế bào AG trong môi trường nuôi cấy được chỉ ra là (mũi tên). Cột tỷ lệ là 500µm trong (A) và 100µm trong (B).

Fig.4: Các hình ảnh hiển vi thể hiện quá trình tiêm môi trường nuôi cấy tế bào AG sơ cấp phi đại được phân ly về mặt enzym trong huyền phù bằng cách sử dụng thiết bị vi tiêm đối với giống cái *M. rosenbergii* sau ấu trùng. (A) Giai đoạn sau ấu trùng thứ nhất được giới hạn trên bề mặt plastixin trước khi (B) được đặt vào mắt kép phòng thí nghiệm đối với quá trình vận hành của máy vi tiêm. (C) Việc chèn mao dẫn bằng thủy tinh (được đánh dấu hình tròn) của máy vi tiêm (phía trên của hình ảnh) trong quy trình tiêm huyền phù tế bào.

Fig.5: Ảnh hiển vi thể hiện các đặc điểm giới tính thứ cấp bên ngoài trong *M. rosenbergii*. (A) Hình ảnh giống đực (♂) và hai giống cái (♀) - nguồn: EudesCorreia. (B) Các hình ảnh hiển vi phân cắt của chân bơi thứ hai của giống đực (ảnh phía trên) và giống cái (ảnh phía dưới) *M. rosenbergii*. Chân bơi của giống đực chứa hai *appendix masculina* (mũi tên màu trắng) và *appendix interna* (mũi tên màu đen) trong khi chân bơi của giống cái chỉ chứa *appendix interna*.

Fig.6: Ảnh hiển vi gel thể hiện việc xác định giới tính di truyền của các PL giống đực Neo. Để phân biệt các giống đực không phân biệt được về mặt hình thái với các giống đực Neo, tất cả các PL đại diện mà được thao tác bằng việc tiêm và được thử nghiệm đối với sự phát triển (✓) hoặc thiếu (✗) AM và các lỗ sinh dục giống đực, được thử nghiệm về mặt di truyền bằng cách sử dụng trình tự ADN đặc hiệu giống cái. Sau đó được khuếch đại bằng PCR và được tách qua gel 2% agarosa được nhuộm bằng ethidi bromua và được hiển thị bằng cách sử dụng tia tử ngoại (bảng phía trên). *Mrβ-actin* phục vụ như đối chứng dương tính đối với PCR, đảm bảo sự có mặt của ADN trong mỗi mẫu (bảng phía dưới). ADN của giống cái đúng *M. rosenbergii* (♀) và nước lần lượt được phục vụ như đối chứng dương tính và âm tính (NC).

Fig.7: Ảnh hiển vi thể hiện giống đực Neo *M. rosenbergii* phát triển các đặc điểm giới tính đực xác nhận chuẩn. Một lần tiêm huyền phù tế bào AG bao gồm việc phát triển sáu đặc điểm giới tính riêng được giới hạn ở giống đực *M. rosenbergii*: AM đối chân bơi thứ hai (mũi tên màu trắng) và lỗ sinh dục ở gốc chân ngực thứ năm (các mũi tên). Về mặt hình thái học, các giống đực (cột bên trái) và giống đực Neo (cột ở giữa) có thể phân biệt được với nhau. Các giống cái chỉ mang *appendix interna* (mũi tên màu đen) và không phát triển các lỗ sinh dục ở gốc chân ngực thứ năm (cột bên phải).

Fig.8: Ảnh hiển vi thể hiện giống đực Neo *M. rosenbergii* đạt được sự phân hoá hình thái giống đực đầy đủ. Các giống đực Neo thu được từ một huyền phù tế bào AG được tiến triển qua sự phân hoá hình thái thông thường và được phát triển thành còng xanh trưởng thành hoàn toàn, theo hệ thống đo thông thường được phát triển bởi Kuriset *al.*, (1987). Đốt bàn của giống đực Neo (còng) được sinh trưởng đến gần hai lần miễn là giáp (lần lượt là 70mm so với 37mm). Mô tinh hoàn lớn cũng quan sát được khi giải phẫu (ghép).

Fig.9: Ảnh hiển vi thể hiện giống đực Neo *M. rosenbergii* thể hiện quá trình phát triển tuyến sinh dục giống đực đầy đủ. Mặt cắt ngang mô học được nhuộm Hematoxylin và Eosin cho biết (A) ống tinh dịch được làm đầy tinh dịch cùng với (B) thủy tinh hoàn hoạt động ở mức cao. Trong các vùng mật độ cao sau đó (phân chia)-và không đáng kể (trưởng thành) được quan sát. (C) Tinh dịch trong ống tinh thể hiện hình ô đảo ngược đặc trưng của tinh dịch trưởng thành *Mr*. (D) Tế bào tinh nguyên bào lớn tròn (Sg) được nhuộm đậm và được cho là định vị trong phần ngoại vi

của thủy đối diện với tinh trùng (Sz) mà được nhuộm nhạt và chủ yếu chứa thể tích thủy, như trường hợp trong giống đực *M. rosenbergii* sinh sản về mặt giới tính. Cột = 250 μ m (A và B) và 50 μ m (C và D). Các trường được xác định trong các khung trong A và B được mở rộng và được ghi chép lần lượt là C và D.

Fig.10: Thử nghiệm thể hệ con dạng phân tử của giống đực Neo được lai với giống cái thông thường: Ảnh hiển vi gel thể hiện việc xác định giới tính di truyền của các PL được chọn từ thể hệ con của giống đực Neo được lai với giống cái thông thường. Để phân biệt giống đực không phân biệt được về mặt hình thái với giống cái (ở giai đoạn sớm PL₂₀), tất cả đại diện được thử nghiệm về mặt di truyền bằng cách sử dụng chỉ thị giới tính ADN đặc hiệu W. Sau đó được khuếch đại bằng PCR và được tách biệt qua gel 2% agarosa được nhuộm bằng ethidi bromua và được hiển thị bằng cách sử dụng tia tử ngoại (bảng phía trên). Để phân biệt hơn nữa 2 quần thể con của giống cái, WZ và WW, việc phân tích phân tử được thực hiện bằng cách sử dụng chỉ thị giới tính ADN đặc hiệu Z, với giống đực phục vụ như đối chứng (bảng ở giữa). *Mr β -actin* phục vụ như đối chứng dương tính đối với PCR, đảm bảo sự có mặt của ADN trong mỗi mẫu (bảng phía dưới).

Fig.11: Biểu đồ tròn thể hiện sự phân bố kiểu gen của thể hệ con của giống đực Neo $\times$ giống cái thông thường. Các kiểu gen tương đối với giới tính di truyền của các PL từ thể hệ con của giống đực Neo và giống cái thông thường được xác định bằng cách sử dụng các chỉ thị giới tính phân tử dựa vào sự phân bố cuối cùng được tính toán. (A) Sự phân bố tổng thể của 865PL chỉ dựa vào chỉ thị giới tính đặc hiệu Z cho biết rằng khoảng ba phần tư thể hệ con (77%) gồm có các giống cái WZ và giống đực ZZ. Các PL còn lại (23%) là giống cái WW. (B) Nhóm đại diện của 174 PL được lấy mẫu (từ 865PL) và được phân tích về mặt di truyền bằng cách sử dụng cả chỉ thị di truyền đặc hiệu W và Z. Việc xác định kiểu gen cuối cùng thể hiện rằng các giống cái WW và giống đực ZZ là ở tỷ lệ 1:1 (mỗi tỷ lệ 24,1%) và cả ở khoảng tỷ lệ 1:2,1 với các giống cái WZ thông thường (51,8%).

Mô tả chi tiết sáng chế

Theo một phương án, sáng chế đề xuất môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp bao gồm: môi trường nuôi cấy tế bào và tế bào thu được từ tuyến phát sinh tinh đực (AG) phì đại của loài giáp xác mười chân. Theo phương án khác, “môi trường nuôi cấy tế

bào sơ cấp” là môi trường nuôi cấy tế bào thu được từ tuyến phát sinh tính đực. Theo phương án khác, “môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp” theo sáng chế không bao gồm tế bào bất tử. Theo phương án khác, “môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp” theo sáng chế không bao gồm tế bào chuyển gen. Theo phương án khác, “môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp” theo sáng chế không bao gồm tế bào khối u. Theo phương án khác, chế phẩm của sáng chế bao gồm “môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp”. Theo một phương án, loài giáp xác mười chân là loài giáp xác mười chân tôm Penaeid. Theo một phương án, sáng chế đề xuất rằng loài giáp xác mười chân là *Macrobrachium rosenbergii*.

Theo phương án khác, tế bào trong “môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp” bao gồm hoặc gồm có tế bào tuyến phát sinh tính đực phi đại được phân ly về mặt enzym. Theo phương án khác, môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp của sáng chế được dùng liều cao ngoài mong đợi và phương pháp thành công để tạo ra loài giáp xác mười chân giống đực Neo. Theo phương án khác, việc tiêm chế phẩm của sáng chế vào trong loài giáp xác mười chân giống cái sau ấu trùng dẫn đến việc đổi giới tính. Theo phương án khác, việc tiêm chế phẩm của sáng chế chứa tế bào là việc cấy ghép tế bào như được mô tả trong bản mô tả này. Theo phương án khác, việc tiêm chế phẩm của sáng chế chứa tế bào là việc cấy ghép tế bào đơn độc. Theo phương án khác, nguồn tế bào được mô tả trong bản mô tả này và loài giáp xác mười chân cần được xử lý bằng tế bào được mô tả trong bản mô tả này là của cùng loài. Theo phương án khác, loài giáp xác mười chân giống cái sau ấu trùng (có nhiễm sắc thể giống cái) mà đã trải qua quá trình đổi giới tính thành giống đực về mặt chức năng giới tính – được gọi là “giống đực Neo” là chủ yếu để tạo ra sau đó thế hệ con hoặc môi trường nuôi cấy tất cả một giới tính giống cái. Theo phương án khác, loài giáp xác mười chân giống cái sau ấu trùng như được mô tả trong bản mô tả này là loài giáp xác mười chân giống cái kiểu đại.

Theo phương án khác, ít nhất là 40% giống cái di truyền trải qua việc tiêm/cấy ghép tế bào như được mô tả trong bản mô tả này sống được trong quy trình này. Theo phương án khác, ít nhất là 50% giống cái di truyền trải qua việc tiêm/cấy ghép tế bào như được mô tả trong bản mô tả này sống được trong quy trình này. Theo phương án khác, ít nhất là 60% giống cái di truyền trải qua việc tiêm/cấy ghép tế bào như được mô tả trong bản mô tả này sống được trong quy trình này. Theo phương án khác, ít nhất là 70% giống cái di truyền trải qua việc tiêm/cấy ghép tế bào như được mô tả trong bản mô tả này sống được trong quy trình này. Theo phương án khác, ít nhất là

75% giống cái di truyền trải qua việc tiêm/cấy ghép tế bào như được mô tả trong bản mô tả này sống được trong quy trình này. Theo phương án khác, ít nhất là 80% giống cái di truyền trải qua việc tiêm/cấy ghép tế bào như được mô tả trong bản mô tả này sống được trong quy trình này. Theo phương án khác, theo thử nghiệm này 81% giống cái di truyền trải qua việc tiêm/cấy ghép tế bào như được mô tả trong bản mô tả này sống được trong quy trình này (không được thể hiện trên hình vẽ). Theo phương án khác, việc cấy ghép theo sáng chế là cấy ghép khác loài.

Theo phương án khác, ít nhất là 40% đến 90% giống cái di truyền trải qua việc tiêm tế bào như được mô tả trong bản mô tả này sống được trong quy trình này. Theo phương án khác, ít nhất là 50% đến 80% giống cái di truyền trải qua việc tiêm/cấy ghép tế bào như được mô tả trong bản mô tả này sống được trong quy trình này. Theo phương án khác, ít nhất là 60% đến 80% giống cái di truyền trải qua việc tiêm/cấy ghép tế bào như được mô tả trong bản mô tả này sống được trong quy trình này.

Theo phương án khác, ít nhất là 25% giống cái di truyền trải qua việc tiêm/cấy ghép tế bào như được mô tả trong bản mô tả này phát triển thành giống đực Neo. Theo phương án khác, "giống đực Neo" là giống cái di truyền có khả năng thụ tinh cho trứng. Theo phương án khác, có khả năng thụ tinh cho trứng là có khả năng giao phối với loài giáp xác mười chân giống cái như được mô tả trong bản mô tả này. Theo phương án khác, "giống đực Neo" là giống cái di truyền có khả năng thụ tinh cho trứng khi chín giới tính thành giống đực. Theo phương án khác, "giống đực Neo" là giống cái di truyền chứa *Appendix masculina* (AM). Theo phương án khác, "giống đực Neo" là giống cái di truyền chứa ít nhất là một lỗ sinh dục đực. Theo phương án khác, "giống đực Neo" là giống cái di truyền chứa *Appendix masculina* (AM), ít nhất là một lỗ sinh dục đực và có khả năng thụ tinh cho trứng khi chín giới tính. Theo phương án khác, ít nhất là 30% giống cái di truyền trải qua việc tiêm/cấy ghép tế bào như được mô tả trong bản mô tả này được phát triển thành giống đực Neo. Theo phương án khác, ít nhất là 35% giống cái di truyền trải qua việc tiêm/cấy ghép tế bào như được mô tả trong bản mô tả này được phát triển thành giống đực Neo. Theo phương án khác, ít nhất là 40% giống cái di truyền trải qua việc tiêm/cấy ghép tế bào như được mô tả trong bản mô tả này được phát triển thành giống đực Neo. Theo phương án khác, ít nhất là 45% giống cái di truyền trải qua việc tiêm/cấy ghép tế bào như được mô tả trong bản mô tả này được phát triển thành giống đực Neo. Theo phương án

khác, ít nhất là 50% giống cái di truyền trải qua việc tiêm/cấy ghép tế bào như được mô tả trong bản mô tả này được phát triển thành giống đực Neo. Theo phương án khác, ít nhất là 60% giống cái di truyền trải qua việc tiêm/cấy ghép tế bào như được mô tả trong bản mô tả này được phát triển thành giống đực Neo. Theo phương án khác, ít nhất là 70% giống cái di truyền trải qua việc tiêm/cấy ghép tế bào như được mô tả trong bản mô tả này được phát triển thành giống đực Neo. Theo phương án khác, ít nhất là 80% giống cái di truyền trải qua việc tiêm/cấy ghép tế bào như được mô tả trong bản mô tả này được phát triển thành giống đực Neo. Theo phương án khác, ít nhất là 90% giống cái di truyền trải qua việc tiêm/cấy ghép tế bào như được mô tả trong bản mô tả này được phát triển thành giống đực Neo.

Theo phương án khác, 25% đến 90% giống cái di truyền trải qua việc tiêm/cấy ghép tế bào như được mô tả trong bản mô tả này được phát triển thành giống đực Neo. Theo phương án khác, 25% đến 60% giống cái di truyền trải qua việc tiêm/cấy ghép tế bào như được mô tả trong bản mô tả này được phát triển thành giống đực Neo. Theo phương án khác, 25% đến 50% giống cái di truyền trải qua việc tiêm/cấy ghép tế bào như được mô tả trong bản mô tả này được phát triển thành giống đực Neo.

Theo phương án khác, việc giao phối giống đực Neo với giống cái thông thường dẫn đến thế hệ con chứa ít nhất là 500 giống cái WW riêng rẽ. Theo phương án khác, việc giao phối giống đực Neo với giống cái thông thường dẫn đến thế hệ con chứa ít nhất là 600 giống cái WW riêng rẽ. Theo phương án khác, việc giao phối giống đực Neo với giống cái thông thường dẫn đến thế hệ con chứa ít nhất là 700 giống cái WW riêng rẽ. Theo phương án khác, việc giao phối giống đực Neo với giống cái thông thường dẫn đến thế hệ con chứa ít nhất là 800 giống cái WW riêng rẽ. Theo phương án khác, việc giao phối giống đực Neo với giống cái thông thường dẫn đến thế hệ con chứa ít nhất là 900 giống cái WW riêng rẽ. Theo phương án khác, việc giao phối giống đực Neo với giống cái thông thường dẫn đến thế hệ con chứa ít nhất là 1000 giống cái WW riêng rẽ. Theo phương án khác, việc giao phối giống đực Neo với giống cái thông thường dẫn đến thế hệ con chứa 150 đến 1.500 giống cái WW riêng rẽ. Theo phương án khác, việc giao phối giống đực Neo với giống cái thông thường dẫn đến thế hệ con chứa 200 đến 2.000 giống cái WW riêng rẽ. Theo phương án khác, việc giao phối giống đực Neo với giống cái thông thường dẫn đến thế hệ con chứa 250 đến 2.500 giống cái WW riêng rẽ. Theo phương án khác, số lượng con cháu WW được xác định

dựa vào việc lấy mẫu nhiều lần của nhiều phép lai (dữ liệu không được thể hiện trên hình vẽ).

Theo phương án khác, "giống đực Neo" là giống đực Neo của loài giáp xác mười chân. Theo phương án khác, "giống đực" là giống đực của loài giáp xác mười chân. Theo phương án khác, "giống cái" là giống cái của loài giáp xác mười chân.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra giống cái WW. Theo phương án khác, giống cái WW có thể không phải là sản phẩm tự nhiên trong các loài mà trong đó tính chuyển giới tính là không tự nhiên. Theo phương án khác, sáng chế đề xuất giống cái WW. Theo phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra giống cái WW chứa phép lai giống đực Neo WZ (giống cái đổi giới tính được thao tác) với giống cái thông thường hoặc giống cái WZ. Theo phương án khác, sáng chế đề xuất giống đực Neo WZ làm cha (con cháu của một phép lai giữa giống đực ZZ thông thường và giống cái WZ - thể hệ P). Theo phương án khác, W hoặc Z dùng để chỉ nhiễm sắc thể giới tính hoặc giao tử của loài giáp xác mười chân như được mô tả trong bản mô tả này. Theo phương án khác, WW, WZ hoặc ZZ dùng để chỉ giới tính kiểu gen của loài giáp xác mười chân như được mô tả trong bản mô tả này.

Theo phương án khác, giống đực Neo được tạo ra bằng cách thao tác thể hệ con thu được từ phép lai giống đực (ZZ) và giống cái (WZ) chín giới tính của loài giáp xác mười chân (phép lai P). Theo phương án khác, việc lai thể hệ con sau ấu trùng (PL) của giống đực (ZZ) và giống cái (WZ) gồm có khoảng 50% giống đực và khoảng 50% giống cái (thể hệ con của phép lai P). Theo phương án khác, các PL giống cái thu được từ thể hệ con của phép lai P được tách biệt với giống đực. Theo phương án khác, các PL giống cái thu được từ thể hệ con của phép lai P được tách biệt với giống đực nhờ việc xác định giới tính di truyền phân tử bằng cách sử dụng chỉ thị giới tính ADN đặc hiệu W.

Theo phương án khác, trước PL₁₂₀, các PL giống cái được xác định thu được từ thể hệ con của phép lai P được thao tác bằng cách tiêm chế phẩm chứa tế bào như được mô tả trong bản mô tả này để thu được giống đực Neo WZ. Theo phương án khác, giống đực Neo WZ được sinh trưởng cho đến khi các đặc điểm giới tính thứ cấp riêng của giống đực như sự phát triển của *Appendix masculina* (AM) và lỗ sinh dục ở gốc chân đi thứ năm được thay đổi.

Theo phương án khác, giống đực Neo WZ chín giới tính được lai với giống cái kiểu đại hoặc giống cái WZ (phép lai F1). Theo phương án khác, thế hệ con của phép lai F1 này thu được tỷ lệ giới tính cái với đực là khoảng 3:1. Theo phương án khác, thế hệ con đực ZZ của phép lai F1 này được loại trừ và thế hệ con là giống cái còn lại của phép lai F1 này, khoảng 33% là giống cái WW. Theo phương án khác, bằng cách sử dụng thế hệ con là giống đực ZZ có chỉ thị giới tính ADN đặc hiệu W của phép lai F1 được loại trừ và thế hệ con là giống cái còn lại của phép lai F1 này, khoảng 33% được xác định là WW bằng cách sử dụng sàng lọc âm tính dựa vào chỉ thị giới tính ADN đặc hiệu Z.

Theo phương án khác, từ 2 đến 250 anh em có 2 dạng giao tử, khoảng 50% mang nhiễm sắc thể giới tính W và khoảng 50% mang nhiễm sắc thể giới tính Z của thế hệ F1 được chọn một cách ngẫu nhiên để thao tác đổi giới tính. Theo phương án khác, ít nhất là khoảng 50% anh em có 2 dạng giao tử, khoảng 50% mang nhiễm sắc thể giới tính W và khoảng 50% mang nhiễm sắc thể giới tính Z của thế hệ F1 mà được chọn một cách ngẫu nhiên để thao tác đổi giới tính thực tế chính thành giống đực Neo. Theo phương án khác, giống đực Neo (anh em) mà được sinh trưởng thành chín giới tính còn được lai với giống cái WZ thông thường. Theo phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp thu được giống cái WW bao gồm giống đực Neo lai với giống cái WZ thông thường (thế hệ con F2).

Theo phương án khác, thế hệ con F2 (thế hệ con của giống đực Neo và giống cái WZ) khiến cho nó tăng đến ít nhất là 500 giống cái WW. Theo phương án khác, thế hệ con F2 (thế hệ con của giống đực Neo và giống cái WZ) khiến cho nó tăng ít nhất là 700 giống cái WW. Theo phương án khác, thế hệ con F2 (thế hệ con của giống đực Neo và giống cái WZ) khiến cho nó tăng ít nhất là 900 giống cái WW. Theo phương án khác, thế hệ con F2 (thế hệ con của giống đực Neo và giống cái WZ) khiến cho nó tăng ít nhất là 1.000 giống cái WW. Theo phương án khác, thế hệ con F2 (thế hệ con của giống đực Neo và giống cái WZ) khiến cho nó tăng 200 đến 2.000 giống cái WW. Theo phương án khác, thế hệ con F2 (thế hệ con của giống đực Neo và giống cái WZ) khiến cho nó tăng 250 đến 2.500 giống cái WW. Theo phương án khác, thế hệ con F2 (thế hệ con của giống đực Neo và giống cái WZ) khiến cho nó tăng đến ít nhất là 1200 giống cái WW. Theo phương án khác, ít nhất là năm giống cái WW là anh em. Theo phương án khác, các giống cái anh em WW được tạo ra từ các phép lai bao gồm

năm giống đực Neo khác nhau, trong đó giống đực Neo là cha có nguồn gốc từ cùng cha mẹ.

Theo phương án khác, tất cả tế bào trong môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp là tế bào thu được từ tuyến phát sinh tính đực (AG) phì đại của loài giáp xác mười chân. Theo phương án khác, môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp là “môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp của tuyến phát sinh tính đực phì đại”.

Theo phương án khác, ít nhất là 50% tế bào trong môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp và/hoặc chế phẩm như được mô tả trong bản mô tả này là tế bào AG tuyến nội tiết. Theo phương án khác, ít nhất là 60% tế bào trong môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp và/hoặc chế phẩm như được mô tả trong bản mô tả này là tế bào AG tuyến nội tiết. Theo phương án khác, ít nhất là 65% tế bào trong môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp và/hoặc chế phẩm như được mô tả trong bản mô tả này là tế bào AG tuyến nội tiết. Theo phương án khác, ít nhất là 70% tế bào trong môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp và/hoặc chế phẩm như được mô tả trong bản mô tả này là tế bào AG tuyến nội tiết. Theo phương án khác, ít nhất là 75% tế bào trong môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp và/hoặc chế phẩm như được mô tả trong bản mô tả này là tế bào AG tuyến nội tiết. Theo phương án khác, ít nhất là 80% tế bào trong môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp và/hoặc chế phẩm như được mô tả trong bản mô tả này là tế bào AG tuyến nội tiết. Theo phương án khác, ít nhất là 85% tế bào trong môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp và/hoặc chế phẩm như được mô tả trong bản mô tả này là tế bào AG tuyến nội tiết. Theo phương án khác, ít nhất là 90% tế bào trong môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp và/hoặc chế phẩm như được mô tả trong bản mô tả này là tế bào AG tuyến nội tiết. Theo phương án khác, ít nhất là 95% tế bào trong môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp và/hoặc chế phẩm như được mô tả trong bản mô tả này là tế bào AG tuyến nội tiết. Theo phương án khác, ít nhất là 98% tế bào trong môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp và/hoặc chế phẩm như được mô tả trong bản mô tả này là tế bào AG tuyến nội tiết. Theo phương án khác, ít nhất là 99% tế bào trong môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp và/hoặc chế phẩm như được mô tả trong bản mô tả này là tế bào AG tuyến nội tiết.

Theo phương án khác, tế bào AG tuyến nội tiết tạo ra ít nhất là một yếu tố. Theo phương án khác, tế bào AG tuyến nội tiết biểu hiện và/hoặc tạo ra các yếu tố mà gây ra sự biệt hoá giới tính. Theo phương án khác, tế bào AG tuyến nội tiết biểu hiện và/hoặc tạo ra ít nhất là một yếu tố mà gây ra sự phát triển của các đặc điểm giới tính

được. Theo phương án khác, tế bào AG tuyến nội tiết biểu hiện và/hoặc tạo ra bản sao mã hoá dạng insulin đặc hiệu AG (*LAG*) và/hoặc protein. Theo phương án khác, tế bào AG tuyến nội tiết biểu hiện và/hoặc tạo ra protein thuộc họ hoócmon insulin. Theo phương án khác, tế bào AG tuyến nội tiết biểu hiện và/hoặc tạo ra nhiều yếu tố mà gây ra sự phát triển về các đặc điểm giới tính được. Theo phương án khác, tế bào AG tuyến nội tiết là một phần của trục tuyến nội tiết mà điều khiển sự biệt hoá giới tính, sự phát triển và duy trì các đặc điểm giới tính được.

Theo phương án khác, ít nhất là 8% tế bào trong môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp và/hoặc chế phẩm như được mô tả trong bản mô tả này là các tế bào đơn độc. Theo phương án khác, ít nhất là 10% tế bào trong môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp và/hoặc chế phẩm như được mô tả trong bản mô tả này là các tế bào đơn độc. Theo phương án khác, ít nhất là 20% tế bào trong môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp và/hoặc chế phẩm như được mô tả trong bản mô tả này là các tế bào đơn độc. Theo phương án khác, ít nhất là 25% tế bào trong môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp và/hoặc chế phẩm như được mô tả trong bản mô tả này là các tế bào đơn độc. Theo phương án khác, ít nhất là 30% tế bào trong môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp và/hoặc chế phẩm như được mô tả trong bản mô tả này là các tế bào đơn độc. Theo phương án khác, ít nhất là 35% tế bào trong môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp và/hoặc chế phẩm như được mô tả trong bản mô tả này là các tế bào đơn độc. Theo phương án khác, ít nhất là 40% tế bào trong môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp và/hoặc chế phẩm như được mô tả trong bản mô tả này là các tế bào đơn độc. Theo phương án khác, ít nhất là 45% tế bào trong môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp và/hoặc chế phẩm như được mô tả trong bản mô tả này là các tế bào đơn độc. Theo phương án khác, ít nhất là 50% tế bào trong môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp và/hoặc chế phẩm như được mô tả trong bản mô tả này là các tế bào đơn độc. Theo phương án khác, ít nhất là 60% tế bào trong môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp và/hoặc chế phẩm như được mô tả trong bản mô tả này là các tế bào đơn độc. Theo phương án khác, ít nhất là 70% tế bào trong môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp và/hoặc chế phẩm như được mô tả trong bản mô tả này là các tế bào đơn độc. Theo phương án khác, ít nhất là 80% tế bào trong môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp và/hoặc chế phẩm như được mô tả trong bản mô tả này là các tế bào đơn độc. Theo phương án khác, ít nhất là 90% tế bào trong môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp và/hoặc chế phẩm như được mô tả trong bản mô tả này là các tế bào đơn độc. Theo phương án

khác, ít nhất là 95% tế bào trong môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp và/hoặc chế phẩm như được mô tả trong bản mô tả này là các tế bào đơn độc.

Theo phương án khác, ít nhất là 8% tế bào trong môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp và/hoặc chế phẩm như được mô tả trong bản mô tả này được quần tụ. Theo phương án khác, ít nhất là 10% tế bào trong môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp và/hoặc chế phẩm như được mô tả trong bản mô tả này được quần tụ. Theo phương án khác, ít nhất là 20% tế bào trong môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp và/hoặc chế phẩm như được mô tả trong bản mô tả này được quần tụ. Theo phương án khác, ít nhất là 25% tế bào trong môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp và/hoặc chế phẩm như được mô tả trong bản mô tả này được quần tụ. Theo phương án khác, ít nhất là 30% tế bào trong môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp và/hoặc chế phẩm như được mô tả trong bản mô tả này được quần tụ. Theo phương án khác, ít nhất là 35% tế bào trong môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp và/hoặc chế phẩm như được mô tả trong bản mô tả này được quần tụ. Theo phương án khác, ít nhất là 40% tế bào trong môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp và/hoặc chế phẩm như được mô tả trong bản mô tả này được quần tụ. Theo phương án khác, ít nhất là 45% tế bào trong môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp và/hoặc chế phẩm như được mô tả trong bản mô tả này được quần tụ. Theo phương án khác, ít nhất là 50% tế bào trong môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp và/hoặc chế phẩm như được mô tả trong bản mô tả này được quần tụ. Theo phương án khác, ít nhất là 60% tế bào trong môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp và/hoặc chế phẩm như được mô tả trong bản mô tả này được quần tụ. Theo phương án khác, ít nhất là 70% tế bào trong môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp và/hoặc chế phẩm như được mô tả trong bản mô tả này được quần tụ.

Theo phương án khác, quần tụ tế bào của sáng chế bao gồm 2 đến 70 tế bào. Theo phương án khác, quần tụ tế bào của sáng chế bao gồm 2 đến 50 tế bào. Theo phương án khác, quần tụ tế bào của sáng chế bao gồm 2 đến 40 tế bào. Theo phương án khác, quần tụ tế bào của sáng chế bao gồm 2 đến 30 tế bào. Theo phương án khác, quần tụ tế bào của sáng chế bao gồm 2 đến 25 tế bào. Theo phương án khác, quần tụ tế bào của sáng chế bao gồm 2 đến 20 tế bào.

Theo phương án khác, môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp và/hoặc chế phẩm như được mô tả trong bản mô tả này không có hoặc hầu như không có mô nguyên vẹn. Theo phương án khác môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp và/hoặc chế phẩm như được mô tả trong bản mô tả này không có hoặc hầu như không chứa mảnh mô.

Theo phương án khác, tuyến AG phì đại cũng là tuyến AG tăng sinh/tăng sản. Theo phương án khác, tuyến AG phì đại là tuyến mà thể tích gia tăng. Theo phương án khác, tuyến AG phì đại là tuyến mà thể tích gia tăng theo các trị số trung bình nhân tạo. Theo phương án khác, tuyến AG phì đại là tuyến với tế bào thành phần được mở rộng (so với tuyến thông thường). Theo phương án khác, tuyến AG tăng sản khác biệt bởi số lượng tế bào gia tăng (so với tuyến thông thường).

Theo phương án khác, môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp và/hoặc chế phẩm như được mô tả trong bản mô tả này bao gồm ít nhất là 1×10^2 tế bào hoặc tế bào đơn độc thu được từ tuyến phát sinh tính đực (AG) phì đại của loài giáp xác mười chân. Theo phương án khác, môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp và/hoặc chế phẩm như được mô tả trong bản mô tả này bao gồm ít nhất là 1×10^3 tế bào hoặc tế bào đơn độc thu được từ tuyến phát sinh tính đực (AG) phì đại của loài giáp xác mười chân. Theo phương án khác, môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp và/hoặc chế phẩm như được mô tả trong bản mô tả này bao gồm ít nhất là 1×10^4 tế bào hoặc tế bào đơn độc thu được từ tuyến phát sinh tính đực (AG) phì đại của loài giáp xác mười chân. Theo phương án khác, môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp và/hoặc chế phẩm như được mô tả trong bản mô tả này bao gồm ít nhất là 1×10^5 tế bào hoặc tế bào đơn độc thu được từ tuyến phát sinh tính đực (AG) phì đại của loài giáp xác mười chân. Theo phương án khác, môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp và/hoặc chế phẩm như được mô tả trong bản mô tả này bao gồm ít nhất là 1×10^6 tế bào hoặc tế bào đơn độc thu được từ tuyến phát sinh tính đực (AG) phì đại của loài giáp xác mười chân. Theo phương án khác, môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp và/hoặc chế phẩm như được mô tả trong bản mô tả này bao gồm ít nhất là 1×10^7 tế bào hoặc tế bào đơn độc thu được từ tuyến phát sinh tính đực (AG) phì đại của loài giáp xác mười chân. Theo phương án khác, môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp và/hoặc chế phẩm như được mô tả trong bản mô tả này bao gồm ít nhất là 1×10^8 tế bào hoặc tế bào đơn độc thu được từ tuyến phát sinh tính đực (AG) phì đại của loài giáp xác mười chân.

Theo phương án khác, chế phẩm như được mô tả trong bản mô tả này bao gồm môi trường nuôi cấy tế bào. Theo phương án khác, môi trường nuôi cấy tế bào trợ giúp cho sự sinh trưởng của tế bào được mô tả trong bản mô tả này. Theo phương án khác, môi trường nuôi cấy tế bào trợ giúp cho quá trình tăng sinh của tế bào được mô tả trong bản mô tả này. Theo phương án khác, môi trường nuôi cấy tế bào gây ra hoặc

duy trì quá trình tiết hoóc môn phát sinh tính đực bởi tế bào được mô tả trong bản mô tả này. Theo phương án khác, các chuyên gia trong lĩnh vực này đã biết các môi trường nuôi cấy tế bào thích hợp.

Theo phương án khác, chế phẩm như được mô tả trong bản mô tả này bao gồm: Arginin, biotin, NaCl, glucoza, insulin, xystin, cholin, KCl, penixilin, transferaza, glutamin, folat, NaH_2PO_4 , yếu tố sinh trưởng đặc hiệu streptomycin, histidin nicotinamit, NaHCO_3 , đồ phenol, isoleuxin, pantothenat, CaCl_2 , huyết thanh chung, leuxin, pyridoxal, MgCl_2 , Lysin, thiamin, methionin, riboflavin, phenylalanin, threonin, tryptophan, tyrosin, valin hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng.

Theo phương án khác, môi trường nuôi cấy tế bào thích hợp bao gồm L-15. Theo phương án khác, môi trường nuôi cấy tế bào thích hợp bao gồm L-15 đậm. Theo phương án khác, môi trường nuôi cấy tế bào thích hợp bao gồm một hoặc nhiều axit amin bazơ tự do. Theo phương án khác, môi trường nuôi cấy tế bào thích hợp bao gồm L-Glutamin. Theo phương án khác, môi trường nuôi cấy tế bào thích hợp bao gồm huyết thanh. Theo phương án khác, môi trường nuôi cấy tế bào thích hợp bao gồm huyết thanh bào thai bò. Theo phương án khác, môi trường nuôi cấy tế bào thích hợp bao gồm chất kháng sinh hoặc tổ hợp của chất kháng sinh như nhưng không chỉ giới hạn ở penixilin-streptomycin.

Quy trình

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp thu được môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp của tuyến phát sinh tính đực (AG) phì đại được phân ly về mặt enzym trong huyền phù từ loài giáp xác mười chân. Theo phương án khác, sáng chế đề xuất quy trình thu được môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp, trong đó môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp bao gồm/gồm có tế bào thu được từ tuyến phát sinh tính đực (AG) phì đại của loài giáp xác mười chân và môi trường, trong đó phương pháp này bao gồm các bước: (a) thu được tế bào đơn độc bởi tế bào AG phân ly về mặt enzym từ tuyến phát sinh tính đực (AG) phì đại của loài giáp xác mười chân; (b) tạo hạt tế bào AG phân ly trong môi trường nuôi cấy tế bào; và (c) ủ tế bào thu được từ bước (b) trong thiết bị ủ ở 25°C đến 27°C ; do đó thu được môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp bao gồm môi trường nuôi cấy tế bào và tế bào thu được từ tuyến phát sinh tính đực

(AG) phi đại của loài giáp xác mười chân. Theo phương án khác, thiết bị ủ là thiết bị ủ không chứa CO₂. Theo phương án khác, nhiệt độ của thiết bị ủ ở khoảng 26°C.

Loài giáp xác mười chân được đổi giới tính

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất loài giáp xác mười chân, trong đó loài này bao gồm môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp và/hoặc chế phẩm như được mô tả trong bản mô tả này. Theo phương án khác, sáng chế đề xuất loài giáp xác mười chân giống cái, trong đó loài này bao gồm môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp và/hoặc chế phẩm như được mô tả trong bản mô tả này. Theo phương án khác, loài giáp xác mười chân hoặc loài giáp xác mười chân giống cái là loài giáp xác mười chân đến 180 ngày sau ấu trùng. Theo phương án khác, sáng chế đề xuất loài giáp xác mười chân giống cái trải qua quá trình đổi giới tính, trong đó loài này bao gồm môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp và/hoặc chế phẩm như được mô tả trong bản mô tả này. Theo phương án khác, loài giáp xác mười chân giống cái mà trải qua quá trình đổi giới tính theo sáng chế đề xuất con cháu. Theo phương án khác, loài giáp xác mười chân giống cái mà trải qua quá trình đổi giới tính theo sáng chế đề xuất con cháu loài giáp xác mười chân đồng giao tử WW.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp thu được thế hệ con tất cả giống cái, trong đó phương pháp này bao gồm bước giao phối giống cái WW đồng giao tử với loài giáp xác mười chân giống đực, do đó thu được thế hệ con tất cả giống cái. Theo phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp thu được thế hệ con tất cả giống cái, trong đó phương pháp này bao gồm bước giao phối giống cái WW đồng giao tử với loài giáp xác mười chân giống đực dị giao tử, do đó thu được thế hệ con tất cả giống cái. Theo phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp thu được thế hệ con tất cả giống cái, trong đó phương pháp này bao gồm bước giao phối giống cái WW đồng giao tử với loài giáp xác mười chân giống đực đồng giao tử, do đó thu được thế hệ con tất cả giống cái. Theo phương án khác, giống cái WW đồng giao tử là con cháu của loài giáp xác mười chân giống cái mà trải qua quá trình đổi giới tính theo sáng chế.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp thu được giống đực có nhiễm sắc thể giới tính W, trong đó phương pháp này bao gồm bước tiêm cho loài giáp xác mười chân chứa nhiễm sắc thể giới tính W và non hơn 180 ngày sau ấu trùng, chế

phẩm chứa ít nhất là 1×10^2 tế bào đơn độc thu được từ tuyến phát sinh tính đực (AG) phì đại của loài giáp xác mười chân, do đó thu được giống đực có nhiễm sắc thể giới tính W. Theo phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp thu được giống đực có nhiễm sắc thể giới tính W (về mặt di truyền là giống cái), trong đó phương pháp này bao gồm bước tiêm cho loài giáp xác mười chân là giống cái về mặt di truyền (bao gồm nhiễm sắc thể giới tính W) non hơn 180 ngày sau ấu trùng, chế phẩm chứa ít nhất là 1×10^2 tế bào đơn độc thu được từ tuyến phát sinh tính đực (AG) phì đại của loài giáp xác mười chân.

Theo phương án khác, non hơn 180 ngày sau ấu trùng là non hơn 160 ngày sau ấu trùng. Theo phương án khác, non hơn 180 ngày sau ấu trùng là non hơn 150 ngày sau ấu trùng. Theo phương án khác, non hơn 180 ngày sau ấu trùng là non hơn 130 ngày sau ấu trùng. Theo phương án khác, non hơn 180 ngày sau ấu trùng là non hơn 120 ngày sau ấu trùng. Theo phương án khác, non hơn 180 ngày sau ấu trùng là non hơn 100 ngày sau ấu trùng. Theo phương án khác, non hơn 180 ngày sau ấu trùng là non hơn 80 ngày sau ấu trùng. Theo phương án khác, non hơn 180 ngày sau ấu trùng là non hơn 60 ngày sau ấu trùng. Theo phương án khác, non hơn 180 ngày sau ấu trùng là 1 đến 60 ngày sau ấu trùng. Theo phương án khác, non hơn 180 ngày sau ấu trùng là non hơn 30 ngày sau ấu trùng.

Theo phương án khác, việc tiêm là tiêm vào trong mô cơ của phần bụng. Theo phương án khác, việc tiêm là tiêm vào trong mô cơ của phần bụng thứ nhất. Theo phương án khác, việc tiêm là tiêm vào trong mô cơ của phần bụng thứ hai.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp tiêm môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp AG phì đại được phân ly về mặt enzyme trong huyền phù trong loài giáp xác mười chân. Theo phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra loài giáp xác mười chân giống đực Neo bằng việc tiêm tế bào AG phì đại được phân ly thu được từ môi trường nuôi cấy sơ cấp trong chế phẩm dạng huyền phù. Theo phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra loài giáp xác mười chân giống đực Neo bằng một lần tiêm tế bào AG phì đại được phân ly thu được từ môi trường nuôi cấy sơ cấp trong huyền phù.

Theo phương án khác, tế bào phì đại thu được từ AG phì đại của loài giáp xác mười chân giống đực trưởng thành sau ít nhất là 5 ngày từ khi loại bỏ bằng phẫu thuật

hai bên phức hệ tuyến xoang cơ quan X. Theo phương án khác, tế bào phì đại thu được từ AG phì đại của loài giáp xác mười chân giống đực trưởng thành sau ít nhất là 8 ngày từ khi loại bỏ bằng phẫu thuật hai bên phức hệ tuyến xoang cơ quan X. Theo phương án khác, tế bào phì đại thu được từ AG phì đại của loài giáp xác mười chân giống đực trưởng thành sau quá trình xử lý đã biết bất kỳ mà có thể gây ra sự phì đại trong AG. Theo phương án khác, tế bào phì đại thu được từ AG phì đại của loài giáp xác mười chân giống đực trưởng thành sau 4 đến 15 ngày từ khi loại bỏ bằng phẫu thuật hai bên phức hệ tuyến xoang cơ quan X.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất chế phẩm được mô tả trong bản mô tả này được tiêm một lần hoặc nhiều lần vào trong loài giáp xác mười chân giống cái ở tuổi nằm trong khoảng từ 1 đến 100 ngày sau ấu trùng. Theo phương án khác, sáng chế đề xuất chế phẩm được mô tả trong bản mô tả này được tiêm một lần hoặc nhiều lần vào trong loài giáp xác mười chân giống cái ở tuổi nằm trong khoảng từ 1 đến 50 ngày sau ấu trùng. Theo phương án khác, việc tiêm là bằng các phương tiện của thiết bị vi tiêm. Theo phương án khác, việc tiêm cho giống cái chưa chín giới tính gây ra việc đổi chức năng giới tính thành giống đực và/hoặc giống đực Neo. Giống đực và/hoặc giống đực Neo sau đó được sử dụng, theo một số phương án, để thu được quần thể một giới tính tất cả giống cái bằng cách tạo ra giống cái WW.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, các dạng số ít "một" bao gồm nhiều dạng trừ khi có quy định rõ ràng khác. Do đó, ví dụ, việc tham chiếu đến "tác nhân điều trị" bao gồm việc tham chiếu đến nhiều hơn một tác nhân điều trị.

Trừ khi có quy định khác hoặc rõ ràng khác trong bản mô tả này, như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "hoặc" được hiểu là gồm có.

Thuật ngữ "bao gồm" được sử dụng trong bản mô tả này có nghĩa là và được sử dụng thay thế cho nhau với, cụm từ "bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở".

Như được sử dụng trong bản mô tả này, các thuật ngữ "bao gồm", "gồm có", "chứa", "có" và tương tự có thể có nghĩa được gán cho chúng trong luật sáng chế Mỹ và có thể có nghĩa là "bao gồm", "gồm có" và tương tự; "chủ yếu gồm có hoặc "gồm có chủ yếu" cũng có nghĩa được mô tả trong luật sáng chế Mỹ và thuật này không giới hạn, cho phép sự có mặt của nhiều hơn các thuật ngữ mà được trích dẫn miễn là các đặc điểm cơ bản hoặc mới của chúng được trích dẫn không bị thay đổi bởi sự có mặt

của nhiều hơn các thuật ngữ được trích dẫn, nhưng ngoại trừ các phương án của giải pháp kỹ thuật đã biết.

Theo một số phương án, chế phẩm của sáng chế bao gồm các hoạt chất dùng trong dược phẩm. Theo một số phương án, các hoạt chất dùng trong dược phẩm được bổ sung vào trước khi cấy ghép. Các hoạt chất dùng trong dược phẩm bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở bất kỳ trong số các ví dụ riêng được bộc lộ trong bản mô tả này. Các chuyên gia trong lĩnh vực này sẽ biết được rằng các hợp chất khác nhau mà nằm trong hạng mục này và là hữu ích theo sáng chế.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "lượng hữu hiệu" cùng đề chỉ lượng tế bào mà tạo ra tác dụng mong muốn (như xử lý hoặc đổi giới tính).

Trừ khi có quy định cụ thể hoặc rõ ràng dựa vào bản mô tả này, như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "khoảng" được hiểu là nằm trong khoảng dung nạp thông thường trong lĩnh vực này, ví dụ trong 2 độ lệch chuẩn trung bình. Khoảng có thể được hiểu là nằm trong 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05% hoặc 0,01% trị số đã nêu. Trừ khi có quy định rõ ràng khác, tất cả các trị số theo số được đề xuất trong bản mô tả này được sửa đổi bởi thuật ngữ khoảng.

Các mục đích, các ưu điểm khác và các dấu hiệu kỹ thuật mới của sáng chế sẽ trở nên rõ ràng đối với chuyên gia trong lĩnh vực này khi xem xét các ví dụ sau đây, mà không được dự định làm giới hạn phạm vi bảo hộ của sáng chế. Ngoài ra, mỗi phương án trong số các phương án khác nhau và các khía cạnh của sáng chế như được mô tả trên đây và như được nêu trong các điểm yêu cầu bảo hộ dưới đây có trợ giúp theo thử nghiệm trong các ví dụ sau đây.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Nói chung, danh pháp được sử dụng trong bản mô tả này và các quy trình phòng thí nghiệm được sử dụng trong sáng chế bao gồm các kỹ thuật phân tử, sinh hoá, vi sinh vật và ADN tái tổ hợp. Các kỹ thuật như vậy được giải thích đầy đủ trong các tài liệu chuyên ngành. Xem, ví dụ, ấn phẩm: "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook et al., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, New York (1988); Watson et al.,

"Recombinant DNA", Scientific American Books, New York; Birren et al. (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998); các phương pháp được nêu trong các patent Mỹ số 4,666,828; 4,683,202; 4,801,531; 5,192,659 và 5,272,057; ấn phẩm: "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volumes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); "Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique" by Freshney, Wiley-Liss, N. Y. (1994), Third Edition; "Current Protocols in Immunology" Volumes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites et al. (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8th Edition), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell and Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman and Co., New York (1980); các thử nghiệm miễn dịch sẵn có được mô tả sâu rộng trong patent và tài liệu chuyên ngành, xem, ví dụ, patent Mỹ số 3,791,932; 3,839,153; 3,850,752; 3,850,578; 3,853,987; 3,867,517; 3,879,262; 3,901,654; 3,935,074; 3,984,533; 3,996,345; 4,034,074; 4,098,876; 4,879,219; 5,011,771 và 5,281,521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., and Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D., and Higgins S. J., eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) và "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods và Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al., "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996); nội dung của tất cả các tài liệu này được đưa ra trong bản mô tả này bằng cách viện dẫn. Các tài liệu tham khảo chung khác được đưa ra trong toàn bộ tài liệu này.

Vật liệu và phương pháp

Động vật

Macrobrachium rosenbergii giống đực cang màu xanh ($40 \pm 5g$) được nuôi trong các bể riêng rẽ 600L ở $28 \pm 2^\circ C$ với sự thông gió không đổi, chế độ chiếu sáng 14:10 (L:D) và cho ăn *ad libitum* (viên tôm chứa 30% protein) trong các nhà máy của Enzootic Holdings Ltd. Các cá thể non *M. rosenbergii* sau biến thái (nghĩa là, sau ấu trùng (PL)) được nuôi trong bể hình chữ U $3,5m^3$ và được duy trì như trên.

Sự phì đại tuyến phát sinh tính đực và sự phân ly tế bào nhờ enzym

Phức hệ tuyến xoang cơ quan X của thần kinh nội tiết, đặt trong mắt kính, đã biết để tiết peptit thần kinh mà điều chỉnh âm tuyến phát sinh tính đực (AG) và các hoạt tính của nó. Do đó, sự thao tác nội tiết mà bao gồm sự loại trừ của nó qua việc loại bỏ bằng phẫu thuật và gây ra cả phì đại và tăng sản AG được áp dụng cho giống đực còng xanh *M. rosenbergii*. Tám ngày sau thao tác nội tiết; gây mê giống đực cảm ứng trong 15 phút trong nước đá lạnh được bổ sung 0,2% hypoclorit nhằm mục đích diệt khuẩn. Sau đó, cắt các động vật và AG phì đại của chúng được phân lập dưới kính hiển vi điện tử giải phẫu. Tiếp theo, tách tế bào bằng quá trình phân giải enzym. Tóm lại, tất cả AG phì đại được nhóm vào một ống và đặt vào nước đá. Sau đó, 1ml hỗn hợp enzym đặc hiệu và kháng thể [môi trường Leibovitz L-15 với L-Glutamin, 0,1% trọng lượng/thể tích (w/v) Collagenaza typ I, 0,1% (w/v) Collagenaza typ IV và dung dịch Penixilin-Streptomycin] được bổ sung vào. Sau đó, đặt ống phản ứng phân ly vào trong thiết bị quay ở tốc độ 25 vòng/phút trong 40 phút ở nhiệt độ trong phòng (RT) và tiếp theo ly tâm ở 500×g trong 5 phút, cũng ở nhiệt độ trong phòng. Khi ly tâm, đặt ống vào mui che dòng lớp mỏng sinh học vi thể trùng. Lớp phía trên (không chứa tế bào sống) được loại bỏ và rửa viên tế bào bằng cách tạo huyền phù lại trong 1ml môi trường nạp [môi trường Leibovitz L-15 với L-Glutamin, 10% thể tích (v/v) huyết thanh bào thai bò và dung dịch penixilin-streptomycin] và tiếp theo ly tâm ở 500×g trong 5 phút ở nhiệt độ trong phòng. Lặp lại quy trình rửa ba lần. Cuối cùng, tạo huyền phù lại tế bào trong 500μl môi trường nạp.

Đếm tế bào

Nồng độ tế bào và khả năng sống được đo bằng cách sử dụng nhuộm xanh Trypan tiêu chuẩn. Tóm lại, tế bào được nhuộm bằng dung dịch xanh Trypan ở nồng độ cuối cùng 0,08% và sau đó nạp vào huyết cầu kế để quan sát dưới kính hiển vi điện tử ở độ phóng đại 100 lần.

Môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp AG

Các phần chứa 10μl tế bào huyền phù trong môi trường được tạo hạt ngay trong đĩa 24 giếng được phủ bằng 20μg/ml poly D-lysin (PDL) ở mật độ khoảng 1×10^4 tế bào/giếng hoặc thứ nhất được nạp vào trong thiết bị vi tiêm, chuyển qua vi mao bằng thủy tinh vi tiêm vào trong ống 1,5ml và sau đó tạo viên trong đĩa 24 giếng ở mật độ khoảng 1×10^4 tế bào/giếng. Trong số các tế bào được gom, phần được phân phối để

đánh giá khả năng sống và được nhuộm như được mô tả trên đây. Tế bào được sinh trưởng trong thiết bị ủ không chứa CO₂ ở 27°C. Hai mươi bốn giờ sau khi tạo viên và trở lại, môi trường sinh trưởng được thay thế một phần mỗi ngày khác. Nói chung, tế bào được duy trì trong 21 ngày mà trong thời gian đó chúng được giám sát dưới kính hiển vi điện tử nghịch đảo và hình thái học của chúng, mật độ và sự tương tác được ghi chép.

Tiêm huyền phù tế bào AG phì đại vào trong PL

Khả năng của tế bào AG phì đại được tinh chế và được sinh trưởng để gây ra sự đổi giới tính được thử nghiệm. Quần thể hỗn hợp (giống đực và giống cái) chứa PL 60 hoặc 30 ngày hoặc ít hơn (PL_{≤60}, PL_{≤30}; n=913) được tiêm với khoảng 2x10³ tế bào AG phì đại. Nói chung, mỗi PL được giới hạn trên bề mặt plastixin và sử dụng thiết bị vi tiêm, trong khi quan sát qua mắt kính phòng thí nghiệm, tế bào AG phì đại từ môi trường nuôi cấy sơ cấp được tạo huyền phù và được dùng qua một lần tiêm vào trong mô cơ của phần bụng thứ nhất. Sau đó, các PL được tiêm được chia thành hai nhóm: (1) chủ yếu gồm có PL (n=883) mà được duy trì trong bể dạng chữ U 3,5m³ hoặc bể tròn khoảng 10m³ hoặc bể bằng đất hình chữ nhật (khoảng 250m²; khoảng 8m × 30m) với độ sâu nước 1m để sinh trưởng. (2) gồm có các PL đại diện (n=30) mà được duy trì trong bể hình chữ U 3,5m³. Các PL sau đó được thử nghiệm thông thường và tiếp theo đổi giới tính thành giống đực Neo khả nghi.

Appendix masculina (AM) và thử nghiệm lỗ sinh dục giống đực

Để đánh giá các dấu hiệu giống đực, chân bơi thứ hai (chân bơi) được loại bỏ bằng cách sử dụng kẹp mịn và sự có mặt/hoặc thiếu AM được xác nhận dưới kính hiển vi điện tử. Trong các giống đực Neo trưởng thành (1 năm tuổi) thử nghiệm tái sinh được thực hiện. Tóm lại, các giống đực Neo với AM xác nhận, như được mô tả trên đây, được cho phép lột xác và sự tái sinh AM được thử nghiệm.

Về bên ngoài của lỗ sinh dục giống đực ở gốc chân ngực thứ năm (chân đi) được thử nghiệm bằng cách đặt PL lên phía lưng của nó và nhìn dưới mắt kính phòng thí nghiệm.

Phân tích phân tử

Chân bơi thứ hai được loại bỏ trước để quan sát *AM* đã được sử dụng cho việc chiết ADN hệ gen (gADN) để xác định di truyền giới tính. Tóm lại, gADN được chiết bằng cách sử dụng kit REDExtract-N-Amp Tissue PCR (Sigma, Israel) và được sử dụng làm mẫu vật đối với PCR của các chỉ thị giới tính ADN đặc hiệu W hoặc Z (Ventura *et al.*, 2011). Các sản phẩm PCR được tách trên gel 2% agarosa, được nhuộm bằng ethidi bromua và hiển thị hoá trên bảng tia tử ngoại.

Nghiên cứu mô

Vỏ được cắt cùng với ống tinh đầu gần ('vas deferens') từ giống đực Neo (1 năm tuổi). Cố định các mẫu mô trong Carnoy II sửa đổi [Etanol 60% (thể tích; Bio-Lab Ltd, Israel), Cloroform 30% (thể tích; Frutarom, Israel), axit axetic tối 10% (thể tích; Sigma, Israel) và Formaldehyt 2% (thể tích; Sigma, Israel) trong 24 giờ, hydrat hoá khử qua một loạt nồng độ rượu gia tăng đến Xylen (Sigma, Israel) và gắn vào Paraplast (Kendall, Mansfield, MA) theo quy trình thông thường. Các phần 5µm được cắt trên tấm trượt phủ silan (Menzel-Gläser, Braunschweig, Germany). Các phần liên tiếp được nhuộm bằng cách sử dụng Hematoxylin tiêu chuẩn (Bar Naor, Israel) và Eosin (Bar Naor, Israel) để quan sát hình thái.

Ví dụ 1

Tạo ra giống đực neo bằng cách sử dụng một lần tiêm huyền phù tế bào vào sau ấu trùng của loài giáp xác mười chân giống cái

Dữ liệu thử nghiệm được đưa ra trong bản mô tả này chứng minh khả năng tạo ra môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp của tuyến phát sinh tính đực phôi đại của loài giáp xác mười chân phân ly về mặt enzym trong huyền phù và sử dụng môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp của tuyến phát sinh tính đực phôi đại của loài giáp xác mười chân để tạo ra giống đực Neo. Các giống đực Neo này còn sử dụng để giao phối và tạo ra giống cái WW dẫn đến việc tạo ra thế hệ con nuôi cấy tất cả giống cái một giới tính.

Nhiễm sắc thể W và Z-xác định giới tính

Lưu đồ được thể hiện trên Fig.1 minh họa mô hình xác định giới tính dựa vào nhiễm sắc thể W và Z. Theo mô hình thừa kế di truyền này, giống cái là dị giao tử (WZ) và giống đực là đồng giao tử (ZZ). Lưu đồ này cho biết rằng thậm chí một lần tiêm môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp AG phôi đại trong huyền phù vào loài giáp xác mười chân non giống cái PL có thể gây ra quá trình đổi giới tính đầy đủ và chức năng

giới tính thành giống đực Neo. Ngoài mong đợi là, thao tác này không gây ra sự ốm đau hoặc chết bất kỳ đối với các động vật được xử lý. Quan trọng để nhấn mạnh rằng sáng chế khắc phục được rào cản liên quan đến thao tác mô AG mà dẫn đến phá hủy tốc độ chết và tốc độ đổi giới tính thấp.

Giống đực Neo “được tạo ra”, mà có chức năng giới tính đầy đủ như giống đực, là các giống cái di truyền mang giao tử W. Khi giao phối thành công giống đực Neo (WZ) với giống cái thông thường (như WZ), 25% thế hệ con được phát hiện là giống đực (ZZ) và 75% còn lại là giống cái. Trong số phần còn lại, 67% được xác định là giống cái dị giao tử (WZ) thông thường trong khi 33% còn lại được phát hiện là các giống cái đồng giao tử WW đơn nhất.

Việc giao phối hơn nữa các giống cái đồng giao tử WW với giống đực làm tăng đến 100% thế hệ con giống cái dị giao tử WZ.

Do điều kiện quyết để thu được môi trường nuôi cấy tế bào tuyến phát sinh tính đực phì đại treo đực, loài giáp xác mười chân giống đực trưởng thành phải được cảm ứng về mặt nội tiết do đó hàm lượng neuropeptit ức chế AG đặc hiệu được giảm và tuyến tạo ra lượng đủ hoặc môn phát sinh tính đực mà có thể cảm ứng thực sự phát triển của giống đực ở động vật có khả năng phát triển thành cả giống đực và giống cái (bất chấp chế phẩm chứa sáu nhiễm sắc thể giới tính của nó). Lần lượt là, sự can thiệp này dẫn đến phì đại AG và chứa tế bào của nó.

Phép so sánh mô học giữa AG nguyên vẹn (Fig.2A) và AG phì đại (Fig.2B) chứng minh rõ ràng sự khác nhau đáng kể về tổng kích cỡ của AG, số lượng tế bào chứa nó và biểu thị đặc điểm của chúng. Các AG phì đại được loại bỏ về mặt phẫu thuật được phân ly bằng cách sử dụng hỗn hợp enzym đặc hiệu để thu được huyền phù chứa tế bào riêng rẽ.

Việc đi qua vi tiêm đường như không có tác dụng rõ ràng đối với khả năng sống của tế bào AG. Môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp tạo viên được ghi chép vào ngày 2 và 6 (lần lượt là Fig.3A và Fig.3B) và được phát hiện là có khả năng sống miễn là 21 ngày trong môi trường nuôi cấy.

Hình ảnh kính hiển vi quang học của môi trường nuôi cấy thể hiện rõ rệt khả năng sống của tế bào, chứng minh sự kéo dài tế bào được phát triển tốt (Fig.3). Sau đó là thể hiện đặc điểm tiêu chuẩn của môi trường nuôi cấy sơ cấp sống khoẻ mạnh, như

tương phản với tế bào chết mà có xu hướng co rút và sau đó tách khỏi bề mặt giếng và nổi lên.

Đề tiêm huyền phù tế bào vào tác PL rất nhỏ, tuổi non từ 20 đến 60 ngày hoặc ít hơn sau biến thái (được gọi là $PL_{\leq 60}$), nền tảng riêng kết hợp thiết bị vi tiêm và mắt kính phòng thí nghiệm, được lắp ráp (Fig.4). Thao tác được thực hiện trên mỗi động vật giới hạn dưới mắt kính phòng thí nghiệm bằng cách sử dụng thiết bị vi tiêm (Fig.4).

Tổng cộng có 450 PL giống cái được tiêm một lần với huyền phù môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp AG phi đại. Tỷ lệ tử vong trực tiếp do thao tác gây ra được ghi chép ngay sau khi thao tác và đến 48 giờ. Tỷ lệ sống ngay PL được cho là ở mức cao, ở khoảng 81%.

Khi đạt đến sự chín giới tính, *M. rosenbergii* chứng minh tính lưỡng hình giới tính rõ ràng và giống đực khác biệt rõ rệt với giống cái (Fig.5A). Trước khi chín giới tính đầy đủ, đặc điểm giới tính thứ cấp đặc hiệu giống đực – *AM*, có thể được phát hiện ở chân bơi thứ hai của giống đực khi được quan sát dưới mắt kính phòng thí nghiệm (Fig.5B, bảng phía trên). Điều này trái với *appendix interna*, mà được quan sát trong cả giống đực và giống cái (Fig.5B).

Trong tổng số, 210 giống đực mà được dùng một lần tiêm tế bào AG phi đại huyền phù được sinh trưởng trong thời gian 7 đến 8 tháng trong các điều kiện khác nhau (bể bằng đất, bể 3,5m³, v.v). Rất nhiều động vật được thao tác này được nuôi trong bể bằng đất trong các điều kiện sinh trưởng, sau đó chỉ được thử nghiệm một lần ở lần thu hoạch cuối cùng, 9 tháng từ khi thao tác. Một trăm giống cái được cho là được đổi giới tính hoàn toàn thành giống đực Neo, dựa vào sự phát triển của *AM* và hai lỗ sinh dục đực nhìn thấy được ở gốc chân bò thứ năm. Các giống cái bổ sung thể hiện sự đổi giới tính một phần chỉ với một số đặc điểm giống đực được quan sát. Ngoài ra, ba hình thái giới tính khác biệt của loài này (giống đực nhỏ, càng màu vàng cam và càng màu xanh), được quan sát. Khi giám sát chặt chẽ hơn nhóm đại diện, 16 giống cái (được xác nhận theo chỉ thị giới tính di truyền, Fig.6) được thao tác như trên. Khoảng 50 ngày sau thao tác, tất cả 16 giống cái di truyền này đã phát triển *AM*, 13 trong số chúng cũng phát triển lỗ sinh dục giống đực (khoảng 81%) (Fig.7, cột ở giữa) do đó, được xem là giống đực Neo. Mười bốn (14) giống đực PL nguyên vẹn có cùng

tuổi như giống cái thao tác, mà phục vụ như tham chiếu đã thể hiện cả *AM* và lỗ sinh dục ở điểm đánh giá thứ nhất (Fig.6 và Fig.7, cột bên trái), như mong đợi.

Giống đực Neo được giám sát trên cơ sở hàng tuần và được phát hiện là giữ lại *AM* của chúng. Hơn thế nữa, các giống đực Neo một năm sau khi thao tác đã tái tạo *AM* của chúng theo thử nghiệm tái tạo lột xác. Các giống đực Neo này được duy trì trong các bể riêng biệt, đã trải qua sự biệt hoá hình thái đầy đủ và phát triển thành hình thái giống đực chiếm ưu thế – ‘càng xanh’ (cá thể đại diện được thể hiện trên Fig.8). Đối với sự phát triển tuyến sinh dục, giống đực Neo càng xanh được giải phẫu và hệ thống sinh sản của chúng bao gồm vỏ chín (Fig.9, ghép) được lấy mẫu để điều tra mô học (Fig.9). Các cá thể được giải phẫu cho biết ống tinh phát triển tốt (Fig.9A) được làm đầy với tinh trùng. Dưới sự phóng đại cao, hình thái của tế bào đã chứng minh cấu trúc tiêu chuẩn dạng ô đảo ngược làm đặc trung dạng tế bào chín này ở giống đực *M. rosenbergii* (Fig.9B).

Hơn thế nữa, mô tinh hoàn đã phát triển gồm có cả vùng nhuộm đậm và nhạt được quan sát (Fig.9C). Dưới sự phóng đại ở cao, các vùng nhuộm đậm, được đặt vào phần ngoại vi của thùy đã nêu bất kỳ, được cho là chứa vòng phân chia tế bào nguyên bào tinh (Fig.9D). Các vùng nhuộm nhạt, phần lớn gồm có thể tích thùy được cho là chứa tinh trùng chín.

Ví dụ 2

Lai giống đực neo thu được mới với giống cái thông thường

Giống đực Neo *Mr* được lưu trữ cùng với giống cái thông thường trong các bể công cộng (3,5 đến 10m³). Một lần một tuần, tất cả giống cái được gom từ bể mà sau đó, chỉ có các giống cái mang trứng được loại bỏ vào trong bể thủy tinh riêng rẽ. Các giống cái được giám sát hàng ngày cho đến khi màu trứng thay đổi từ màu vàng cam sang màu xám mà chúng được chuyển vào các bể để trứng chứa nước muối 12 đến 15ppt. Sau khi ấp trứng, loại bỏ giống cái và môi trường nuôi cấy ấu trùng được bắt đầu như thông thường. Để xác định xem liệu giống cái có được thụ tinh bởi giống đực Neo hay không, mỗi thể hệ con được duy trì riêng biệt và ngay sau khi biến thái, giống và giới tính theo kiểu gen sau ấu trùng được xác định như được mô tả trên đây.

Các giống cái mà được lưu trữ cùng với giống đực Neo lưu trữ theo lứa trong các bể công cộng được thụ tinh một cách thành công. Khi biến thái, PL được mô tả đặc

điểm chung bằng cách sử dụng các chỉ thị giới tính ADN để xác nhận rằng các WW PL có mặt (Fig.10) (do đó, ngoại trừ khả năng giống cái được thụ tinh bởi giống đực ZZ thông thường). Trong tổng số, trong số 865 cá thể được thử nghiệm thể hiện 4 phép lai khác nhau của ít nhất là 2 giống đực Neo khác nhau, 77% (n=668) là dương tính đối với chỉ thị giới tính ADN nhiễm sắc thể Z, cụ thể là, các giống cái WZ và giống đực ZZ (Fig.11A). Do đó, 23% còn lại (n=197) được xác định là giống cái WW. Hơn thế nữa, cả chỉ thị giới tính ADN nhiễm sắc thể W và Z được sử dụng để mô tả đặc điểm toàn diện sự phân bố chính xác kiểu gen trong số mẫu 174 PL. Trong số sau đó, 42 được xác định là giống đực ZZ (24,1%), 90 là giống cái WZ (51,8%) và 42 là giống cái WW (24,1%), với tỷ lệ kiểu gen ZZ: WZ: WW là 1: 2.1: 1 (Fig.11B).

Ví dụ 3

Lai trên quy mô thương mại

Thế hệ P

Ở thế hệ cha mẹ (P), một thế hệ gốc lưu trữ theo lứa (giống đực ZZ thông thường và giống cái WZ) đã tạo thế hệ con gồm có 2.000 đến 5.000 nghìn anh em WZ.

Thế hệ F1

Trong số còn lại 10 giống cái WZ thế hệ thứ nhất (F1) được chọn ngẫu nhiên trải qua quá trình thao tác đổi giới tính mà có tiềm tế bào như được mô tả trong bản mô tả này. Ít nhất là 5 trong số các giống cái WZ được chọn được đổi giới tính thành công thành giống đực Neo WZ có chức năng đầy đủ. Thử nghiệm này mà trong đó tỷ lệ thành công 50% được ghi chép theo thử nghiệm khác liên quan đến việc đổi giới tính thành công của giống cái WZ thành giống đực Neo.

Thế hệ F2

Mỗi giống trong số các giống đực Neo (anh em) được sinh trưởng thành chín giới tính và được cho phép giao phối một lần với giống cái WZ thông thường. Các phép lai này làm tăng đến ít nhất là năm thế hệ con F2. Mỗi con cháu của thế hệ con F2 liên quan đến anh em đối với con cháu F2 song song của F2. Trong mỗi thế hệ con F2 nêu trên, thu được ít nhất là 700 giống cái WW. Rõ ràng là, các giống cái WW này có thể đã không thu được mà không cần phải có quá trình thao tác đổi giới tính của giống cái WZ và do đó không phải là sản phẩm tự nhiên.

Mỗi giống cái F2 WW thu được từ các thế hệ con F2 khác nhau phải là anh em được tạo ra từ các phép lai liên quan đến ít nhất là 5 giống đực Neo F1 khác nhau (mà phải là cha mẹ giống đực Neo F1) thu được từ cùng cha mẹ. Thu được ít nhất là 5 anh em như vậy, số lượng tối thiểu cần để sản xuất hàng loạt.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp, trong đó môi trường này bao gồm: môi trường nuôi cấy tế bào và tế bào thu được từ tuyến phát sinh tính đực (AG) phì đại của loài giáp xác mười chân, trong đó ít nhất 10% các tế bào này là tế bào đơn độc, trong đó ít nhất 85% tế bào trong môi trường nuôi cấy này là tế bào AG tuyến nội tiết, và trong đó môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp là về cơ bản là không có mô toàn vẹn.
2. Môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp theo điểm 1, trong đó 100% tế bào trong môi trường nuôi cấy này là tế bào thu được từ tuyến phát sinh tính đực (AG) phì đại của loài giáp xác mười chân.
3. Môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp theo điểm 1, trong đó môi trường này không chứa mảnh mô.
4. Môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp theo điểm 1, trong đó tuyến AG phì đại cũng là tuyến AG tăng sản.
5. Chế phẩm chứa ít nhất là 1×10^2 tế bào đơn độc thu được từ tuyến phát sinh tính đực (AG) phì đại của loài giáp xác mười chân.
6. Chế phẩm theo điểm 5, trong đó tuyến AG phì đại cũng là tuyến AG tăng sản.
7. Loài giáp xác mười chân giống cái, trong đó loài này chứa môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp theo điểm 1 hoặc chế phẩm theo điểm 5.
8. Loài giáp xác mười chân giống cái theo điểm 7, trong đó loài này trải qua quá trình đổi giới tính.
9. Con cháu của loài giáp xác mười chân giống cái theo điểm 8.
10. Loài giáp xác mười chân đồng giao tử WW theo điểm 9.
11. Phương pháp thu được thế hệ con tất cả giống cái, trong đó phương pháp này bao gồm bước giao phối loài giáp xác mười chân WW theo điểm 10 với loài giáp xác mười chân giống đực, do đó thu được thế hệ con tất cả giống cái, trong đó loài giáp xác mười chân WW là giống cái WW.
12. Phương pháp theo điểm 11, trong đó giống đực này là giống đực Neo WZ.
13. Loài giáp xác mười chân giống cái thu được bằng phương pháp theo điểm 11 hoặc 12.

14. Phương pháp thu được loài giáp xác mười chân giống đực chứa nhiễm sắc thể giới tính W, trong đó phương pháp này bao gồm bước tiêm vào loài giáp xác mười chân chứa nhiễm sắc thể giới tính W và non hơn 180 ngày sau ấu trùng, chế phẩm theo điểm 5, do đó thu được loài giáp xác mười chân giống đực chứa nhiễm sắc thể giới tính W.

15. Phương pháp theo điểm 14, trong đó bước tiêm này là việc tiêm vào trong mô cơ của phân bụng.

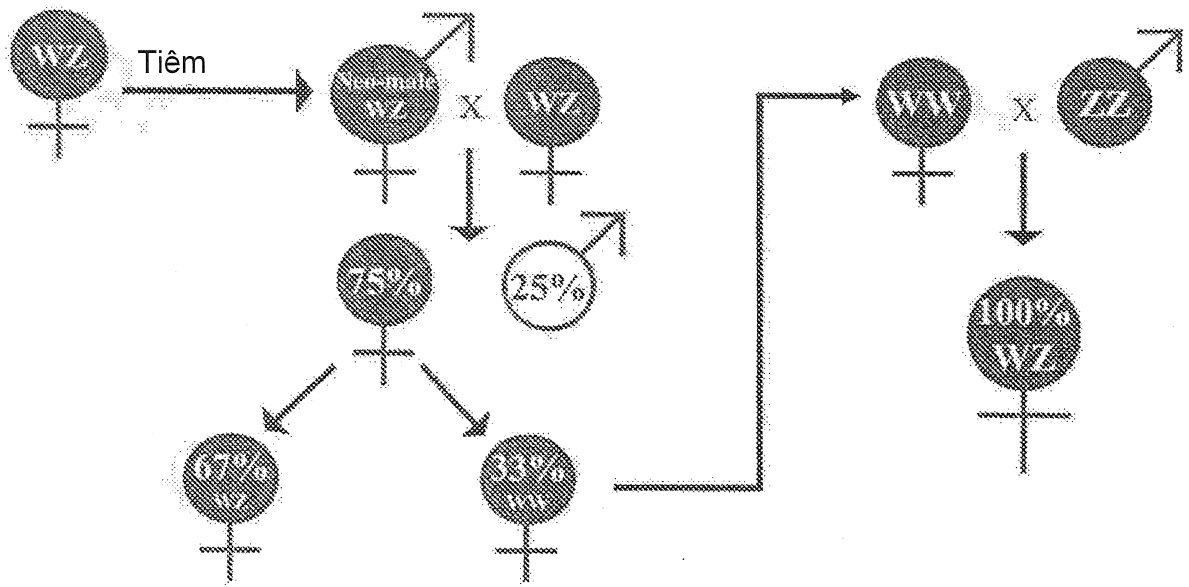


Fig.1

AG nguyên vẹn

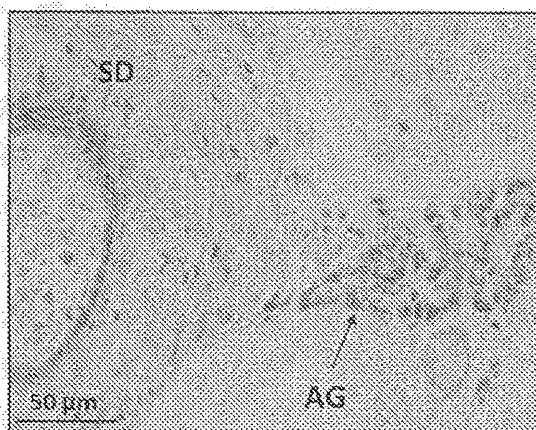


Fig.2A

AG phỉ đại

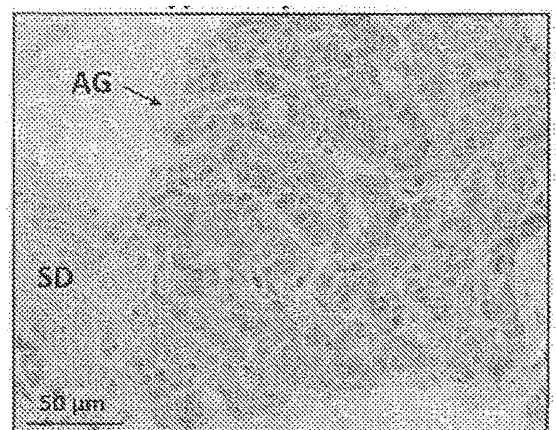


Fig.2B

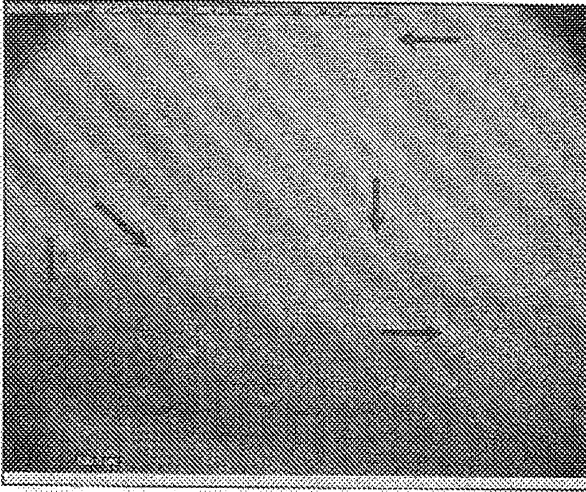


Fig.3A

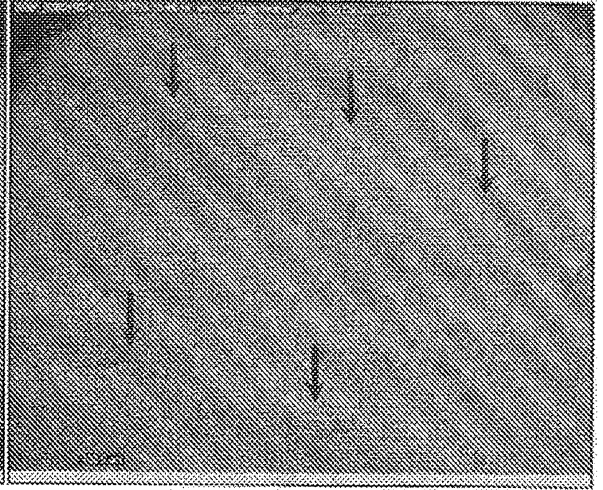


Fig.3B

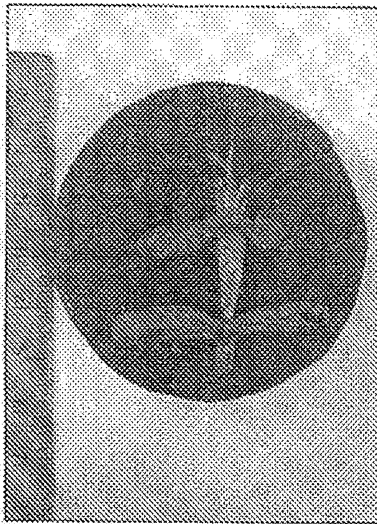


Fig.4A



Fig.4B

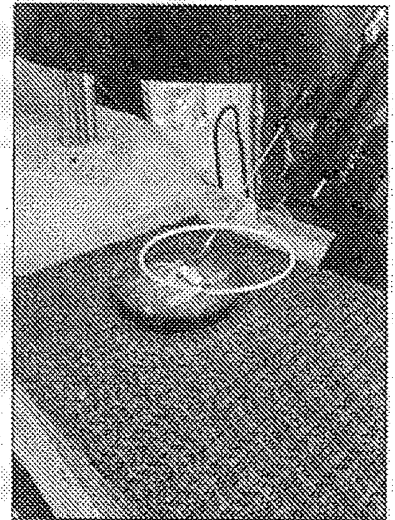


Fig.4C

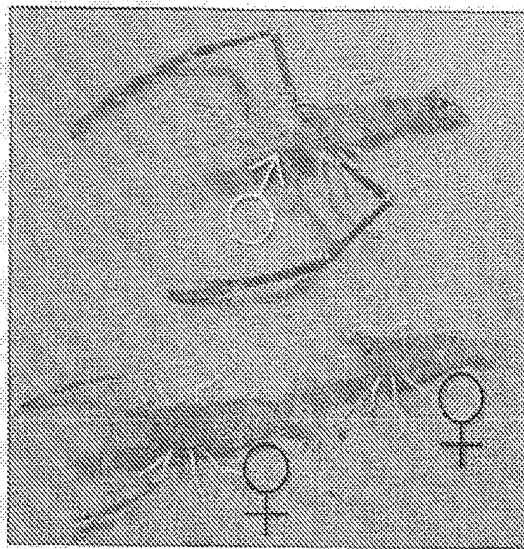


Fig. 5A

Chân bơi thứ hai

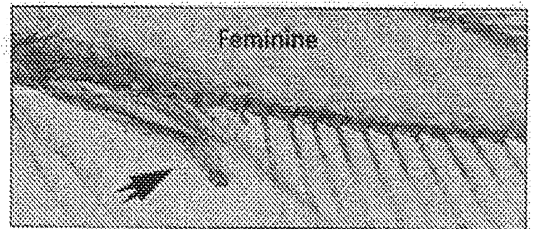
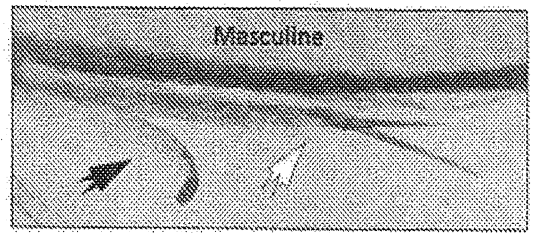


Fig. 5B

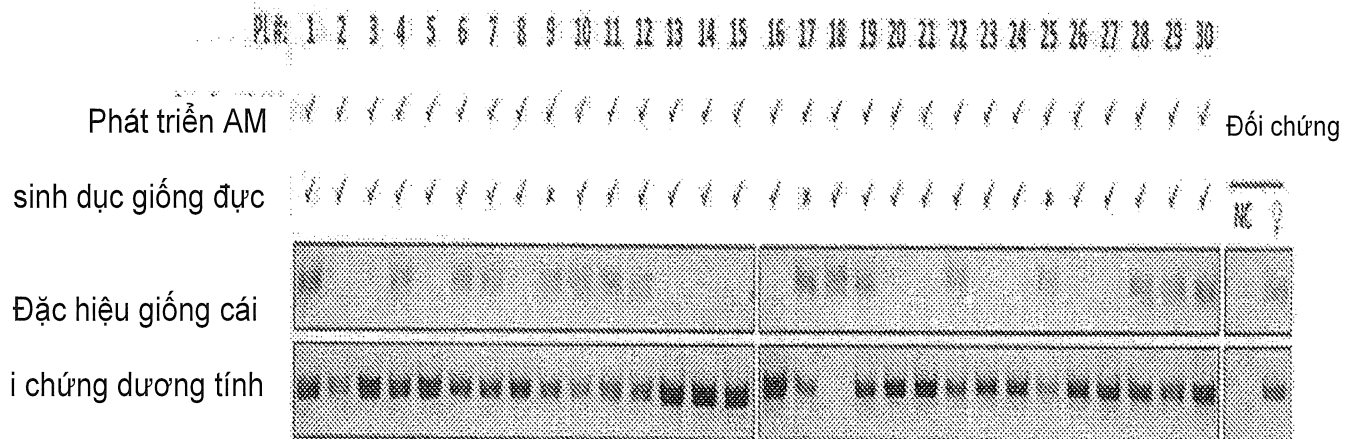


Fig. 6

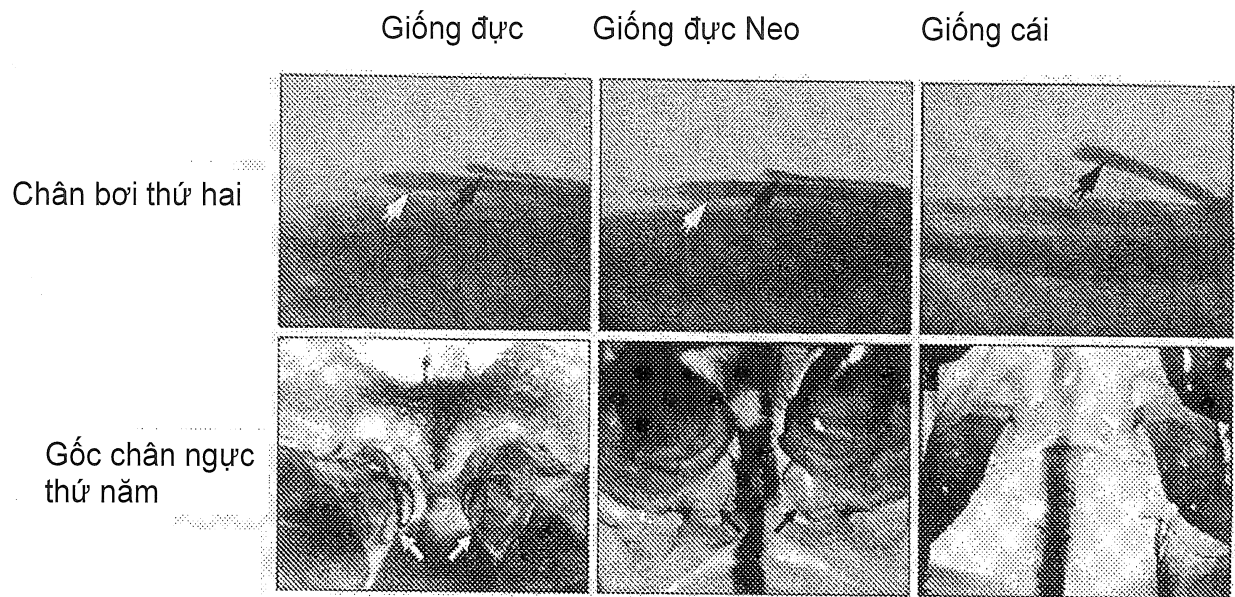


Fig.7

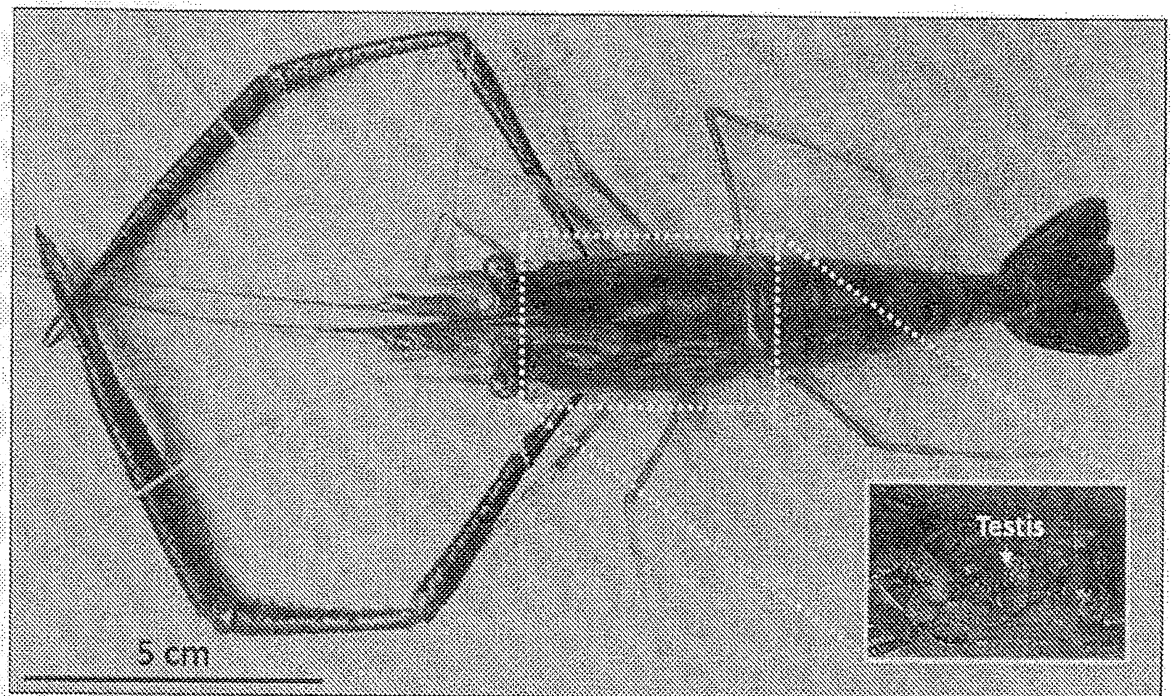
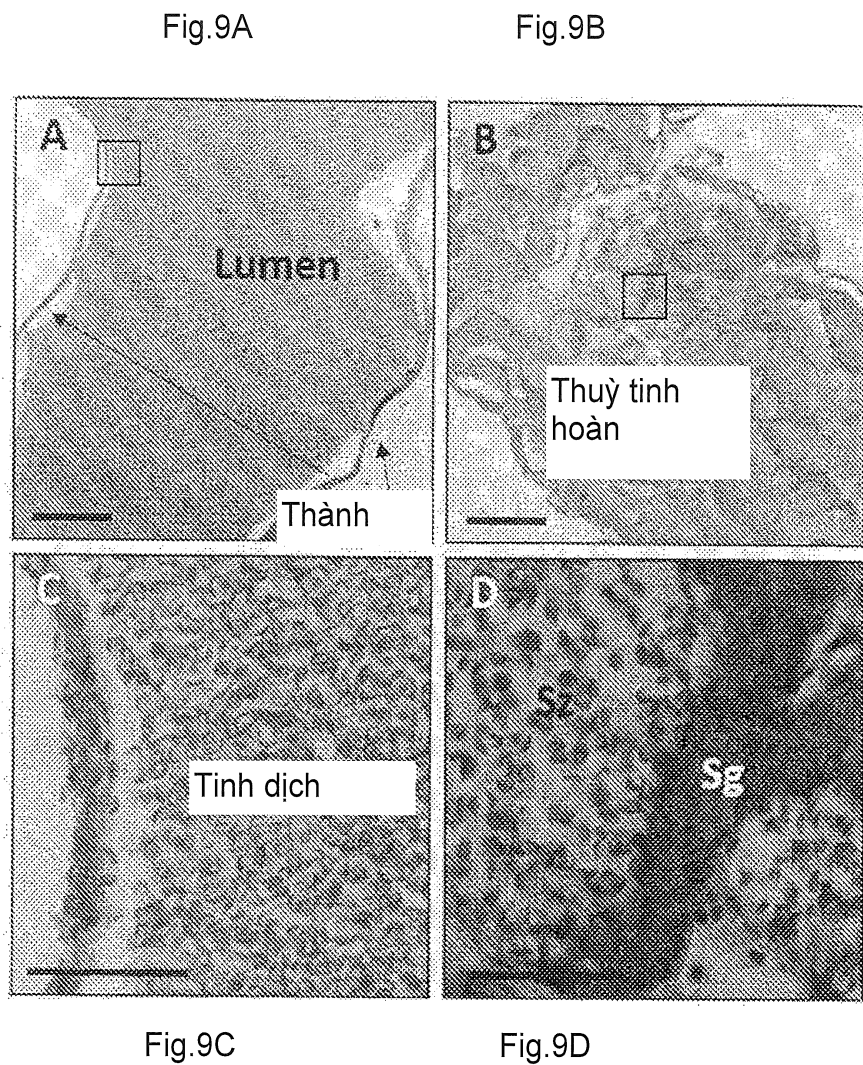


Fig.8



	Giống cái						Giống đực		
	WW	WW	WW	WZ	WZ	WZ	ZZ	ZZ	ZZ
Chỉ thị đặc hiệu W									
Chỉ thị đặc hiệu Z									
Đối chứng dương tính									

Fig.10

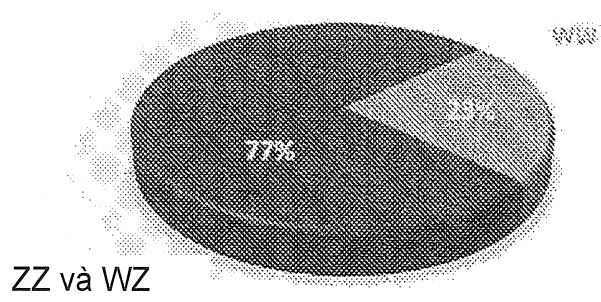


Fig.11A

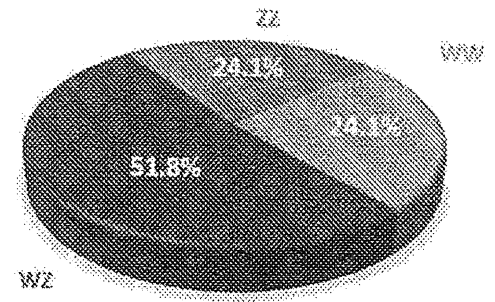


Fig.11B