



(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)



1-0033215

(51)⁸ A01K 61/59; A01K 67/033

(13) B

(21) 1-2018-02519

(22) 10/11/2016

(86) PCT/IL2016/051219 10/11/2016

(87) WO 2017/081690 A1 18/05/2017

(30) 62/254,264 12/11/2015 US

(45) 25/09/2022 414

(43) 25/10/2018 367A

(73) ENZOOTIC HOLDINGS LTD. (IL)

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

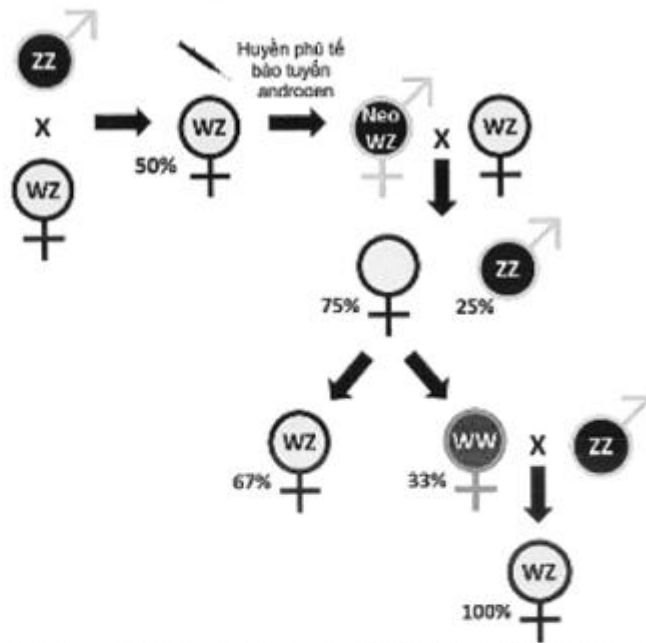
(72) ROSEN, Ohad (IL); SHECHTER, Assaf (IL); SAGI, Amir (IL).

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

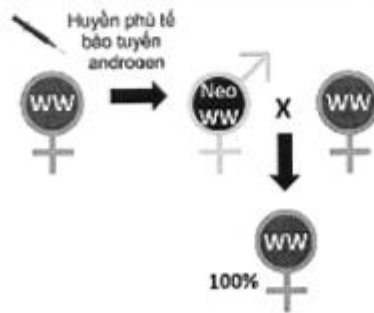
(54) GIÁP XÁC MƯỜI CHÂN ĐỰC ĐỒNG GIAO TỬ WW VÀ PHƯƠNG PHÁP ĐỂ
THU ĐƯỢC THỂ HỆ CON TOÀN CÁI BẰNG CÁCH SỬ DỤNG GIÁP XÁC
MƯỜI CHÂN ĐỰC ĐỒNG GIAO TỬ WW

(57) Sáng chế đề cập đến thể hệ con toàn cái của giáp xác mười chân. Sáng chế cũng đề cập đến giáp xác mười chân đực giả đồng giao tử WW và giáp xác mười chân cái đồng giao tử WW. Sáng chế đề cập đến phép lai giáp xác mười chân đực giả đồng giao tử WW và giáp xác mười chân cái đồng giao tử WW sinh ra thể hệ con 100% toàn cái đồng giao tử WW.

Pha 1:



Pha 2:



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế này đề cập đến; không kể các đối tượng khác, giáp xác mười chân đực đồng giao tử WW và phương pháp thu được thể hệ con toàn cái bằng cách lai giáp xác mười chân đồng giao tử WW với giáp xác mười chân khác.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Những thuộc tính của việc lựa chọn giới tính trong chọn giống động vật và khả năng tạo ra cấu trúc hạ tầng kỹ thuật trong nông nghiệp xung quanh việc lựa chọn giới tính mà sẽ cải thiện đặc tính này đã được thiết lập vững chắc ở các động vật nuôi như gia súc, gia cầm và cá (De Vries (2008); Correa *et al.*, (2005) và Beardmore *et al.*, (2001)). Nghề nuôi giáp xác vẫn chủ yếu sử dụng các quần đàn khác gen mà vấn đề này gây trở ngại cho việc sử dụng đầy đủ mô hình phát triển lưỡng hình giới tính hữu ích. Khi được tách riêng dựa vào giới tính, giáp xác chứng minh tỷ lệ phát triển cao làm nguồn năng lượng được phân phối chủ yếu theo hướng phát triển sinh dưỡng hơn là thành thực tuyến dinh dục và các hoạt động liên quan đến sinh sản khác. Chăn nuôi giáp xác chủ yếu phụ thuộc vào vấn đề ương và ấp trứng để cung cấp con non, vì phần lớn ngành công nghiệp bao gồm các trang trại nuôi thương phẩm tìm cách ngăn chặn sự sinh sản không mong muốn và phân phối năng lượng theo hướng đó. Do đó, việc nuôi các quần đàn đơn giới tính, toàn đực hoặc toàn cái, tạo ra năng suất cao hơn và giá trị thương mại lớn hơn. Mặc dù ở một số loài giáp xác, các quần đàn toàn

đực tạo ra năng suất cao hơn trong các điều kiện nuôi quảng canh, một số nghiên cứu (Gopal *et al.*, (2010) and Otoshi *et al.*, (2003)) gợi ý rằng, trong điều kiện nuôi tăng cường và ở hầu hết các loài giáp xác mười chân được nuôi ngày nay, chính các con cái có lợi hơn về mặt kinh tế, vì chúng sinh trưởng rộng hơn và được cho là có khả năng chuyển đổi thức ăn tốt hơn so với con đực (Moss and Moss (2006)). Trong một quần đàn toàn cái trong điều kiện thương mại, kích cỡ cuối cùng khi thu hoạch đồng nhất cao tạo ra giá trị sản lượng cao hơn 35% so với quần đàn toàn đực. Ngoài ra, hình như sự tách ra khỏi các con đực làm giảm tính hung hăng gây gổ và kích ứng, giảm tính ăn thịt đồng loại, cung cấp tính đồng nhất cao hơn về kích cỡ tiếp thị và quan trọng nhất là cho phép mật độ thả cao hơn, tất cả những yếu tố này là có giá trị cao đối với người nuôi. Lưu ý tương tự, việc bổ sung chỉ các con cái WW vào urom trứng, điều này sẽ cung cấp thể hệ con toàn WZ cho người nuôi, sẽ chuyển việc nuôi giáp xác truyền thống sang nuôi công nghiệp bền vững ‘dạng mầm’. Vì quá trình nội phối F_2 (hoặc thế hệ sau đó) mà quá trình này tạo ra các giống gốc kém hơn sẽ không diễn ra tại các trại giống địa phương, các công ty chọn giống sẽ có khả năng bảo vệ được các dòng có đặc điểm ưu tú của họ (các dòng này đã được chọn lọc cao qua hàng chục thế hệ).

Sự biệt hóa giới tính và sự phát triển các đặc trưng sinh dục phụ được kiểm soát bởi các cơ chế khác nhau theo sự tiến hóa. Ở các nhóm động vật có xương sống và một số động vật không có xương sống, các quá trình này nằm dưới sự kiểm soát của các hormone giới tính. Căn cứ khẳng định rằng, côn trùng

có thể không có hormone giới tính, các tác nhân chịu trách nhiệm về sự thành thực sinh dục của động vật chân khớp vẫn đang còn tranh luận. Giáp xác mà thân cận về mặt tiến hóa với côn trùng có tuyến androgen (AG), tuyến này chịu trách nhiệm về sự biệt hóa giới tính đực. Thật thú vị, ở một số giáp xác, sự điều hòa nội tiết trong biệt hóa giới tính xảy ra trước sự xuất hiện kiểu hình của đặc điểm phụ bên ngoài này.

Vai trò của tuyến androgen trong sự biệt hóa giới tính đực được chứng minh ở một số loài giáp xác bằng cách quán sát các đặc trưng giới tính chính và phụ sau khi loại bỏ hoặc cấy ghép tuyến androgen. Ở giáp xác chân hai loại *Orchestia gamarella*, việc cắt bỏ tuyến androgen hai bên làm giảm sự sinh tinh trùng và làm cản trở sự phát triển các đặc trưng giống đực phụ. Ở loài tôm càng xanh *Macrobrachium rosenbergii*, sự chuyển ngược giới tính chức năng hoàn toàn từ con đực thành con cái giả và từ con cái thành con đực giả đạt được bằng cách lần lượt phẫu thuật loại bỏ và ghép tuyến androgen hai bên tương ứng, với kỹ thuật nêu sau thể hiện hiệu quả kém, do đó không đạt được việc thực hiện thương mại.

Ngược lại với nội dung nêu trên, công nghệ cách mạng hóa gần đây đã chứng minh chuyển dạng thành công tôm càng xanh cái thành con đực giả đầy đủ về chức năng và sinh sản. Công nghệ này dựa vào việc tiêm liều đơn huyền phù tế bào tuyến androgen nguyên thủy (Levy *et al.*, (2016)). Trong khi công nghệ có hiệu lực, chi phí hiệu quả và an toàn cao trong sản xuất các quần đàn đơn giới tính toàn cái của giáp xác mười chân, các con cái WW tạo ra (25% của

mỗi một thế hệ con) được phân lập dựa vào đánh giá kiểu gen. Cho tới hiện tại, con đực làm bản sao chọn giống để nội lai với con cái đồng giao tử WW trong khi bảo tồn được tính trạng mong muốn ở 100% thế hệ con (tức là, đồng giao tử WW) vẫn chưa được tạo ra.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến giáp xác mười chân đồng giao tử WW.

Theo phương án khác, sáng chế còn đề cập đến giáp xác mười chân đồng giao tử WW đực hoặc đực giả.

Theo phương án khác, sáng chế còn đề cập đến phương pháp để thu được thế hệ con toàn cái, bao gồm bước tiến hành giao phối giáp xác mười chân WW với giáp xác mười chân khác. Theo phương án khác, sáng chế còn đề cập đến phương pháp để thu được thế hệ con toàn cái đồng giao tử WW.

Theo phương án khác, sáng chế còn đề cập đến phương pháp để thu được thế hệ con toàn cái, bao gồm bước tiến hành giao phối giáp xác mười chân cái WW với giáp xác mười chân đực giả WZ.

Theo phương án khác, sáng chế còn đề cập đến phương pháp để thu được thế hệ con toàn cái, bao gồm bước lai giáp xác mười chân đực giả WW với giáp xác mười chân cái WW. Theo phương án khác, sáng chế còn đề cập đến bể nước chứa con đực giả WW và con cái WW.

Theo phương án khác, sáng chế còn đề cập đến phương pháp để thu được giáp xác mười chân đực giả WW, bao gồm bước tiêm vào giáp xác mười chân chứa các nhiễm sắc thể giới tính WW và hậu ấu trùng dưới 180 ngày tuổi, hợp phần bao gồm ít nhất 1×10^2 tế bào đơn độc xuất phát từ tuyến androgen (AG) của giáp xác mười chân, bằng cách đó thu được giáp xác mười chân đực giả WW. Theo phương án khác, tuyến androgen (AG) là tuyến androgen phì đại.

Theo phương án khác, sáng chế còn đề cập đến giáp xác mười chân cái thu được bằng phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp này. Theo phương án khác, sáng chế còn đề cập đến giáp xác mười chân cái WW thu được bằng phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp này.

Theo phương án khác, sáng chế còn đề cập đến thế hệ con toàn cái thu được bằng phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp này.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1: Hình vẽ trình bày ở dạng sơ đồ về phương thức hai pha để sản xuất hàng loạt quần đàn toàn cái. ♀ - là con cái và ♂ - là con đực. Các chữ W và Z được sử dụng để minh họa mẫu xác định giới tính dựa vào nhiễm sắc thể. WZ và WW là con cái hoặc con đực giả (tức là, con cái chuyển ngược giới tính) và ZZ là các con đực. Ký hiệu × mô tả chọn giống và các mũi tên chỉ vào thế hệ con của mỗi lần lai. Tỷ lệ (%) phản ánh các tỷ lệ trong mỗi một thế hệ con so sánh con đực với con cái hoặc các con cái tự nhiên (WZ) với các con cái đồng giao tử (WW). Biểu tượng bơm tiêm để chỉ việc sử dụng huyền phù nuôi cấy tế bào tuyến androgen phân ly bằng enzym. Phase 1 để chỉ việc sản xuất con đực giả

WZ và lai nó với con cái WZ để thu được 25% con cái WW. Sau đó, con cái WW được lai với các con đực tự nhiên ZZ để thu được các quần đàn toàn cái WZ. Phase 2 để chỉ việc xử lý con cái WW để tạo ra các con đực giả WW và nội lai con đực giả này với con cái WW để sản xuất hàng loạt các quần đàn toàn cái WW 100%.

Fig. 2: Ảnh hiển vi về so sánh mô học của tuyến androgen nguyên vẹn và phì đại của tôm càng xanh. (A) Các phần của tuyến androgen nguyên vẹn (AG) và (B) tuyến androgen phì đại mà được nhuộm màu sử dụng hematoxylin và eosin và được quan sát dưới kính hiển vi ánh sáng. Vị trí của tuyến androgen được chỉ rõ (mũi tên). Ống dẫn tinh (Sperm Duct - SD). Khung tỷ lệ biểu thị 50 μm .

Fig. 3: Ảnh hiển vi của môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp tuyến androgen phì đại phân ly bằng enzym trong huyền phù từ *Tôm càng xanh* theo thời gian. Các tế bào tuyến androgen được ghi chép (A) 2 ngày và (B) 6 ngày sau khi được cấy sử dụng kính hiển vi ánh sáng nghịch đảo. Vị trí của các tế bào tuyến androgen trong nuôi cấy được chỉ rõ (mũi tên). Khung tỷ lệ = 500 μm (A) và 100 μm (B).

Fig. 4: Ảnh hiển vi thể hiện việc bơm môi trường nuôi cấy tế bào tuyến androgen sơ cấp phì đại phân ly bằng enzym trong huyền phù sử dụng thiết bị tiêm micro vào hậu ấu trùng tôm càng xanh cái. (A) Hậu ấu trùng trước tiên được giữ trên bề mặt plastixin trước khi (B) đặt dưới thị kính hiển vi để vận hành thiết bị tiêm micro. (C) Luồn mao quản thủy tinh (được nhấn rõ bằng hình

tròn) của thiết bị tiêm micro (phía trên của ảnh) trong bước tiêm huyền phù tế bào.

Fig. 5: Ảnh hiển vi thể hiện các đặc tính giới tính phụ bên ngoài ở tôm càng xanh. (A) Ảnh con đực (♂) và hai con cái (♀) - nguồn: Eudes Correia. (B) Các hình ảnh hiển vi vi phẫu của chân bơi thứ hai của tôm càng xanh đực (ảnh trên) và cái (ảnh dưới). Chân bơi đực chứa cả nhánh phụ đực (*Appendix masculina*) (mũi tên trắng) và phần phụ trong (*appendix interna*) (mũi tên đen) (trong khi chân bơi cái chỉ chứa duy nhất phần phụ trong).

Fig. 6: Ảnh gel hiển vi thể hiện sự xác định giới tính di truyền của các hậu ấu trùng đực giả WZ. Để phân biệt các con đực không phân biệt rõ ràng về mặt hình thể với các con đực giả, tất cả các hậu ấu trùng đại diện mà được can thiệp bằng cách tiêm và khảo sát về sự phát triển (✓) hoặc không phát triển (✗) nhánh phụ đực (*AM*) và các lỗ sinh sản đực, được khảo sát về di truyền sử dụng trình tự ADN đặc hiệu cái. Trình tự này được khuếch đại bằng phương pháp PCR và được tách thông qua gel agarosa 2% nhuộm bằng ethidi bromua và được quan sát sử dụng UV (panen phía trên). *Mr β-actin* dùng làm đối chứng dương của PCR, đảm bảo sự có mặt của ADN trong mỗi một mẫu (panen phía dưới). ADN của tôm càng xanh cái (♀) và nước lần lượt được dùng làm đối chứng dương và âm (NC).

Fig. 7: Ảnh hiển vi thể hiện tôm càng xanh đực giả WZ phát triển các đặc trưng giới tính đực chuẩn. Tiêm liều đơn huyền phù tế bào tuyến androgen gây ra sự phát triển các đặc trưng giới tính đặc hiệu giới hạn ở tôm càng xanh đực:

nhánh phụ đực ở chân bơi thứ hai (mũi tên màu trắng) và các lỗ sinh sản ở đế chân của các chân ngực thứ năm (mũi tên). Về hình thể, các con đực (cột trái) và các con đực giả (cột giữa) là không thể phân biệt được với nhau. Các con cái chỉ mang phần phụ trong (mũi tên đen) và không phát triển các lỗ sinh sản ở đế của các chân ngực thứ năm (cột phải).

Fig. 8: Ảnh hiển vi thể hiện tôm càng xanh đực giả WZ đạt được sự biệt hóa kiểu hình đực đầy đủ. Các con đực giả phát sinh từ huyền phù tế bào tuyến androgen đơn đã phát triển suốt quá trình biệt hóa kiểu hình bình thường và phát triển thành tôm càng xanh trưởng thành đầy đủ, khi được xác định theo hệ thống xác định thông thường được phát triển bởi tác giả Kuris *et al.*, (1987). Đốt bàn của con đực giả (càng) phát triển dài tới gần hai lần phần vỏ cứng (lần lượt 70 mm so với 37 mm). Mô tinh hoàn lớn cũng được quan sát khi phẫu tích (phần tách rời).

Fig. 9: Ảnh hiển vi thể hiện tôm càng xanh đực giả WZ thể hiện sự phát triển tuyến sinh dục đực đầy đủ. Các phần cắt ngang mô được nhuộm Hematoxylin và Eosin cho thấy (A) ống dẫn tinh đầy tinh trùng cùng với (B) các thùy tinh hoàn hoạt động mạnh. Ở phần thùy tinh hoàn, các vùng mật độ cao (phân chia) - và nhẹ (thành thực) được quan sát thấy. (C) Tinh trùng bên trong ống dẫn tinh thể hiện hình thể dạng chiếc ô đảo ngược đặc trưng của tinh trùng trưởng thành *Mr* thực sự. (D) Các tế bào tinh nguyên bào tròn lớn (Sg) được nhuộm đậm và được phát hiện nằm ở ngoại vi của thùy đối diện với tinh trùng (Sz) mà chúng được nhuộm nhạt và điều tiết phần lớn thể tích thể tích thùy, như

trong trường hợp tôm càng xanh đực sinh sản giới tính. Bar = 250 μm (A và B) và 50 μm (C và D). Các trường xác định trong các khung ở A và B được phóng to và lần lượt được ghi là C và D.

Fig. 10: Thử nghiệm thể hệ con phân tử của con đực giả WZ được lai với con cái tự nhiên: Ảnh gel hiển vi thể hiện sự xác định giới tính di truyền của các hậu ấu trùng lựa chọn từ thể hệ con của con đực giả được lai với con cái tự nhiên. Để phân biệt các con đực không phân biệt rõ ràng về mặt hình thể với các con cái (ở độ tuổi sớm của hậu ấu trùng PL₂₀), tất cả các cái thể đại diện được khảo sát về di truyền sử dụng chỉ thị giới tính ADN đặc hiệu kép W và Z. Các chỉ thị giới tính này được khuếch đại bằng PCR đa môi và được tách thông qua gel agarosa 2% nhuộm bằng ethidi bromua và được quan sát sử dụng UV.

Fig. 11: Biểu đồ dạng bánh thể hiện sự phân bố kiểu gen của thể hệ con con đực giả WZ $\times$ con cái tự nhiên. Các kiểu gen về giới tính di truyền của các hậu ấu trùng từ thể hệ con của con đực giả và con cái tự nhiên được xác định sử dụng các chỉ thị giới tính phân tử mà dựa vào các chỉ thị này, những sự phân bố cuối cùng được tính toán. (A) Sự phân bố tổng cộng 865 hậu ấu trùng dựa vào duy nhất chỉ thị giới tính đặc hiệu Z lộ xuất rằng, xấp xỉ ba phần tư (3/4) thể hệ con (77%) được bao gồm bởi con cái WZ và con đực ZZ. Các hậu ấu trùng còn lại (23%) là con cái WW. (B) Nhóm đại diện gồm 174 hậu ấu trùng được lấy mẫu (từ 865 hậu ấu trùng) và được phân tích về di truyền sử dụng cả hai chỉ thị giới tính đặc hiệu W và Z. Việc xác định giới tính do kiểu gen cuối cùng chỉ ra

rằng, các con cái WW và con đực ZZ là theo tỷ lệ 1:1 (24,1% mỗi loại) và cả hai ở tỷ lệ xấp xỉ 1:2,1 với con cái WZ tự nhiên (51,8%).

Fig. 12: Thử nghiệm thể hệ con phân tử của con cái WW được lai với con đực ZZ tự nhiên dẫn tới sự gia tăng quần đàn toàn cái WZ: Ảnh gel hiển vi thể hiện sự xác định giới tính di truyền của các hậu ấu trùng lựa chọn từ thể hệ con toàn cái của con cái WW được lai với con đực ZZ tự nhiên. Toàn bộ các cá thể đại diện được khảo sát về di truyền sử dụng chỉ thị giới tính ADN đặc hiệu kép W và Z. Các chỉ thị này được khuếch đại bằng PCR đa môi và được tách thông qua gel agarosa 2% nhuộm bằng ethidi bromua và được quan sát sử dụng UV.

Fig. 13: Ảnh hiển vi thể hiện tôm càng xanh đực giả WW đạt được sự biệt hóa kiểu hình đực đầy đủ. Các con đực giả phát sinh từ huyền phù tế bào tuyến androgen đơn đã phát triển trong toàn bộ quá trình biệt hóa kiểu hình tự nhiên từ các con đực nhỏ (SM) – tôm càng da cam (OC) thành tôm càng xanh trưởng thành hoàn toàn (BC), khi được xác định theo hệ thống xác định thông thường được phát triển bởi tác giả Kuris *et al.*, (1987) (A). Các con đực giả WW đại diện được khảo sát về di truyền sử dụng chỉ thị giới tính ADN đặc hiệu kép W và Z. Chỉ thị này được khuếch đại bằng phương pháp PCR đa môi và được tách thông qua gel agarosa 2% nhuộm bằng ethidi bromua và được quan sát sử dụng UV. Khung tỷ lệ = 5 cm (B).

Fig. 14: Ảnh hiển vi thể hiện tôm càng xanh đực giả WW phát triển các đặc trưng giới tính đực chuẩn. Việc tiêm liều đơn huyền phù tế bào tuyến androgen dẫn đến sự phát triển các đặc trưng giới tính đặc hiệu giới hạn ở tôm

càng xanh đực: nhánh phụ đực ở chân bơi thứ hai (mũi tên màu trắng) và các lỗ sinh sản ở các các đế chân của chân ngực thứ 5 (mũi tên). Về hình thể, các con đực (cột trái) và các con đực giả (cột giữa) là không thể phân biệt được với nhau. Các con cái chỉ mang duy nhất phần phụ trong (mũi tên đen) và không phát triển các lỗ sinh sản ở đế chân của các chân ngực thứ 5 (cột phải).

Fig. 15: Ảnh hiển vi thể hiện tôm càng xanh đực giả WW đạt được sự phát triển tính đực. Các con đực giả phát sinh từ huyền phù tế bào tuyến androgen đơn đã thể hiện sự phát triển tuyến sinh dục đầy đủ xuất phát bởi mô tinh hoàn (A, đóng khung). Các phần tiết diện ngang mô học được nhuộm Hematoxylin và Eosin lộ xuất (B) các thùy tinh hoàn hoạt động. Ở thùy tinh hoàn hoạt động này, cả vùng phân chia và vùng trưởng thành đều được quan sát thấy. (C) Các tế bào tinh nguyên bào lớn hình tròn (Sg) được nhuộm đậm và được phát hiện định vị ở phần ngoại vi của thùy đối diện với tinh trùng (Sz) mà chúng được nhuộm nhạt và chứa phần lớn thể tích của thùy, như trong trường hợp ở tôm càng xanh đực sinh sản sinh dục. Bar = 1 cm (A), 250 μ m (B) và 50 μ m (C). Trường xác định trong khung ở B được phóng đại và ghi là C.

Fig. 16: Thử nghiệm thể hệ con phân tử của con đực giả WW được lai với con cái WW dẫn đến gia tăng quần toàn cái WW: Ảnh gel hiển vi thể hiện sự xác định giới tính di truyền của các hậu ấu trùng lựa chọn từ thể hệ con toàn cái WW của con đực giả WW được lai với con cái WW. Toàn bộ các cá thể đại diện được khảo sát về di truyền sử dụng chỉ thị giới tính ADN đặc hiệu kép W và Z. Chỉ thị giới tính này được khuếch đại bằng kỹ thuật PCR đa môi và được tách

thông qua gel agarosa 2% nhuộm bằng ethidi bromua và được quan sát sử dụng UV.

Mô tả chi tiết sáng chế

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến giáp xác mười chân WW. Theo một phương án, giáp xác mười chân là tôm Penaeid. Theo một phương án, giáp xác mười chân là tôm nước ngọt. Theo một phương án, giáp xác mười chân là giống *Macrobrachium*. Theo phương án khác, giáp xác mười chân là tôm càng xanh (*Macrobrachium rosenbergii*).

Theo phương án khác, giáp xác mười chân đồng giao tử WW là con đực. Theo phương án khác, giáp xác mười chân đồng giao tử WW là con cái. Theo phương án khác, giáp xác mười chân đồng giao tử WW là con đực giả.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến phương pháp để thu được thế hệ con toàn cái, bao gồm bước tiến hành giao phối giáp xác mười chân WW với giáp xác mười chân khác. Theo phương án khác, thế hệ con toàn cái là thế hệ con mà bao gồm 100% con cái WW. Theo phương án khác, thế hệ con toàn cái là thế hệ con mà bao gồm 100% con cái WW mà toàn bộ trong số đó hoàn toàn đều là chị em. Theo phương án khác, thế hệ con toàn cái là thế hệ con mà bao gồm 100% con cái WW mà toàn bộ trong số đó đều có cha mẹ chung. Theo phương án khác, thế hệ con toàn cái là thế hệ con mà bao gồm 100% con cái WW, toàn bộ trong số này có bố mẹ mà trong đó bên bố và bên mẹ đều là WW. Theo phương án khác, thế hệ con toàn cái là thế hệ con không có con đực. Theo

phương án khác, thể hệ con toàn cái là thể hệ con bao gồm ít nhất 500 con cái. Theo phương án khác, thể hệ con toàn cái là thể hệ con bao gồm ít nhất 1000 con cái. Theo phương án khác, thể hệ con toàn cái là thể hệ con bao gồm ít nhất 3000 con cái. Theo phương án khác, thể hệ con toàn cái là thể hệ con bao gồm ít nhất 5000 con cái. Theo phương án khác, thể hệ con toàn cái là thể hệ con bao gồm ít nhất 10000 con cái. Theo phương án khác, thể hệ con toàn cái là thể hệ con bao gồm ít nhất 25000 con cái. Theo phương án khác, thể hệ con toàn cái là thể hệ con bao gồm ít nhất 50000 con cái. Theo phương án khác, thể hệ con toàn cái là thể hệ con bao gồm ít nhất 100000 con cái. Theo phương án khác, thể hệ con toàn cái là thể hệ con bao gồm ít nhất 150000 con cái. Theo phương án khác, con cái bao gồm các nhiễm sắc thể giới tính cái. Theo phương án khác, con cái bao gồm buồng trứng và ống dẫn trứng. Theo phương án khác, con cái tạo ra trứng.

Theo một phương án, phương pháp để thu được thể hệ con toàn cái là phương pháp để thu được giáp xác mười chân cái chỉ mang các phôi cái. Theo một phương án, "phôi cái" là trứng đã thụ tinh chỉ chứa các nhiễm sắc thể giới tính cái. Theo một phương án, "phôi cái" bao gồm trứng đã thụ tinh chứa nhiễm sắc thể giới tính cái.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến giáp xác mười chân cái chỉ mang các phôi cái. Theo một phương án, sáng chế đề cập đến giáp xác mười chân cái chỉ mang các phôi mà chứa nhiễm sắc thể giới tính cái.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến bể nước chứa giáp xác mười chân đực và giáp xác mười chân cái, trong đó con đực là con đực giả WW và con cái là con cái WW. Theo một phương án, bể nước không có giáp xác mười chân đực hoặc giáp xác mười chân cái có các nhiễm sắc thể giới tính khác với WW.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến phương pháp để thu được thể hệ con toàn cái, bao gồm bước tiến hành giao phối giáp xác mười chân cái WW với giáp xác mười chân đực giả WZ. Theo một phương án, sáng chế đề cập đến phương pháp để thu được thể hệ con toàn cái WW, bao gồm bước tiến hành giao phối giáp xác mười chân đực giả WW với giáp xác mười chân cái WW. Theo một phương án, sáng chế đề cập đến phương pháp để thu được thể hệ con toàn cái, bao gồm bước tiến hành giao phối giáp xác mười chân đực giả WW với giáp xác mười chân cái WZ. Theo một phương án, sáng chế đề cập đến phương pháp để thu được giáp xác mười chân đực giả WW, bao gồm bước tiêm vào giáp xác mười chân chứa các nhiễm sắc thể giới tính WW và hậu ấu trùng ít hơn 180 ngày tuổi, hợp phần bao gồm ít nhất 1×10^2 tế bào đơn độc dẫn xuất từ tuyến androgen (AG) của giáp xác mười chân, bằng cách đó thu được giáp xác mười chân đực giả WW. Theo phương án khác, thao tác tiêm là tiêm vào trong mô cơ của đoạn bụng. Theo phương án khác, tuyến androgen của giáp xác mười chân là tuyến androgen phì đại của giáp xác mười chân.

Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến thể hệ con của quá trình lai giữa giáp xác mười chân WW và giáp xác mười chân khác. Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến giáp xác mười chân khác mà nó là giáp xác mười chân có các nhiễm sắc thể giới tính tự nhiên (xuất hiện một cách tự nhiên trong tự nhiên). Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến giáp xác mười chân khác mà nó là giáp xác mười chân kiểu hoang dại. Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến giáp xác mười chân khác mà nó là giáp xác mười chân được can thiệp theo phương pháp được mô tả ở đây như con đực giả. Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến giáp xác mười chân khác mà nó là thể hệ con của giáp xác mười chân được can thiệp theo phương pháp được mô tả ở đây. Theo phương án khác, giáp xác mười chân WW là con đực hoặc con đực giả. Theo phương án khác, giáp xác mười chân WW là con cái. Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến giáp xác mười chân cái thu được bằng phương pháp như được mô tả ở đây. Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến giáp xác mười chân đực giả xuất phát từ con cái WW thu được bằng phương pháp như được mô tả ở đây.

Theo phương án khác, các con đực giả được tạo ra bằng cách can thiệp thể hệ con phát sinh từ việc lai con đực thành thực sinh dục (ZZ) và con cái thành thực sinh dục (WZ) của giáp xác mười chân (phép lai P). Theo phương án khác, thể hệ con của quá trình lai con đực (ZZ) và con cái (WZ) là hậu ấu trùng (PL) bao gồm khoảng 50% con đực và khoảng 50% con cái (thể hệ con của quá trình lai P).

Theo phương án khác, trước PL_{120} , các ấu trùng cái nhận dạng phát sinh từ thế hệ con của quá trình lai P được can thiệp bằng cách tiêm hợp phần chứa các tế bào như được mô tả ở đây để thu được các con đực giả WZ. Theo phương án khác, con đực giả WZ thành thực sinh dục được lai với con cái kiểu hoang dại hoặc con cái WZ (lai F1). Theo phương án khác, thế hệ con của quá trình lai F1 này tạo ra tỷ lệ giới tính cái trên đực khoảng 3:1. Theo phương án khác, thế hệ con đực ZZ của quá trình lai F1 này được loại trừ và khoảng 33% của thế hệ con cái còn lại của quá trình lai F1 này là con cái WW. Theo phương án khác, sử dụng chỉ thị giới tính ADN đặc hiệu W, thế hệ con đực ZZ của quá trình lai F1 này được loại trừ và khoảng 33% trong số thế hệ con cái của quá trình lai F1 này được nhận dạng là WW bằng cách sử dụng sàng lọc âm dựa vào chỉ thị giới tính ADN đặc hiệu Z.

Theo phương án khác, các hậu ấu trùng WW (con cái di truyền) của F2 được can thiệp thêm trước PL_{120} bằng cách tiêm hợp phần chứa các tế bào như được mô tả ở đây để thu được các con đực giả WW. Theo phương án khác, các con đực giả WW được sinh trưởng cho tới khi các đặc trưng sinh dục phụ đặc hiệu đực như *AM* và các lỗ sinh sản ở đực của các chân đi thứ năm được xác nhận.

Theo phương án khác, sáng chế còn đề cập đến bước lai con cái WW và con đực giả WW. Theo phương án khác, sáng chế còn đề cập đến phương pháp để thu được nhiều thế hệ của thế hệ con toàn cái bằng cách lai con cái WW và

con đực giả WW. Theo phương án khác, thể hệ con toàn cái là thể hệ con bao gồm 100% con cái. Theo phương án khác, sáng chế còn đề cập đến phương pháp để thu được thể hệ con toàn cái bằng cách lai giáp xác mười chân WW với giáp xác mười chân khác hoặc con đực giả WZ. Theo phương án khác, sáng chế còn đề cập đến phương pháp để thu được thể hệ con toàn cái bằng cách lai giáp xác mười chân cái WW với giáp xác mười chân khác. Theo phương án khác, sáng chế còn đề cập đến phương pháp để thu được thể hệ con toàn cái bằng cách lai giáp xác mười chân đực giả WW với con cái tự nhiên hoặc giáp xác mười chân cái WZ. Theo phương án khác, tự nhiên là kiểu hoang dại.

Theo phương án khác, sáng chế còn đề cập đến phương pháp để thu được thể hệ con toàn cái bằng cách lai giáp xác mười chân cái WW với giáp xác mười chân đực ZZ.

Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến các tế bào theo sáng chế thu được từ môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp. Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp bao gồm: môi trường nuôi cấy tế bào và các tế bào có nguồn gốc từ tuyến androgen (AG) của giáp xác mười chân. Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp bao gồm: môi trường nuôi cấy tế bào và các tế bào có nguồn gốc từ tuyến androgen phì đại (AG) của giáp xác mười chân. Theo phương án khác, “môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp” là tế bào nuôi cấy dẫn xuất từ tuyến androgen. Theo phương án khác, “môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp” theo sáng chế không

bao gồm các tế bào bất tử. Theo phương án khác, “môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp” theo sáng chế không bao gồm các tế bào chuyển dạng. Theo phương án khác, “môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp” theo sáng chế không bao gồm các tế bào hình thành khối u. Theo phương án khác, hợp phần theo sáng chế bao gồm “môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp”. Theo phương án minh họa, sáng chế đề cập đến giáp xác mười chân mà giáp xác này là tôm càng xanh (*Macrobrachium rosenbergii*).

Theo phương án khác, ít nhất 50% số tế bào trong môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp là tế bào đơn độc. Theo phương án khác, ít nhất 60% số tế bào trong môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp là tế bào đơn độc. Theo phương án khác, ít nhất 70% số tế bào trong môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp là tế bào đơn độc. Theo phương án khác, ít nhất 80% số tế bào trong môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp là tế bào đơn độc. Theo phương án khác, ít nhất 90% số tế bào trong môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp là tế bào đơn độc. Theo phương án khác, ít nhất 95% số tế bào trong môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp là tế bào đơn độc. Theo phương án khác, các tế bào bên trong “môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp” bao gồm hoặc gồm tế bào tuyến androgen phân ly bằng enzym (hoặc tế bào đơn độc). Theo phương án khác, môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp theo sáng chế được sử dụng cho phương pháp tạo ra giáp xác mười chân đực giả thiết thực và thành công bất ngờ (con đực tạo ra các giao tử W và Z hoặc con đực chỉ tạo ra các giao tử W). Theo phương án khác, việc tiêm hợp phần theo sáng chế vào

trong giáp xác mười chân cái hậu ấu trùng dẫn tới sự đảo ngược giới tính. Theo phương án khác, việc tiêm hợp phần theo sáng chế vào trong giáp xác mười chân cái WW hoặc WZ hậu ấu trùng dẫn tới sự đảo ngược giới tính. Theo phương án khác, việc tiêm hợp phần theo sáng chế bao gồm các tế bào là các tế bào cấy ghép như được mô tả ở đây. Theo phương án khác, việc tiêm hợp phần theo sáng chế bao gồm các tế bào là tế bào đơn độc cấy ghép. Theo phương án khác, nguồn các tế bào được mô tả ở đây và giáp xác mười chân cần được xử lý bằng các tế bào được mô tả ở đây là cùng loài. Theo phương án khác, giáp xác mười chân cái hậu ấu trùng (có thành phần các nhiễm sắc thể cái) mà đã trải qua sự chuyển ngược giới tính thành con đực có chức năng sinh dục – gọi là “con đực giả” là có tính quyết định cho việc sản xuất thế hệ con hoặc môi trường nuôi cấy đơn giới tính toàn cái sau đó.

Theo phương án khác, con đực giả là sinh vật mang tổ hợp nhiễm sắc thể giới tính của con cái (WZ hoặc WW) và khả năng sinh dục để sinh sản như là con đực. Theo phương án khác, con đực giả là sinh vật mang tổ hợp nhiễm sắc thể giới tính của con cái (WZ hoặc WW) và các cơ quan sinh sản có chức năng đực. Theo phương án khác, con đực giả là sinh vật mang tổ hợp nhiễm sắc thể giới tính của con cái (WZ hoặc WW) và các cơ quan sinh dục có chức năng đực. Theo phương án khác, con đực giả chỉ tạo ra duy nhất các giao tử W. Theo phương án khác, con đực giả tạo ra các giao tử W và Z. Theo phương án khác, con đực giả là sinh vật mang tổ hợp nhiễm sắc thể giới tính của con cái (WZ

hoặc WW) mà: (a) được can thiệp bằng các tế bào theo sáng chế; và (b) khi thành thực sinh dục có khả năng sinh dục để sinh sản như là con đực.

Theo phương án khác, ít nhất 40% con cái di truyền trải qua tiêm/cấy ghép tế bào như được mô tả ở đây vẫn sống sau phương thức này. Theo phương án khác, ít nhất 50% con cái di truyền trải qua tiêm/cấy ghép tế bào như được mô tả ở đây vẫn sống sau phương thức này. Theo phương án khác, ít nhất 60% con cái di truyền trải qua tiêm/cấy ghép tế bào như được mô tả ở đây vẫn sống sau phương thức này. Theo phương án khác, ít nhất 70% con cái di truyền trải qua tiêm/cấy ghép tế bào như được mô tả ở đây vẫn sống sau phương thức này. Theo phương án khác, ít nhất 75% con cái di truyền trải qua tiêm/cấy ghép tế bào như được mô tả ở đây vẫn sống sau phương thức này. Theo phương án khác, ít nhất 80% con cái di truyền trải qua tiêm/cấy ghép tế bào như được mô tả ở đây vẫn sống sau phương thức này. Theo phương án khác, theo thực nghiệm này, 80% con cái di truyền trải qua tiêm/cấy ghép tế bào như được mô tả ở đây vẫn sống sau phương thức này (dữ liệu không được thể hiện). Theo phương án khác, theo thực nghiệm này, 90% con cái di truyền trải qua tiêm/cấy ghép tế bào như được mô tả ở đây vẫn sống sau phương thức này (dữ liệu không được thể hiện). Theo phương án khác, cấy ghép theo sáng chế là phương pháp dị ghép.

Theo phương án khác, ít nhất 40% đến 90% con cái di truyền trải qua tiêm/cấy ghép tế bào như được mô tả ở đây vẫn sống sau phương thức này. Theo phương án khác, ít nhất 50% đến 80% con cái di truyền trải qua tiêm/cấy ghép tế

bào như được mô tả ở đây vẫn sống sau phương thức này. Theo phương án khác, ít nhất 60% đến 80% con cái di truyền trải qua tiêm/cấy ghép tế bào như được mô tả ở đây vẫn sống sau phương thức này. Theo phương án khác, ít nhất 80% con cái di truyền trải qua tiêm/cấy ghép tế bào như được mô tả ở đây vẫn sống sau phương thức này. Theo phương án khác, ít nhất 85% con cái di truyền trải qua tiêm/cấy ghép tế bào như được mô tả ở đây vẫn sống sau phương thức này. Theo phương án khác, ít nhất 90% con cái di truyền trải qua tiêm/cấy ghép tế bào như được mô tả ở đây vẫn sống sau phương thức này. Theo phương án khác, 80% đến 95% con cái di truyền trải qua tiêm/cấy ghép tế bào như được mô tả ở đây vẫn sống sau phương thức này. Theo phương án khác, ít nhất 20% con cái di truyền sống sót trải qua tiêm/cấy ghép tế bào như được mô tả ở đây phát triển thành con đực giả. Theo phương án khác, ít nhất 30% con cái di truyền sống sót trải qua tiêm/cấy ghép tế bào như được mô tả ở đây phát triển thành con đực giả. Theo phương án khác, ít nhất 45% con cái di truyền sống sót trải qua tiêm/cấy ghép tế bào như được mô tả ở đây phát triển thành con đực giả. Theo phương án khác, ít nhất 50% con cái di truyền sống sót trải qua tiêm/cấy ghép tế bào như được mô tả ở đây phát triển thành con đực giả. Theo phương án khác, ít nhất 60% con cái di truyền sống sót trải qua tiêm/cấy ghép tế bào như được mô tả ở đây phát triển thành con đực giả. Theo phương án khác, ít nhất 70% con cái di truyền sống sót trải qua tiêm/cấy ghép tế bào như được mô tả ở đây phát triển thành con đực giả. Theo phương án khác, ít nhất 80% con cái di truyền sống sót trải qua tiêm/cấy ghép tế bào như được mô tả ở đây phát triển thành con đực giả.

Theo phương án khác, ít nhất 25% con cái di truyền trải qua tiêm/cấy ghép tế bào như được mô tả ở đây phát triển thành con đực giả. Theo phương án khác, “con đực giả” là con cái di truyền có khả năng thụ tinh trứng. Theo phương án khác, “con đực giả” là con cái di truyền có và/hoặc tạo ra các tế bào tinh trùng. Theo phương án khác, “con đực” bao gồm cả “con đực giả”. Theo phương án khác, “con đực giả” là con cái di truyền có/sản xuất ra tinh nguyên bào. Theo phương án khác, “con đực giả” là con cái di truyền có/sản xuất ra tinh trùng. Theo phương án khác, “con đực giả” là con cái di truyền có các tế bào tinh trùng, trong đó các tế bào tinh trùng có khả năng thụ tinh trứng. Theo phương án khác, có khả năng thụ tinh trứng nghĩa là có khả năng giao phối với giáp xác mười chân cái như được mô tả ở đây. Theo phương án khác, “con đực giả” là con cái di truyền có khả năng thụ tinh trứng khi thành thực sinh dục vào trong con đực. Theo phương án khác, “con đực giả” là con cái di truyền bao gồm nhánh phụ đực. Theo phương án khác, “con đực giả” là con cái di truyền bao gồm ít nhất một lỗ sinh sản đực. Theo phương án khác, “con đực giả” là con cái di truyền bao gồm tuyến sinh dục đực hoạt động về mặt chức năng (tức là, tinh hoàn). Theo phương án khác, “con đực giả” là con cái di truyền bao gồm nhánh phụ đực (*AM*), ít nhất một lỗ sinh sản đực, tuyến sinh dục đực và có khả năng thụ tinh trứng khi thành thực sinh dục. Theo phương án khác, ít nhất 30% con cái di truyền trải qua tiêm/cấy ghép tế bào như được mô tả ở đây phát triển thành con đực giả. Theo phương án khác, ít nhất 35% con cái di truyền trải qua tiêm/cấy ghép tế bào như được mô tả ở đây phát triển thành con đực giả. Theo

phương án khác, ít nhất 40% con cái di truyền trái qua tiêm/cấy ghép tế bào như được mô tả ở đây phát triển thành con đực giả. Theo phương án khác, ít nhất 45% con cái di truyền trái qua tiêm/cấy ghép tế bào như được mô tả ở đây phát triển thành con đực giả. Theo phương án khác, ít nhất 50% con cái di truyền trái qua tiêm/cấy ghép tế bào như được mô tả ở đây phát triển thành con đực giả. Theo phương án khác, ít nhất 60% con cái di truyền trái qua tiêm/cấy ghép tế bào như được mô tả ở đây phát triển thành con đực giả. Theo phương án khác, ít nhất 70% con cái di truyền trái qua tiêm/cấy ghép tế bào như được mô tả ở đây phát triển thành con đực giả. Theo phương án khác, ít nhất 80% con cái di truyền trái qua tiêm/cấy ghép tế bào như được mô tả ở đây phát triển thành con đực giả. Theo phương án khác, ít nhất 90% con cái di truyền trái qua tiêm/cấy ghép tế bào như được mô tả ở đây phát triển thành con đực giả.

Theo phương án khác, 25% đến 90% con cái di truyền trái qua tiêm/cấy ghép tế bào như được mô tả ở đây phát triển thành con đực giả. Theo phương án khác, 25% đến 60% con cái di truyền trái qua tiêm/cấy ghép tế bào như được mô tả ở đây phát triển thành con đực giả. Theo phương án khác, 25% đến 50% con cái di truyền trái qua tiêm/cấy ghép tế bào như được mô tả ở đây phát triển thành con đực giả.

Theo phương án khác, cho con đực giả giao phối với con cái tự nhiên (như kiểu hoang dại) sinh ra thế hệ con bao gồm ít nhất 500 con cái WW riêng biệt. Theo phương án khác, cho con đực giả giao phối với con cái tự nhiên sinh

ra thể hệ con bao gồm ít nhất 600 con cái WW riêng biệt. Theo phương án khác, cho con đực giả giao phối với con cái tự nhiên sinh ra thể hệ con bao gồm ít nhất 700 con cái WW riêng biệt. Theo phương án khác, cho con đực giả giao phối với con cái tự nhiên sinh ra thể hệ con bao gồm ít nhất 800 con cái WW riêng biệt. Theo phương án khác, cho con đực giả giao phối với con cái tự nhiên sinh ra thể hệ con bao gồm ít nhất 900 con cái WW riêng biệt. Theo phương án khác, cho con đực giả giao phối với con cái tự nhiên sinh ra thể hệ con bao gồm ít nhất 1000 con cái WW riêng biệt. Theo phương án khác, cho con đực giả giao phối với con cái tự nhiên sinh ra thể hệ con bao gồm 150 đến 1,500 con cái WW riêng biệt. Theo phương án khác, cho con đực giả giao phối với con cái tự nhiên sinh ra thể hệ con bao gồm 200 đến 2000 con cái WW riêng biệt. Theo phương án khác, cho con đực giả giao phối với con cái tự nhiên sinh ra thể hệ con bao gồm 250 đến 2500 con cái WW riêng biệt. Theo phương án khác, số lượng con WW sinh ra được xác định dựa vào lấy nhiều mẫu của nhiều lứa lai (dữ liệu không được thể hiện).

Theo phương án khác, cho con đực giả WW giao phối với con cái WW sinh ra thể hệ con bao gồm 500 đến 5000 con cái WW riêng biệt. Theo phương án khác, cho con đực giả WW giao phối với con cái WW sinh ra thể hệ con bao gồm 1000 đến 10000 con cái WW riêng biệt. Theo phương án khác, cho con đực giả WW giao phối với con cái WW sinh ra thể hệ con bao gồm 2000 đến 50000 con cái WW riêng biệt. Theo phương án khác, cho con đực giả WW giao phối

với con cái WW sinh ra thế hệ con gồm 100% con cái. Theo phương án khác, cho con đực giả WW giao phối với con cái WW sinh ra thế hệ con gồm 100% con cái WW.

Theo phương án khác, cho lai con đực giả WW với con cái tự nhiên sinh ra thế hệ con gồm 100% các con cái. Theo phương án khác, cho lai con đực giả WZ với con cái WW sinh ra thế hệ con gồm 100% các con cái. Theo phương án khác, cho lai con đực ZZ với con cái WW sinh ra thế hệ con gồm 100% các con cái.

Theo phương án khác, "con đực giả" là giáp xác mười chân đực giả. Theo phương án khác, "con đực" là giáp xác mười chân đực. Theo phương án khác, "con cái" là giáp xác mười chân cái.

Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp tạo ra con cái WW. Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp tạo ra con đực giả WW. Theo phương án khác, con cái WW không thể là sản phẩm tự nhiên ở loài trong đó, khả năng chuyển giới tính và/hoặc hiện tượng lưỡng tính xuất hiện không tự nhiên. Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến con cái WW. Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp tạo ra con cái WW bao gồm bước lai con đực giả WZ (con cái chuyển ngược giới tính bằng cách can thiệp) với con cái tự nhiên hoặc con cái WZ. Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến con đực giả WZ là anh em với nhau (các con của phép lai đơn giữa con đực ZZ tự nhiên và con cái WZ - thế hệ P). Theo phương án khác, W hoặc Z để chỉ

nhiễm sắc thể giới tính hoặc giao tử của giáp xác mười chân như được mô tả ở đây. Theo phương án khác, WW, WZ hoặc ZZ để chỉ giới tính do kiểu gen của giáp xác mười chân như được mô tả ở đây.

Theo phương án khác, các con đực giả được tạo ra bằng cách can thiệp thể hệ con phát sinh từ việc lai con đực thành thực sinh dục (ZZ) và con cái thành thực sinh dục (WZ) của giáp xác mười chân (phép lai P). Theo phương án khác, các hậu ấu trùng cái phát sinh từ thể hệ con của phép lai P được cách ly ra khỏi các con đực. Theo phương án khác, các hậu ấu trùng cái phát sinh từ thể hệ con của phép lai P được cách ly ra khỏi các con đực bằng cách xác định giới tính di truyền phân tử sử dụng chỉ thị giới tính ADN đặc hiệu W.

Theo phương án khác, trước PL₁₂₀, các hậu ấu trùng cái nhận dạng phát sinh từ thể hệ con của phép lai P được can thiệp bằng cách tiêm hợp phần chứa các tế bào như được mô tả ở đây để thu được các con đực giả WZ. Theo phương án khác, các con đực giả WZ được sinh trưởng cho tới khi các đặc trưng sinh dục phụ đặc hiệu đực như sự phát triển nhánh phụ đực (AM) và các lỗ sinh sản ở đế của các chân đi thứ năm được xác nhận.

Theo phương án khác, 2 đến 250 anh em ruột có 2 kiểu giao tử, ~50% mang nhiễm sắc thể giới tính W và ~50% mang nhiễm sắc thể giới tính Z của thể hệ F1 được chọn ngẫu nhiên để can thiệp chuyển ngược giới tính. Theo phương án khác, ít nhất khoảng 50% anh em ruột có 2 kiểu giao tử, ~50% mang nhiễm sắc thể giới tính W và ~50% mang nhiễm sắc thể giới tính Z của thể hệ

F1 mà được chọn ngẫu nhiên để can thiệp chuyển ngược giới tính thực sự trưởng thành thành các con đực giả. Theo phương án khác, các con đực giả (anh em) mà đã được sinh trưởng tới khi thành thực sinh dục được lai thêm với các con cái WZ tự nhiên. Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp để thu được con cái WW bao gồm bước lai con đực giả với con cái WZ tự nhiên (thế hệ F2).

Theo phương án khác, 2 đến 150 con cái WW chị em trong quần đàn như được mô tả ở đây được chọn ngẫu nhiên để can thiệp chuyển ngược giới tính và để sinh ra con đực giả WW. Theo phương án khác, ít nhất khoảng 50% con cái WW chị em trong quần đàn mà được chọn ngẫu nhiên để can thiệp chuyển ngược giới tính thực sự trưởng thành thành các con đực giả WW. Theo phương án khác, các con đực giả WW mà đã được sinh trưởng tới khi thành thực sinh dục được lai thêm với các con cái WZ tự nhiên hoặc con cái WW.

Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp để thu được con cái WW bao gồm bước lai con đực giả với con cái WZ tự nhiên (thế hệ F2) và thu được quần đàn với các kiểu gen giới tính kết hợp mà bao gồm cả quần đàn con cái WW. Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp để thu được con đực giả WW bao gồm: (1) lai con đực giả với con cái WZ tự nhiên (thế hệ F2) và thu được quần đàn với các kiểu gen giới tính kết hợp mà bao gồm cả con cái WW; và (2) sử dụng hợp phần chứa các tế bào theo sáng chế theo các

phương pháp tạo ra con đực giả như được bộc lộ ở đây, bằng cách đó tạo ra và/hoặc thu được con đực giả WW.

Theo phương án khác, thế hệ con F2 (thế hệ con của con đực giả và con cái WZ) đã sinh ra ít nhất 500 con cái WW. Theo phương án khác, thế hệ con F2 (thế hệ con của con đực giả và con cái WZ) đã sinh ra ít nhất 700 con cái WW. Theo phương án khác, thế hệ con F2 (thế hệ con của con đực giả và con cái WZ) đã sinh ra ít nhất 900 con cái WW. Theo phương án khác, thế hệ con F2 (thế hệ con của con đực giả và con cái WZ) đã sinh ra ít nhất 1000 con cái WW. Theo phương án khác, thế hệ con F2 (thế hệ con của con đực giả và con cái WZ) đã sinh ra 200 đến 2000 con cái WW. Theo phương án khác, thế hệ con F2 (thế hệ con của con đực giả và con cái WZ) đã sinh ra 250 đến 2500 con cái WW. Theo phương án khác, thế hệ con F2 (thế hệ con của con đực giả và con cái WZ) đã sinh ra ít nhất 1200 con cái WW. Theo phương án khác, ít nhất 5 con cái WW là anh em. Theo phương án khác, các con cái WW cùng lứa được tạo ra từ các phép lai bao gồm 5 con đực giả khác nhau, trong đó các con đực giả là anh em xuất phát từ cùng bố mẹ.

Theo phương án khác, thế hệ con F2 được can thiệp thêm bằng các phương pháp mô tả ở đây để sinh ra con đực giả WW. Theo phương án khác, khoảng 40% đến 80% số con cái WW trải qua can thiệp chuyển ngược giới tính thực sự trưởng thành thành các con đực giả WW sinh sản sinh dục. Theo phương án khác, khoảng 50% đến 60% số con cái WW trải qua can thiệp

chuyển ngược giới tính thực sự trưởng thành thành các con đực giả WW sinh sản sinh dục.

Theo phương án khác, tất cả các tế bào trong môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp là các tế bào có nguồn gốc từ tuyến androgen (AG) của 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 tuyến androgen hoặc "môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp tuyến androgen phì đại". Theo phương án khác, phương pháp tiêm và/hoặc cấy ghép tế bào là phương pháp dị ghép tế bào.

Theo phương án khác, ít nhất 50% số tế bào trong môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp và/hoặc hợp phần như được mô tả ở đây là các tế bào tuyến androgen nội tiết. Theo phương án khác, ít nhất 60% số tế bào trong môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp và/hoặc hợp phần như được mô tả ở đây là các tế bào tuyến androgen nội tiết. Theo phương án khác, ít nhất 65% số tế bào trong môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp và/hoặc hợp phần như được mô tả ở đây là các tế bào tuyến androgen nội tiết. Theo phương án khác, ít nhất 70% số tế bào trong môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp và/hoặc hợp phần như được mô tả ở đây là các tế bào tuyến androgen nội tiết. Theo phương án khác, ít nhất 75% số tế bào trong môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp và/hoặc hợp phần như được mô tả ở đây là các tế bào tuyến androgen nội tiết. Theo phương án khác, ít nhất 80% số tế bào trong môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp và/hoặc hợp phần như được mô tả ở đây là các tế bào tuyến androgen nội tiết. Theo phương án khác, ít nhất 85% số tế bào

bào trong môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp và/hoặc hợp phần như được mô tả ở đây là các tế bào tuyến androgen nội tiết. Theo phương án khác, ít nhất 90% số tế bào trong môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp và/hoặc hợp phần như được mô tả ở đây là các tế bào tuyến androgen nội tiết. Theo phương án khác, ít nhất 95% số tế bào trong môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp và/hoặc hợp phần như được mô tả ở đây là các tế bào tuyến androgen nội tiết. Theo phương án khác, ít nhất 98% số tế bào trong môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp và/hoặc hợp phần như được mô tả ở đây là các tế bào tuyến androgen nội tiết. Theo phương án khác, ít nhất 99% số tế bào trong môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp và/hoặc hợp phần như được mô tả ở đây là các tế bào tuyến androgen nội tiết. Theo phương án khác, các tế bào tuyến androgen nội tiết là các tế bào tuyến androgen nội tiết đơn độc như được mô tả ở đây.

Theo phương án khác, ít nhất 8% số tế bào trong môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp và/hoặc hợp phần như được mô tả ở đây là tế bào đơn độc. Theo phương án khác, ít nhất 10% số tế bào trong môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp và/hoặc hợp phần như được mô tả ở đây là tế bào đơn độc. Theo phương án khác, ít nhất 20% số tế bào trong môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp và/hoặc hợp phần như được mô tả ở đây là tế bào đơn độc. Theo phương án khác, ít nhất 25% số tế bào trong môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp và/hoặc hợp phần như được mô tả ở đây là tế bào đơn độc. Theo phương án khác, ít nhất 30% số tế bào trong môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp và/hoặc hợp phần như được mô tả ở đây

là tế bào đơn độc. Theo phương án khác, ít nhất 35% số tế bào trong môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp và/hoặc hợp phần như được mô tả ở đây là tế bào đơn độc. Theo phương án khác, ít nhất 40% số tế bào trong môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp và/hoặc hợp phần như được mô tả ở đây là tế bào đơn độc. Theo phương án khác, ít nhất 45% số tế bào trong môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp và/hoặc hợp phần như được mô tả ở đây là tế bào đơn độc. Theo phương án khác, ít nhất 50% số tế bào trong môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp và/hoặc hợp phần như được mô tả ở đây là tế bào đơn độc. Theo phương án khác, ít nhất 60% số tế bào trong môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp và/hoặc hợp phần như được mô tả ở đây là tế bào đơn độc. Theo phương án khác, ít nhất 70% số tế bào trong môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp và/hoặc hợp phần như được mô tả ở đây là tế bào đơn độc. Theo phương án khác, ít nhất 80% số tế bào trong môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp và/hoặc hợp phần như được mô tả ở đây là tế bào đơn độc. Theo phương án khác, ít nhất 90% số tế bào trong môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp và/hoặc hợp phần như được mô tả ở đây là tế bào đơn độc. Theo phương án khác, ít nhất 95% số tế bào trong môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp và/hoặc hợp phần như được mô tả ở đây là tế bào đơn độc.

Theo phương án khác, ít nhất 8% số tế bào trong môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp và/hoặc hợp phần như được mô tả ở đây được kết tập. Theo phương án khác, ít nhất 10% số tế bào trong môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp và/hoặc hợp phần như được mô tả ở đây được quần tụ. Theo phương án khác, ít nhất

20% số tế bào trong môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp và/hoặc hợp phần như được mô tả ở đây được quần tụ. Theo phương án khác, ít nhất 25% số tế bào trong môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp và/hoặc hợp phần như được mô tả ở đây được quần tụ. Theo phương án khác, ít nhất 30% số tế bào trong môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp và/hoặc hợp phần như được mô tả ở đây được kết tập. Theo phương án khác, ít nhất 35% số tế bào trong môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp và/hoặc hợp phần như được mô tả ở đây được kết tập. Theo phương án khác, ít nhất 40% số tế bào trong môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp và/hoặc hợp phần như được mô tả ở đây được kết tập. Theo phương án khác, ít nhất 45% số tế bào trong môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp và/hoặc hợp phần như được mô tả ở đây được kết tập. Theo phương án khác, ít nhất 50% số tế bào trong môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp và/hoặc hợp phần như được mô tả ở đây được kết tập. Theo phương án khác, ít nhất 60% số tế bào trong môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp và/hoặc hợp phần như được mô tả ở đây được kết tập. Theo phương án khác, ít nhất 70% số tế bào trong môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp và/hoặc hợp phần như được mô tả ở đây được kết tập.

Theo phương án khác, khối kết tập của các tế bào theo sáng chế bao gồm 2 đến 70 tế bào. Theo phương án khác, khối kết tập của các tế bào theo sáng chế bao gồm 2 đến 50 tế bào. Theo phương án khác, khối kết tập của các tế bào theo sáng chế bao gồm 2 đến 40 tế bào. Theo phương án khác, khối kết tập của các tế bào theo sáng chế bao gồm 2 đến 30 tế bào. Theo phương án khác, khối kết tập

của các tế bào theo sáng chế bao gồm 2 đến 25 tế bào. Theo phương án khác, khối kết tập của các tế bào theo sáng chế bao gồm 2 đến 20 tế bào.

Theo phương án khác, môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp và/hoặc hợp phần như được mô tả ở đây không có hoặc cơ bản không có mô nguyên vẹn. Theo phương án khác, môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp và/hoặc hợp phần như được mô tả ở đây không có hoặc cơ bản không có các mảnh mô.

Theo phương án khác, tuyến tuyến androgen phì đại cũng là tuyến tuyến androgen tăng sản/tăng sản. Theo phương án khác, tuyến tuyến androgen phì đại là tuyến mà thể tích của nó gia tăng. Theo phương án khác, tuyến tuyến androgen phì đại là tuyến mà thể tích của nó gia tăng bằng phương tiện nhân tạo. Theo phương án khác, tuyến tuyến androgen phì đại là tuyến với tế bào thành phần lớn hơn (so với tuyến nguyên vẹn). Theo phương án khác, tuyến androgen tăng sản được đặc trưng bởi số lượng tế bào tăng lên (so với tuyến nguyên vẹn).

Theo phương án khác, môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp và/hoặc hợp phần như được mô tả ở đây bao gồm ít nhất 1×10^2 tế bào hoặc tế bào đơn độc xuất phát từ tuyến androgen của giáp xác mười chân. Theo phương án khác, môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp và/hoặc hợp phần như được mô tả ở đây bao gồm ít nhất 1×10^3 tế bào hoặc tế bào đơn độc xuất phát từ tuyến androgen của giáp xác mười chân. Theo phương án khác, môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp và/hoặc hợp phần như được mô tả ở đây bao gồm ít nhất 1×10^4 tế bào hoặc tế bào đơn độc xuất phát từ tuyến androgen của giáp xác mười chân. Theo phương

án khác, môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp và/hoặc hợp phần như được mô tả ở đây bao gồm ít nhất 1×10^5 tế bào hoặc tế bào đơn độc xuất phát từ tuyến androgen của giáp xác mười chân. Theo phương án khác, môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp và/hoặc hợp phần như được mô tả ở đây bao gồm ít nhất 1×10^6 tế bào hoặc tế bào đơn độc xuất phát từ tuyến androgen của giáp xác mười chân. Theo phương án khác, môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp và/hoặc hợp phần như được mô tả ở đây bao gồm ít nhất 1×10^7 tế bào hoặc tế bào đơn độc xuất phát từ tuyến androgen của giáp xác mười chân. Theo phương án khác, môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp và/hoặc hợp phần như được mô tả ở đây bao gồm ít nhất 1×10^8 tế bào hoặc tế bào đơn độc xuất phát từ tuyến androgen của giáp xác mười chân.

Theo phương án khác, hợp phần như được mô tả ở đây bao gồm môi trường nuôi cấy tế bào. Theo phương án khác, môi trường nuôi cấy tế bào hỗ trợ cho sự sinh trưởng của các tế bào được mô tả ở đây. Theo phương án khác, môi trường nuôi cấy tế bào hỗ trợ cho sự tăng sinh của các tế bào được mô tả ở đây. Theo phương án khác, môi trường nuôi cấy tế bào cảm ứng hoặc duy trì sự tiết hormone androgen bởi các tế bào được mô tả ở đây. Theo phương án khác, môi trường nuôi cấy tế bào thích hợp là đã biết đối với người có kỹ năng trong lĩnh vực.

Theo phương án khác, hợp phần như được mô tả ở đây bao gồm: Arginin, biotin, NaCl, glucoza, insulin, Xystin, cholin, KCl, penixilin, transferrin,

Glutamin, folat, NaH_2PO_4 , streptomycin, các yếu tố sinh trưởng đặc hiệu, Histidin nicotinamit, NaHCO_3 , đỏ phenol, Isoleuxin, pantothenat, CaCl_2 , huyết thanh toàn phần, 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 và/hoặc được điều chỉnh độ thẩm thấu. Theo phương án khác, môi trường nuôi cấy tế bào thích hợp bao gồm một hoặc nhiều axit amin kiềm 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 thai bò. Theo phương án khác, môi trường nuôi cấy tế bào thích hợp bao gồm kháng sinh hoặc tổ hợp của kháng sinh như nhưng không bị giới hạn bởi Penicillin-Streptomycin.

Quy trình

Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp để thu được môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp tuyến androgen phân ly bằng enzym trong huyền phù từ giáp xác mười chân. Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến quy trình để thu được môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp, trong đó môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp bao gồm/gồm có các tế bào xuất phát từ tuyến androgen của giáp xác

mười chân và môi trường, bao gồm bước: thu lấy tế bào đơn độc bằng cách phân ly các tế bào tuyến androgen nhờ enzym từ tuyến androgen của giáp xác mười chân; bằng cách đó thu được môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp bao gồm môi trường nuôi cấy tế bào và các tế bào xuất phát từ tuyến androgen của giáp xác mười chân. Theo một phương án, tuyến androgen là tuyến androgen phì đại.

Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến quy trình để thu được môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp, trong đó môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp bao gồm/gồm có các tế bào xuất phát từ tuyến androgen của giáp xác mười chân và môi trường, bao gồm các bước: (a) thu lấy tế bào đơn độc bằng cách phân ly các tế bào tuyến androgen nhờ enzym từ tuyến androgen của giáp xác mười chân; tùy ý (b) cấy các tế bào tuyến androgen phân ly vào trong môi trường nuôi cấy tế bào; và tùy ý (c) ủ các tế bào ở bước (b) trong thiết bị ủ ở nhiệt độ từ 25°C đến 27°C; bằng cách đó thu được môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp bao gồm môi trường nuôi cấy tế bào và các tế bào xuất phát từ tuyến androgen của 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 là khoảng 26°C. Theo phương án khác, nhiệt độ thiết bị ủ nằm trong khoảng từ 25,5 đến 26,5°C. Theo phương án khác, nhiệt độ của thiết bị ủ nằm trong khoảng từ 25 đến 27°C.

Giáp xác mười chân chuyển ngược giới tính

Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến giáp xác mười chân, bao gồm môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp và/hoặc hợp phần như được mô tả ở đây.

Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến giáp xác mười chân cái, bao gồm môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp và/hoặc hợp phần như được mô tả ở đây.

Theo phương án khác, giáp xác mười chân hoặc giáp xác mười chân cái là giáp xác mười chân hậu ấu trùng lên tới 180 ngày tuổi. Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến giáp xác mười chân cái trải qua sự chuyển ngược giới tính, bao gồm môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp và/hoặc hợp phần như được mô tả ở đây.

Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến lứa đẻ của giáp xác mười chân cái mà đã trải qua sự chuyển ngược giới tính theo sáng chế. Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến thế hệ con giáp xác mười chân đồng giao tử WW của giáp xác mười chân cái mà đã trải qua sự chuyển ngược giới tính theo sáng chế. Theo phương án khác, sáng chế còn đề cập đến giáp xác mười chân đực giả đồng giao tử WW. Theo phương án khác, sáng chế còn đề cập đến giáp xác mười chân đực giả đồng giao tử WW xuất phát từ con cái WW như được mô tả ở đây.

Theo một phương án, con đực đồng giao tử WW là con đực chỉ có nhiễm sắc thể giới tính W trong các giao tử giới tính của nó. Theo một phương án, con đực đồng giao tử WW là con đực không có nhiễm sắc thể giới tính Z trong các giao tử của nó. Theo một phương án, con đực đồng giao tử WW là con đực có nhiễm sắc thể giới tính W trong các giao tử giới tính của nó.

Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp để thu được thế hệ con toàn cái, bao gồm bước tiến hành giao phối con cái đồng giao tử WW với giáp xác mười chân đực, bằng cách đó thu được thế hệ con toàn cái. Theo

phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp để thu được thể hệ con toàn cái, bao gồm bước tiến hành giao phối con cái đồng giao tử WW với giáp xác mười chân đực giả đồng giao tử WW, bằng cách đó thu được thể hệ con toàn cái. Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp để thu được thể hệ con toàn cái, bao gồm bước tiến hành giao phối con cái đồng giao tử WW với giáp xác mười chân đực dị giao tử, bằng cách đó thu được thể hệ con toàn cái. Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp để thu được thể hệ con toàn cái, bao gồm bước tiến hành giao phối con đực giả đồng giao tử WW với giáp xác mười chân cái dị giao tử, bằng cách đó thu được thể hệ con toàn cái. Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp để thu được thể hệ con toàn cái, bao gồm bước tiến hành giao phối con cái đồng giao tử WW với giáp xác mười chân đực đồng giao tử, bằng cách đó thu được thể hệ con toàn cái. Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp để thu được thể hệ con toàn cái, bao gồm bước tiến hành giao phối con đực giả WW và con cái WW, do đó thu được thể hệ con 100% toàn cái WW. Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp để thu được thể hệ con toàn cái, bao gồm bước tiến hành giao phối con đực ZZ và con cái WW, do đó thu được thể hệ con 100% toàn cái WZ. Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp để thu được thể hệ con toàn cái, bao gồm bước tiến hành giao phối con đực giả WZ và con cái WW, do đó thu được thể hệ con gồm 50% con cái WZ và 50% con cái WW.

Theo phương án khác, con cái đồng giao tử WW là thể hệ con của giáp xác mười chân cái mà đã trải qua sự chuyển ngược giới tính theo sáng chế và

phát triển thành con đực giả (con đực có chức năng sinh dục). Theo phương án khác, con đực giả đồng giao tử WW là giáp xác mười chân cái WW trước đó mà đã trải qua sự chuyển ngược giới tính theo sáng chế.

Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp để thu được con đực có nhiễm sắc thể giới tính W (WW hoặc WZ), bao gồm bước tiêm vào giáp xác mười chân chứa nhiễm sắc thể giới tính W và hậu ấu trùng ít hơn 180 ngày tuổi, hợp phần bao gồm ít nhất 1×10^2 tế bào đơn độc xuất phát từ tuyến androgen của giáp xác mười chân, bằng cách đó thu được con đực có nhiễm sắc thể giới tính W. Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp để thu được con đực có nhiễm sắc thể giới tính W (về gen là con cái), bao gồm bước tiêm vào hậu ấu trùng ít hơn 180 ngày tuổi của giáp xác mười chân cái về mặt di truyền (bao gồm nhiễm sắc thể giới tính W), hợp phần bao gồm ít nhất 1×10^2 tế bào đơn độc xuất phát từ tuyến androgen của giáp xác mười chân.

Theo phương án khác, hậu ấu trùng ít hơn 180 ngày tuổi là hậu ấu trùng ít hơn 160 ngày tuổi. Theo phương án khác, hậu ấu trùng ít hơn 180 ngày tuổi là hậu ấu trùng ít hơn 150 ngày tuổi. Theo phương án khác, hậu ấu trùng ít hơn 180 ngày tuổi là hậu ấu trùng ít hơn 130 ngày tuổi. Theo phương án khác, hậu ấu trùng ít hơn 180 ngày tuổi là hậu ấu trùng ít hơn 120 ngày tuổi. Theo phương án khác, hậu ấu trùng ít hơn 180 ngày tuổi là hậu ấu trùng ít hơn 100 ngày tuổi. Theo phương án khác, hậu ấu trùng ít hơn 180 ngày tuổi là hậu ấu trùng ít hơn 80 ngày tuổi. Theo phương án khác, hậu ấu trùng ít hơn 180 ngày tuổi là hậu ấu

trùng ít hơn 60 ngày tuổi. Theo phương án khác, hậu ấu trùng ít hơn 180 ngày tuổi là hậu ấu trùng từ 1 đến 60 ngày tuổi. Theo phương án khác, hậu ấu trùng ít hơn 180 ngày tuổi là hậu ấu trùng ít hơn 30 ngày tuổi.

Theo phương án khác, thao tác tiêm là tiêm vào trong mô cơ của đoạn bụng. Theo phương án khác, thao tác tiêm là tiêm vào trong mô cơ của đoạn bụng thứ nhất. Theo phương án khác, thao tác tiêm là tiêm vào trong mô cơ của đoạn bụng thứ hai. Theo phương án khác, phương pháp tiêm là phương pháp dı ghép tế bào vào trong mô cơ của đoạn bụng.

Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp tiêm môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp tuyến androgen phân ly bằng enzym trong huyền phù vào trong giáp xác mười chân. Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp tạo ra giáp xác mười chân đực giả bằng cách tiêm các tế bào tuyến androgen phân ly thu được từ môi trường nuôi cấy sơ cấp trong huyền phù - hợp phần. Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp tạo ra giáp xác mười chân đực giả bằng cách tiêm liều đơn tế bào tuyến androgen phân ly thu được từ môi trường nuôi cấy sơ cấp trong huyền phù.

Theo phương án khác, các tế bào thu được từ tuyến androgen phì đại của giáp xác mười chân đực sau ít nhất 5 ngày từ khi lấy ra phức hệ cơ quan X tuyến nút bằng phẫu thuật hai bên. Theo phương án khác, các tế bào thu được từ tuyến androgen phì đại của giáp xác mười chân đực sau ít nhất 8 ngày từ khi lấy ra phức hệ cơ quan X tuyến nút bằng phẫu thuật hai bên. Theo phương án khác,

các tế bào thu được từ tuyến androgen phì đại của giáp xác mười chân đực sau bất kỳ xử lý nào đã biết mà có thể gây ra sự phì đại về tuyến tuyến androgen. Theo phương án khác, các tế bào thu được từ tuyến androgen phì đại của giáp xác mười chân đực sau 4 đến 15 ngày từ khi lấy ra phức hệ cơ quan X tuyến nút bằng phẫu thuật hai bên.

Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến hợp phần mô tả ở đây được tiêm một lần hoặc nhiều lần vào trong giáp xác mười chân cái ở độ tuổi nằm trong khoảng từ 1 to 100 ngày tuổi hậu ấu trùng. Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến hợp phần được mô tả ở đây được tiêm một lần hoặc nhiều lần vào trong giáp xác mười chân cái ở độ tuổi nằm trong khoảng từ 1 đến 50 ngày tuổi hậu ấu trùng. Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến hợp phần mô tả ở đây được tiêm một lần hoặc nhiều lần vào trong giáp xác mười chân cái ở độ tuổi nằm trong khoảng từ 7 đến 30 ngày tuổi hậu ấu trùng. Theo phương án khác, việc tiêm là tiêm bằng thiết bị tiêm micro. Theo phương án khác, việc tiêm vào con cái chưa thành thực về giới tính dẫn tới sự chuyển ngược giới tính chức năng thành con đực và/hoặc con đực giả. Con đực và/hoặc con đực giả được sử dụng, theo một số phương án, để thu được quần đàn đơn giới tính toàn cái bằng cách tạo ra con cái WW.

Theo sử dụng ở đây, các dạng số ít bao gồm cả dạng số nhiều trừ khi ngữ cảnh nêu rõ theo cách khác. Do đó, ví dụ, tham chiếu tới "tác nhân trị liệu" bao gồm cả việc tham chiếu đến nhiều hơn một tác nhân trị liệu.

Trừ khi được nêu rõ cụ thể hoặc hiển nhiên từ ngữ cảnh, theo sử dụng ở đây, thuật ngữ "hoặc" được hiểu là bao gồm cả.

Thuật ngữ "bao gồm" được sử dụng ở đây có nghĩa và được sử dụng thay đổi lẫn nhau với, thuật ngữ "bao gồm nhưng không bị giới hạn bởi."

Theo sử dụng ở đây, các thuật ngữ "bao gồm," "gồm có" "chứa" "có" và tương tự có thể có nghĩa như được quy cho chúng theo luật patent Mỹ và có thể có nghĩa "bao gồm," "gồm có" và tương tự; tương tự, "chủ yếu bao gồm hoặc "bao gồm chủ yếu" có nghĩa như được quy cho chúng theo luật patent Mỹ và thuật ngữ được kết thúc mở, cho phép sự có mặt của nhiều hơn thuật ngữ được kể ra, miễn là các đặc trưng cơ bản hoặc mới của chúng được kể ra không bị thay đổi bởi sự có mặt của nhiều hơn thứ được kể ra, nhưng loại trừ các phương án đã biết. Theo một phương án, các thuật ngữ "bao gồm," "gồm có" "có" là có thể thay đổi lẫn nhau với "gồm có".

Theo một số phương án, hợp phần theo sáng chế bao gồm các hoạt chất được. Theo một số phương án, các hoạt chất được được bổ sung trước khi cấy ghép. Các hoạt chất được bao gồm những không bị giới hạn bởi bất kỳ trong số các ví dụ cụ thể được bộc lộ ở đây. Người có kỹ năng bình thường trong lĩnh vực sẽ hiểu là nhiều hợp chất khác cũng nằm trong phạm vi của sáng chế và cũng hữu dụng theo sáng chế.

Theo sử dụng ở đây, "lượng hiệu quả" để chỉ lượng các tế bào tạo ra tác dụng mong muốn (như điều trị hoặc chuyển ngược giới tính).

Trừ khi được nêu rõ cụ thể hoặc hiển nhiên trong ngữ cảnh, theo sử dụng ở đây, thuật ngữ "khoảng" được hiểu là trong phạm vi hiểu biết thông thường trong lĩnh vực, ví dụ trong phạm vi 2 độ lệch chuẩn của giá trị trung bình. Khoảng có thể được hiểu là trong phạm vi 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, hoặc 0,01% của giá trị thông báo. Trừ khi rõ ràng theo cách khác từ ngữ cảnh, tất cả các giá trị bằng số cung cấp ở đây được làm thay đổi bởi thuật ngữ khoảng.

Các mục đích, lợi ích bổ sung và các dấu hiệu mới của sáng chế sẽ trở nên rõ ràng đối với người có kỹ năng trung bình trong lĩnh vực khi khảo sát các ví dụ sau, các ví dụ này không được dự định để giới hạn sáng chế. Ngoài ra, mỗi một trong số các phương án và khía cạnh khác nhau của sáng chế như được mô tả ở trên trong sáng chế này và như được yêu cầu bảo hộ trong phần yêu cầu bảo hộ dưới đây được hỗ trợ bằng thực nghiệm trong các ví dụ sau.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Nói chung, đang pháp sử dụng ở đây và các quy trình trong phòng thí nghiệm sử dụng trong sáng chế bao gồm các kỹ thuật phân tử, sinh hóa, vi sinh vật và ADN tái tổ hợp. Các kỹ thuật này được giải thích rõ ràng trong tài liệu. Ví dụ xem trong tài liệu "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 và 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 luận được nêu trong các patent Mỹ số 4,666,828; 4,683,202; 4,801,531; 5,192,659 và 5,272,057; "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 có sẵn được mô tả rộng rãi trong tài liệu patent và tài liệu khoa học, ví dụ xem trong các 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., và 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) and "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods and Applications",

Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al., "Strategies for Protein Purification và Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996); tất cả các tài liệu này được kết hợp tham khảo trong sáng chế này. Các tham khảo chung khác được cung cấp trong toàn bộ tài liệu này.

Nguyên liệu và phương pháp

Động vật

Tôm càng xanh đực *Macrobrachium rosenbergii* (40 ± 5 g) được nuôi trong các bể riêng biệt thể tích 600 L ở nhiệt độ $28 \pm 2^\circ\text{C}$ với điều kiện sục khí hằng định, chế độ ánh sáng là 14:10 (L:D) và cho ăn tùy ý (thức ăn cho tôm chứa 30% protein) trong các cơ sở của công ty Enzoctic Holdings Ltd. Tôm càng xanh non *M. rosenbergii* sau khi biến thái (tức là, hậu ấu trùng (PL)) được nuôi trong bể chữ U thể tích 3,5 mét khối và được duy trì như ở trên.

Sự phì đại tuyến androgen và sự phân ly tế bào bằng enzym

Phức hệ cơ quan X tuyến nút thần kinh nội tiết, nằm ở cuống mắt, được biết là các neuropeptit bài tiết mà chúng điều hòa theo kiểu ức chế tuyến androgen (AG) và các hoạt tính của nó. Do đó, việc can thiệp nội tiết bao gồm việc loại bỏ thông qua phẫu thuật loại bỏ và dẫn đến cả phì đại và tăng sản tuyến androgen được áp dụng cho các tôm đực càng xanh *M. rosenbergii*. Tám ngày sau khi can thiệp nội tiết; các con đực cảm ứng được gây mê trong 15 phút trong nước làm lạnh bằng nước đá có bổ sung 0,2% hypoclorit nhằm mục đích khử trùng. Sau đó, động vật được phẫu tích và tuyến tuyến androgen phì đại của

chúng được phân lập trong điều kiện phẫu tích dưới kính hiển vi ánh sáng. Sau đó, các tế bào được tách nhờ phân ly bằng enzym. Một cách vắn tắt, 4 đến 5 tuyến androgen phì đại được gộp chung trong một ống duy nhất và được để trên nước đá. Sau đó, 1ml hỗn hợp enzym đặc hiệu và kháng sinh [môi trường Leibovitz L-15 chứa L-Glutamin, 0,1% khối lượng/thể tích Collagenaza typ I, 0,1% (khối lượng/thể tích) Collagenaza type IV và dung dịch Penicillin-Streptomycin] được bổ sung vào đó. Sau đó, ống phản ứng phân ly được đặt lên thiết bị quay với tốc độ 25 vòng/phút trong thời gian 40 phút ở nhiệt độ trong phòng và tiếp theo bằng cách ly tâm ở tốc độ 500×g trong thời gian 5 phút, cũng ở nhiệt độ trong phòng. Khi ly tâm, ống được đặt trong thiết bị dòng chảy tầng sinh học vô trùng. Pha trên (không bao gồm tế bào sống) được loại bỏ và viên tế bào được rửa bằng cách tái tạo huyền phù nó trong 1 ml môi trường nuôi dưỡng [môi trường Leibovitz L-15 chứa L-Glutamin, 10% thể tích/thể tích (v/v) huyết thanh thai bò và dung dịch Penicillin-Streptomycin] và ly tâm sau đó ở tốc độ 500×g trong thời gian 5 phút ở nhiệt độ trong phòng. Bước rửa được lặp lại ba lần. Sau cùng, các tế bào được tái tạo huyền phù trong 500 µl môi trường nuôi dưỡng.

Đếm tế bào

Nồng độ và khả năng sống sót của tế bào được xác định sử dụng phương pháp nhuộm màu xanh Trypan chuẩn. Một cách vắn tắt, các tế bào được nhuộm bằng dùng dịch màu xanh Trypan ở nồng độ cuối là 0,08% và sau đó, được nạp

lên máy đếm huyết cầu để quan sát dưới kính hiển vi ánh sáng ở độ phóng đại $\times 100$.

Môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp tuyến androgen

Các phần 10 μ l của tế bào tạo huyền phù trong môi trường được cấy ngay vào đĩa 24 giếng được phủ bằng 20 μ g/ml poly D-lysine (PDL) với mật độ $\sim 1 \times 10^4$ tế bào trong mỗi giếng hoặc trước tiên, được nạp vào trong thiết bị tiêm micro, được đưa qua ống mao dẫn bằng thủy tinh của thiết bị tiêm micro vào trong ống 1,5ml và sau đó, được cấy vào trong đĩa 24 giếng ở mật độ $\sim 1 \times 10^4$ tế bào trong mỗi giếng. Trong số tế bào tập hợp, một phần được cho tiến hành đánh giá về khả năng sống sót và được nhuộm màu như đã mô tả ở trên. Các tế bào được sinh trưởng trong thiết bị ủ không chứa CO₂ ở nhiệt độ 27°C. 24 giờ sau khi cấy trở đi, môi trường sinh trưởng được thay thế một phần cách ngày. Nói chung, các tế bào được duy trì trong thời gian 21 ngày trong đó, chúng được giám sát dưới kính hiển vi ánh sáng đảo ngược và hình thể, mật độ và tương tác của các tế bào được ghi lại.

Tiêm huyền phù tế bào tuyến androgen vào trong các hậu ấu trùng

Khả năng của các tế bào tuyến androgen tinh khiết và đã sinh trưởng trong việc gây ra sự chuyển ngược giới tính được khảo sát. Quần đàn hỗn hợp (các con đực và cái) của PL 60 hoặc 30 ngày hoặc ít hơn (PL_{≤60}, PL_{≤30}; n=913) được tiêm bằng $\sim 2 \times 10^3$ tế bào tuyến androgen. Nói chung, mỗi một hậu ấu trùng được giới hạn ở trên bề mặt plastixin và sử dụng thiết bị tiêm micro, trong khi

quan sát thông qua kính hiển vi hai mắt kính trong phòng thí nghiệm, các tế bào tuyến androgen từ môi trường nuôi cấy sơ cấp được tạo huyền phù và đưa vào bằng cách tiêm một lần vào trong mô cơ của đoạn bụng thứ nhất. Sau đó, các hậu ấu trùng đã tiêm được chia thành 2 nhóm: (1) bao gồm phần lớn hậu ấu trùng ($n=883$) mà được giữ trong bể hình chữ U thể tích 3,5 mét khối hoặc bể hình tròn thể tích ~ 10 mét khối hoặc ao đất hình chữ nhật ($\sim 250 \text{ m}^2$; $\sim 8 \text{ m} \times 30 \text{ m}$) với độ sâu nước là 1 m để phát triển, (2) bao gồm các hậu ấu trùng đại diện ($n=30$) mà được giữ ở trong bể hình chữ U thể tích 3,5 mét khối. Các hậu ấu trùng nêu sau được kiểm tra đều đặn và được theo dõi sự chuyển ngược giới tính thành các con đực giả.

Kiểm tra nhánh phụ đực (Appendix masculina - AM) và các lỗ sinh sản đực

Để đánh giá các đặc điểm tính đực, chân bơi thứ hai (chân bơi) được loại bỏ sử dụng các nhíp nhỏ tinh tế và sự có mặt /hoặc không có mặt AM được khẳng định bằng kính hiển vi ánh sáng. Ở con đực giả trưởng thành (1 năm tuổi), thử nghiệm tái sinh được thực hiện. Một cách vắn tắt, các con đực giả có AM được khẳng định như được mô tả ở trên được cho lột xác và sự tái sinh AM được kiểm tra.

Sự xuất hiện các lỗ sinh sản đực ở đế của các chân ngực thứ năm (chân đi) được kiểm tra bằng cách đặt hậu ấu trùng nằm ngửa trên lưng của nó và quan sát dưới kính hiển vi hai mắt kính trong phòng thí nghiệm.

Phân tích phân tử

Các chân bơi thứ hai trước khi loại bỏ để quan sát *AM* đã được sử dụng để chiết ADN hệ gen (gADN) để xác định giới tính về mặt di truyền. Một cách vắn tắt, gADN được chiết sử dụng bộ dụng cụ PCR mô REDEExtract-N-Amp (Sigma, Israel) và được sử dụng làm mẫu trong 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 agarosa 2%, được nhuộm bằng ethidi bromua và được quan sát trên bàn chiếu tia cực tím.

Mô học

Tinh hoàn được cắt phẫu tích cùng với ống dẫn tinh gần ('ống dẫn tinh - vas deferens') từ các con đực già (1 năm tuổi). Các mẫu mô được cố định trong Carnoy's II cải biến [Ethanol 60% (thể tích/thể tích; Bio-Lab Ltd, Israel), Cloroform 30% (thể tích/thể tích; Frutarom, Israel), axit axetic băng 10% (thể tích/thể tích; Sigma, Israel) và Formaldehyt 2% (thể tích/thể tích; Sigma, Israel) trong thời gian 24 giờ, được khử nước từ từ thông qua hàng loạt từ nồng độ rượu tăng dần tới Xylen (Sigma, Israel) và được nhúng trong Paraplast (Kendall, Mansfield, MA) theo các quy trình thông thường. Các phần 5µm được cắt đưa lên các bản kính phủ silan (Menzel-Gläser, Braunschweig, Germany). Các phần liên tục được nhuộm sử dụng màu chuẩn Hematoxylin (Bar Naor, Israel) và Eosin (Bar Naor, Israel) để quan sát hình thể.

Ví dụ 1

Tạo ra các con đực giả WZ sử dụng phương pháp tiêm liều đơn huyền phù tế bào vào trong giáp xác mười chân cái hậu ấu trùng

Dữ liệu thực nghiệm cung cấp ở đây chứng minh khả năng tạo ra môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp tuyến androgen của giáp xác mười chân phân ly bằng enzym trong huyền phù và việc sử dụng môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp tuyến androgen của giáp xác mười chân để tạo ra các con đực giả. Các con đực giả này được sử dụng tiếp để cho giao phối và tạo ra con cái WW dẫn đến sự phát sinh thế hệ con đơn giới tính nuôi cấy toàn cái.

Các nhiễm sắc thể W và Z - xác định giới tính

Sơ đồ dòng trình bày trong hình vẽ trên Fig. 1 minh họa mẫu xác định giới tính dựa vào nhiễm sắc thể W và Z. Theo phương thức di truyền này, các con cái là dị giao tử (WZ) và các con đực là đồng giao tử (ZZ). Pha 1 của sơ đồ nhấn mạnh rằng, ngay cả việc tiêm một lần môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp tuyến androgen trong huyền phù vào các hậu ấu trùng cái giáp xác mười chân non có thể dẫn đến sự chuyển ngược giới tính hoàn toàn và chức năng thành con đực giả WZ. Một cách bất ngờ, sự can thiệp này đã không dẫn đến bất kỳ sự ốm yếu hoặc tử vong nào đối với các động vật được xử lý. Quan trọng là nhấn mạnh sáng chế khắc phục những trở ngại kết hợp với quá trình cấy ghép mô tuyến androgen mà đã dẫn đến tỷ lệ tử vong hàng loạt và tỷ lệ chuyển ngược giới tính thấp.

Các con đực giả WZ “được tạo ra” mà chúng có chức năng sinh dục hoàn toàn là đực, là các con cái di truyền mang giao tử W. Khi giao phối thành công

con đực giả (WZ) với con cái tự nhiên (như WZ), 25% thể hệ con được phát hiện là các con đực (ZZ) và 75% còn lại là các con cái. Trong số cá thể nêu sau, 67% được nhận dạng bằng cách xác định kiểu gen phân tử là các con cái (WZ) dị giao tử tự nhiên trong khi 33% còn lại được phát hiện là các con cái đồng giao tử WW duy nhất. Cho các con cái đồng giao tử WW này giao phối tiếp với các con đực ZZ đã sinh ra thể hệ 100% con cái dị giao tử WZ.

Pha 2 của sơ đồ nhấn mạnh rằng, việc tiêm liều đơn huyền phù tế bào tuyến androgen vào con cái WW hậu ấu trùng (của pha 1) sinh ra con đực giả WW chuyển ngược giới tính chức năng đầy đủ. Việc nội lai con đực đồng giao tử WW/con đực giả với con cái đồng giao tử đã sinh ra thể hệ con 100% đồng giao tử WW.

Đối với điều kiện tiên quyết để thu được môi trường nuôi cấy tế bào tuyến androgen phì đại có thể tạo huyền phù được, giáp xác mười chân đực cần phải được cảm ứng về mặt nội tiết sao cho, các mức neuropeptit ức chế tuyến androgen đặc hiệu giảm xuống và tuyến tạo ra lượng các yếu tố androgen đầy đủ mà các yếu tố này thực sự có thể cảm ứng sự phát triển con đực ở động vật có khả năng phát triển thành cả con đực và con cái (bất luận thành phần các nhiễm sắc thể giới tính của nó thể nào). Sau đó, sự can thiệp này dẫn tới sự phì đại tuyến androgen và các tế bào cấu thành của nó.

Các so sánh mô học giữa tuyến androgen nguyên vẹn (Fig. 2A) và tuyến androgen phì đại (Fig. 2B) chứng minh một cách rõ ràng những sự khác nhau cơ bản về kích thước tổng cộng của tuyến androgen, số lượng tế bào cấu thành nó

và đặc trưng của chúng. Các tuyến androgen loại bỏ bằng ngoại khoa được phân ly sử dụng hỗn hợp enzym đặc hiệu để thu được huyền phù chứa các tế bào riêng biệt.

Việc đưa qua thiết bị tiêm micro hình như không có tác dụng rõ rệt lên khả năng sống sót của tế bào tuyến androgen. Môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp đã cấy được ghi lại vào ngày 2 và 6 (Fig. 3A và 3B tương ứng), và được phát hiện có thể sống trong thời gian 21 ngày trong môi trường nuôi cấy.

Các hình ảnh hiển vi ánh sáng của nuôi cấy đã làm rõ về khả năng sống sót của tế bào, chứng minh sự mở rộng tế bào phát triển tốt (Fig. 3). Sự mở rộng phát triển tế bào là các đặc trưng chuẩn về môi trường nuôi cấy sơ cấp sống khỏe mạnh, đối lập với các tế bào chết mà chúng có xu hướng co lại và sau đó tách ra khỏi bề mặt giếng và trôi nổi.

Để tiêm huyền phù tế bào vào các hậu ấu trùng rất nhỏ, ở lứa tuổi sớm từ 20 đến 60 ngày hoặc ít hơn sau khi biến thái (hậu ấu trùng giai đoạn $PL_{\leq 60}$), cơ sở hạ tầng chuyên biệt bao gồm thiết bị tiêm micro và kính hiển vi hai mắt kính trong phòng thí nghiệm được thiết đặt (Fig. 4). Việc can thiệp được tiến hành trên mỗi một động vật hạn chế dưới kính hiển vi hai mắt kính trong phòng thí nghiệm sử dụng thiết bị tiêm micro (Fig. 4).

Tổng cộng 913 hậu ấu trùng được tiêm liều đơn bằng huyền phù nuôi cấy tế bào sơ cấp tuyến androgen, với tỷ lệ sống sót của hậu ấu trùng là 81.

Khi đạt tới độ thành thực sinh dục, tôm càng xanh chứng minh hiện tượng lưỡng hình giới tính rõ rệt và các con đực khác biệt rõ với các con cái (Fig. 5A).

Trước khi thành thực sinh dục hoàn toàn, đặc trưng giới tính phụ đặc hiệu đực – *AM*, có thể được phát hiện ở chân bơi thứ hai của các con đực khi được quan sát dưới kính hiển vi hai mắt kính trong phòng thí nghiệm (Fig. 5B, bảng ở trên). Điều này trái ngược với phần phụ trong, phần phụ này được quan sát ở cả con đực và con cái (Fig. 5B).

Tổng cộng, 210 con cái mà được nhận liều tiêm đơn các tế bào tuyến androgen tạo huyền phù được sinh trưởng trong thời gian 7 đến 8 tháng trong các điều kiện khác nhau (các ao đất, bể thể tích 3,5 mét khối, v.v..). Phần lớn các động vật đã can thiệp này được nuôi trong các ao đất trong các điều kiện sinh trưởng, do đó chỉ được kiểm tra một lần tại lúc thu hoạch cuối cùng, 9 tháng tính từ lúc can thiệp. 100 con cái được phát hiện là chuyển ngược giới tính hoàn toàn thành các con đực giả, dựa vào sự phát triển *AM* và hai lỗ sinh sản đực có thể nhìn thấy được ở đế của các chân ngực thứ năm. Các con cái bổ sung biểu hiện sự chuyển ngược giới tính một phần với chỉ một số đặc trưng đực được quan sát. Ngoài ra, ba kiểu hình đực phân biệt trong loài này (tôm đực nhỏ, tôm càng da cam và tôm càng xanh) được quan sát. Trong một nhóm đại diện được theo dõi chặt chẽ hơn, 16 con cái (được xác nhận theo chỉ thị giới tính di truyền, Fig. 6) được can thiệp như ở trên. Gần 50 ngày sau can thiệp, toàn bộ 16 con cái di truyền này đã phát triển *AM*, 13 trong số này cũng đã phát triển các lỗ sinh sản đực (~81%) (Fig. 7, cột giữa) do đó, được xem là các con đực giả. Mười bốn (14) con đực hậu ấu trùng nguyên vẹn cùng tuổi như các con cái được can thiệp,

chúng được dùng làm tham chiếu có mặt cả *AM* và các lỗ sinh sản tại điểm đánh giá đầu tiên (Fig.6 và Fig. 7 cột trái), như kỳ vọng.

Các con đực giả được giám sát trên cơ sở hàng tuần và được phát hiện giữ nguyên *AM* của chúng. Ngoài ra, các con đực giả một năm sau khi can thiệp đã tái sinh *AM* của chúng sau khi thử nghiệm tái sinh lột xác. Các con đực giả này được giữ trong các bể riêng biệt, trải qua sự biệt hóa kiểu hình đầy đủ và phát triển thành kiểu hình đực trội – ‘tôm càng xanh’ (cá thể đại diện được trình bày ở hình vẽ trên Fig. 8). Đối với sự phát triển tuyến sinh dục, tôm càng xanh đực giả được phẫu tích và hệ sinh sản của chúng bao gồm các tinh hoàn trưởng thành (Fig. 9, bảng tách riêng) được lấy mẫu để khảo sát mô học (Fig. 9). Các cá thể phẫu tích cho thấy ống dẫn tinh phát triển tốt (Fig. 9A) chứa đầy tinh trùng. Trong điều kiện phóng đại cao, hình thể của các tế bào đã chứng minh cấu trúc xác nhận tiêu chuẩn của hình chiếc ô lộn ngược đặc trưng của kiểu tế bào trưởng thành này ở tôm càng xanh đực (Fig. 9B).

Ngoài ra, mô tinh hoàn phát triển tốt bao gồm cả hai vùng bắt màu đậm và nhạt được quan sát (Fig. 9C). Trong điều kiện phóng đại cao, các vùng bắt màu đậm, nằm ở ngoại vi của thùy xác định bất kỳ, được phát hiện là điều tiết sự phân chia xung quanh các tế bào tinh nguyên bào (Fig. 9D). Các vùng bắt màu nhạt, bao gồm phần lớn thể tích của thùy được phát hiện là điều tiết tinh trùng trưởng thành.

Ví dụ 2

Lai con đực giả WZ vừa mới thu được với con cái tự nhiên

Các con đực giả *Mr* được thả cùng với các con cái tự nhiên trong các bể chung (3,5-10 mét khối). Mỗi tuần một lần, toàn bộ các con cái được tập hợp từ bể sau khi chỉ các con cái mang trứng được lấy ra khỏi bể này, đưa vào các bể thủy tinh riêng biệt. Các con cái được giám sát hàng ngày cho tới khi màu sắc trứng chuyển đổi từ màu da cam sang màu xám, nhờ đó chúng được chuyển sang các bể để trứng chứa 12-15 ppt nước muối. Sau khi trứng nở, các con cái được lấy ra và việc nuôi cấy ấu trùng bắt đầu như thông thường. Để xác định xem liệu con cái có thực sự được thụ tinh bởi con đực giả hay không, mỗi một thể hệ con được duy trì riêng biệt, và ngay sau khi biến thái, giống và giới tính do kiểu gen của hậu ấu trùng được xác định như đã mô tả ở trên.

Các con cái mà được thả cùng với các con đực giả đàn bố mẹ trong các bể chung được thụ tinh thành công. Khi biến thái, các hậu ấu trùng được mô tả đặc điểm về di truyền sử dụng các chỉ thị giới tính ADN để xác minh rằng, các hậu ấu trùng WW thực có mặt (Fig. 10) (do đó loại trừ khả năng con cái được thụ tinh bởi con đực ZZ tự nhiên). Tổng cộng, trong số 865 cá thể khảo sát đại diện 4 quá trình lai khác nhau của ít nhất 2 con đực giả khác nhau, 77% (n=668) là dương tính về chỉ thị giới tính ADN nhiễm sắc thể Z, cụ thể là các con cái WZ và các con đực ZZ (Fig. 11A). Do đó, 23% còn lại (n=197) được xác định là con cái WW. Ngoài ra, cả hai chỉ thị giới tính ADN nhiễm sắc thể W và Z đều được sử dụng để mô tả đặc điểm một cách toàn diện sự phân bố chính xác các kiểu gen trong mẫu gồm 174 hậu ấu trùng. Trong số này, 42 cá thể được nhận dạng là

con đực ZZ (24,1%), 90 là con cái WZ (51,8%) và 42 là con cái WW (24,1%), với tỷ lệ kiểu gen ZZ: WZ: WW là 1: 2,1: 1 (Fig. 11B).

Ví dụ 3

Cho lai con cái WW với con đực tự nhiên để thu được thế hệ con WZ toàn cái

Con cái WW nguyên vẹn được phát triển tới khi thành thực sinh dục và được lai với các con đực ZZ tự nhiên để thu được 100% con cái WZ (Fig. 12).

Ví dụ 4

Lai trên quy mô thương mại

Thế hệ P

Tại thế hệ bố mẹ (P), đàn bố mẹ đơn (con đực ZZ và con cái WZ tự nhiên) đã tạo ra thế hệ con gồm 2000 đến 5000 cá thể WZ cùng lứa.

Thế hệ F1

Trong số nêu sau, 10 con cái WZ chọn ngẫu nhiên thế hệ đầu tiên (F1) trải qua can thiệp chuyển ngược giới tính bao gồm bước cấy ghép tế bào như được mô tả ở đây. Ít nhất 5 trong số các con cái WZ lựa chọn được chuyển ngược giới tính thành công thành các con đực giả WZ chức năng đầy đủ. Thử nghiệm này trong đó tỷ lệ thành công 50% được ghi lại là tuân theo đúng như các thử nghiệm khác liên quan đến sự chuyển ngược giới tính thành công của các con cái WZ thành các con đực giả.

Thế hệ F2

Mỗi một trong số các con đực giả này (anh em ruột) được phát triển tới khi thành thực sinh dục và được cho giao phối một lần với con cái WZ tự nhiên.

Các phép lai này đã sinh ra ít nhất 5 thế hệ con F2. Mỗi một thế hệ con F2 có quan hệ ở dạng anh em với thế hệ con F2 song song của F2. Trong mỗi một thế hệ con F2 đã nêu, ít nhất 700 con cái WW thu được. Một cách hiển nhiên, con cái WW này đã không thể thu được mà không có sự can thiệp chuyển ngược giới tính của các con cái WZ và do đó, không phải là kết quả tự nhiên.

Mỗi một trong số các con cái WW F2 thu được từ các thế hệ con F2 khác nhau phải là chị em được tạo ra từ các phép lai bao gồm ít nhất 5 con đực giả F1 khác nhau (chúng phải là các con đực giả cùng thế hệ F1) xuất phát từ cùng bố mẹ. Các anh em như vậy thu được, là số lượng tối thiểu cần thiết để sản xuất.

Ví dụ 5

Tạo ra con đực giả WW để thu được thế hệ con F3 WW toàn cái và thế hệ lai F2 khác nhau

Con đực (ZZ) và cái (WZ) trưởng thành của giáp xác mười chân *Macrobrachium rosenbergii* (Mr) được lai (thế hệ P) để thu được thế hệ con hỗn hợp của hậu ấu trùng (PL) bao gồm 50% con đực và 50% con cái. Các hậu ấu trùng cái được cách ly ra khỏi các con đực bằng cách xác định giới tính di truyền phân tử sử dụng chỉ thị giới tính ADN đặc hiệu W. Trước PL₁₂₀, các con cái nhận dạng được can thiệp theo ví dụ 1 và được phát triển cho tới khi các đặc trưng sinh dục phụ đặc hiệu đực như phát triển AM và các lỗ sinh sản ở đế của chân đi thứ 5 được xác nhận.

Các con cái F1 mà thể hiện các đặc trưng sinh dục đực được xác định là các con đực giả và được lai với các con cái WZ tự nhiên. Phép lai này đã sinh ra

thế hệ con F2 với tỷ lệ giới tính cái trên đực là 3:1. Sử dụng chỉ thị giới tính ADN đặc hiệu W, các con đực ZZ được loại trừ và trong số các con cái còn lại, 33% được nhận dạng là WW bằng cách sử dụng phương thức sàng lọc âm dựa vào chỉ thị giới tính ADN đặc hiệu Z.

Tạo ra các con đực giả WW: sau đó, các hậu ấu trùng cái WW chọn lọc từ F2 được can thiệp trước PL₁₂₀ theo ví dụ 1. Sau khi can thiệp, động vật được sinh trưởng cho tới khi các đặc trưng sinh dục phụ như sự phát triển *AM* và các lỗ sinh sản đực được xác nhận (Fig. 13). Ngoài ra, sự phát triển các đặc trưng giới tính chính đặc hiệu đực, tức là sự phát triển tuyến sinh dục của mô tinh hoàn, cũng được xác nhận (Fig. 14). Con cái WW mà thể hiện các đặc trưng sinh dục đực được xác định là con đực giả WW.

Các con đực giả WW trải qua sự biệt hóa kiểu hình đầy đủ (Fig. 15) mà sau đó, chúng được lai với con cái WW nguyên vẹn để thu được thế hệ con 100% toàn cái WW (Fig. 16; thế hệ F3) hoặc với các con cái WZ (tự nhiên) để thu được thế hệ con 100% toàn cái với tổ hợp nhiễm sắc thể giới tính hỗn hợp (thế hệ F3). Theo cách khác, con cái WW nguyên vẹn được phát triển tới khi thành thực sinh dục và được lai với các con đực ZZ tự nhiên để thu được thế hệ con 100% toàn cái WZ hoặc với các con đực giả WZ để thu được thế hệ con 100% toàn cái với tổ hợp nhiễm sắc thể giới tính hỗn hợp (thế hệ F3).

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Giáp xác mười chân đực đồng giao tử WW.
2. Phương pháp để thu được thế hệ con toàn cái WW, bao gồm bước lai giáp xác mười chân đực WW với giáp xác mười chân cái WW để thu được thế hệ con là thế hệ con toàn cái WW.

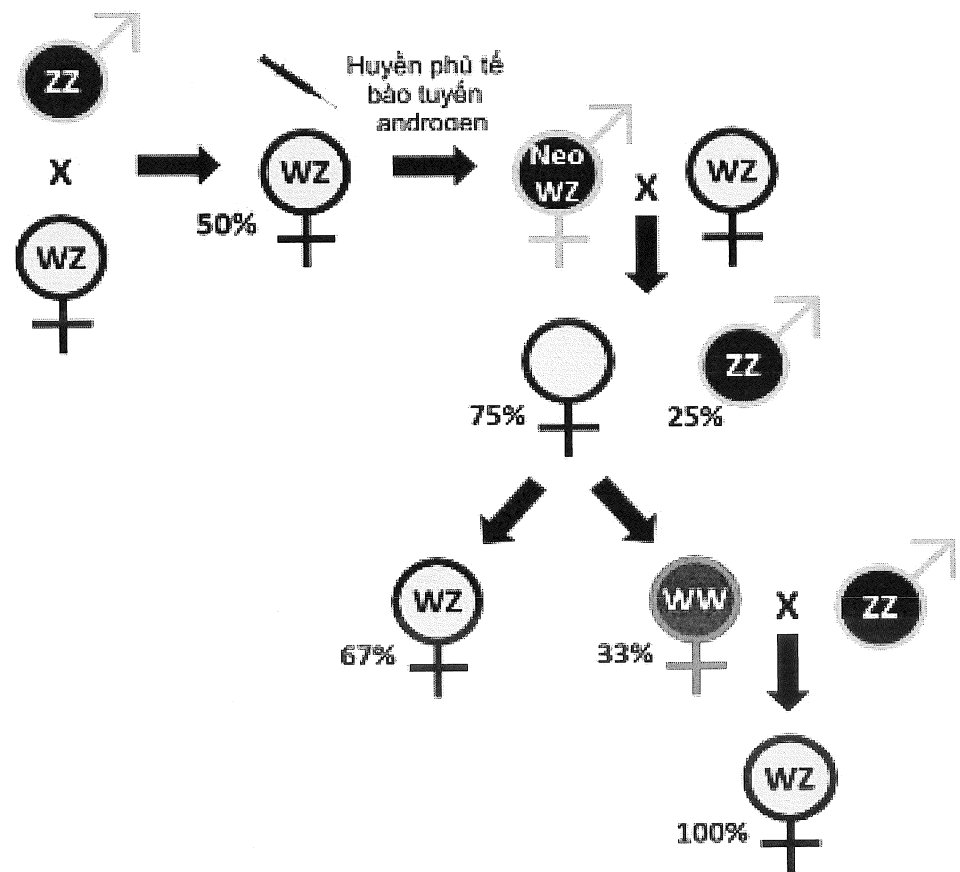
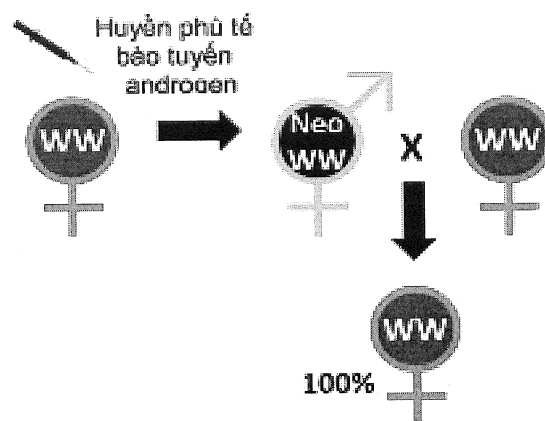
Pha 1:**Pha 2:**

Fig. 1

2/13
Tuyến androgen
nguyên vẹn

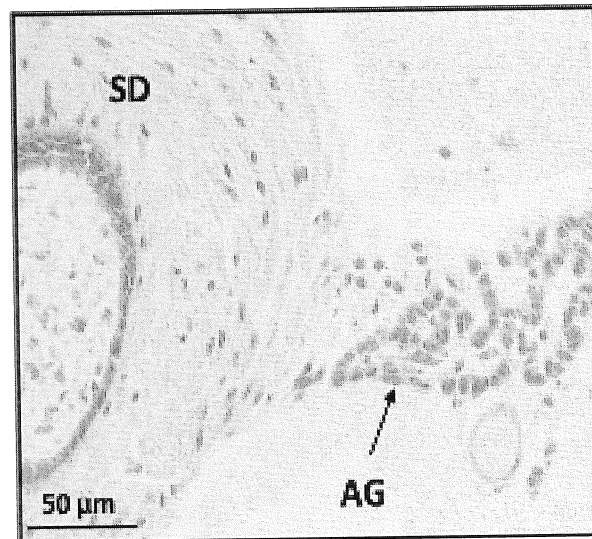


Fig. 2A

Tuyến androgen phì đại

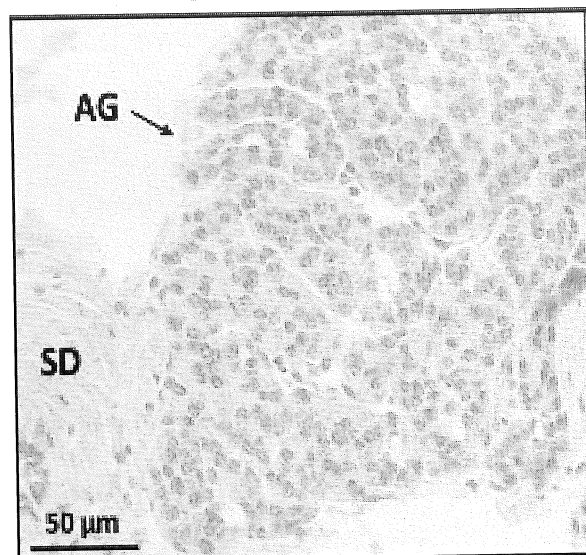


Fig. 2B

3/13

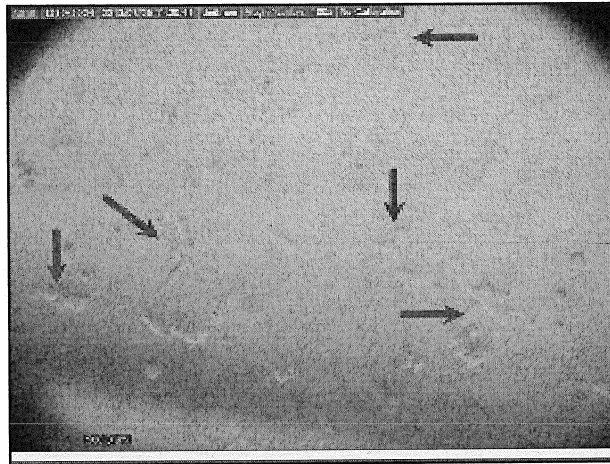


Fig. 3A

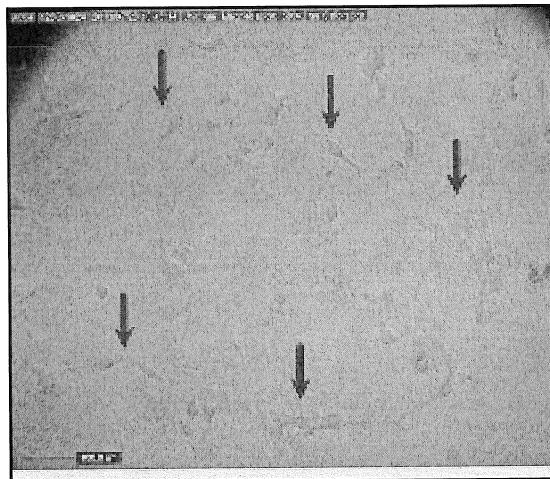


Fig. 3B

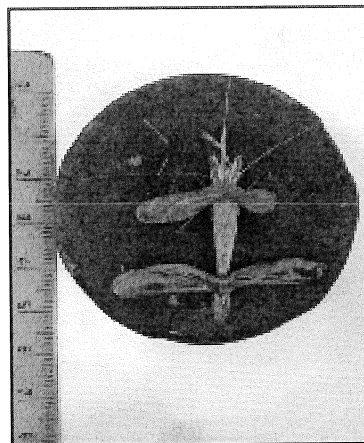


Fig. 4A

4/13

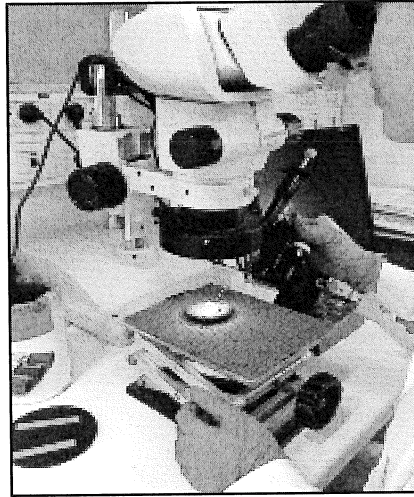


Fig. 4B

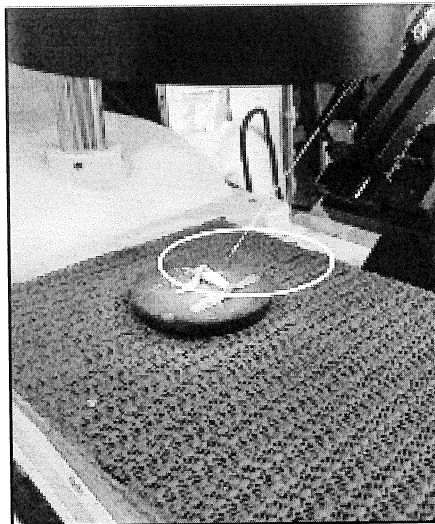


Fig. 4C

5/13

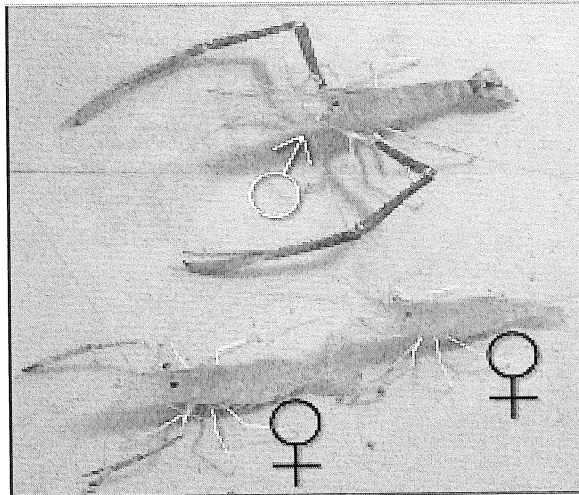


Fig. 5A

Chân bơi thứ hai

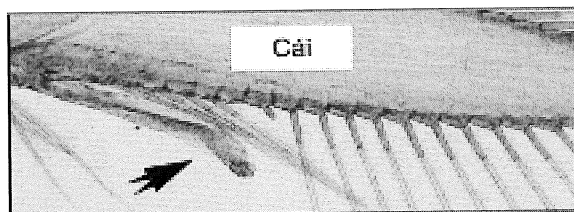
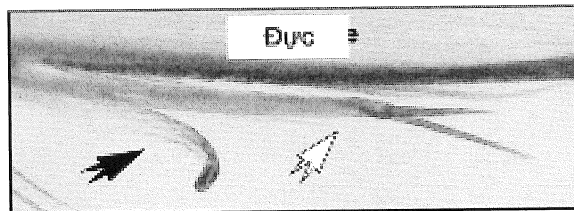


Fig. 5B

6/13

PL#:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30		
Phát triển AM	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	đôi chứng	
Lỗ sinh sản	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	đôi chứng	
Đặc hiệu cái																																
Đôi chứng dương																																

Fig. 6

7/13

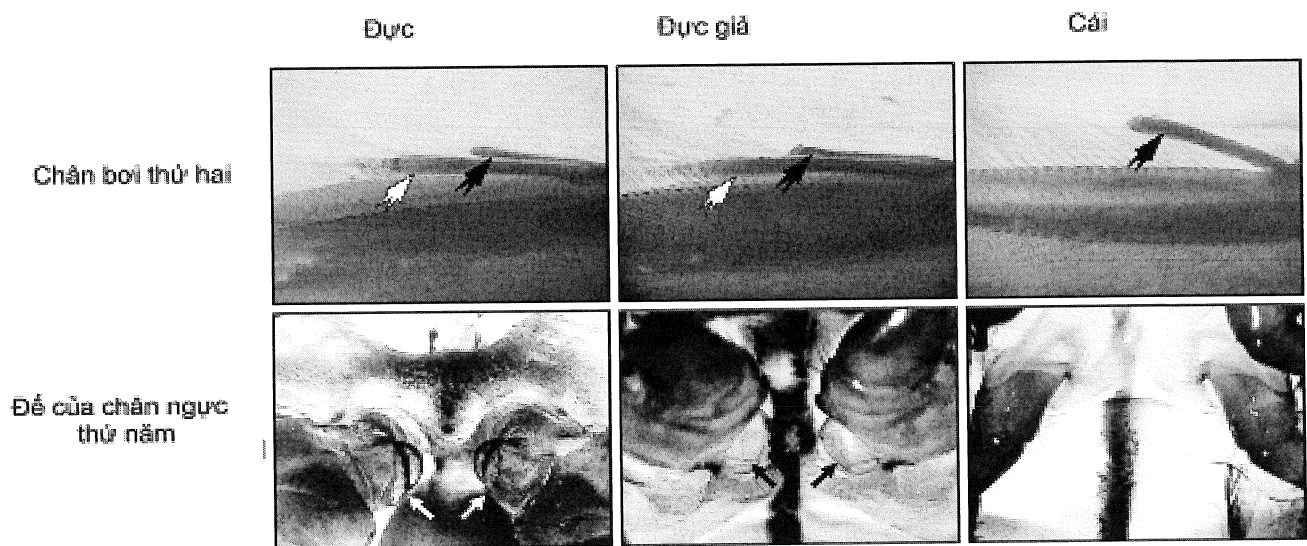


Fig. 7

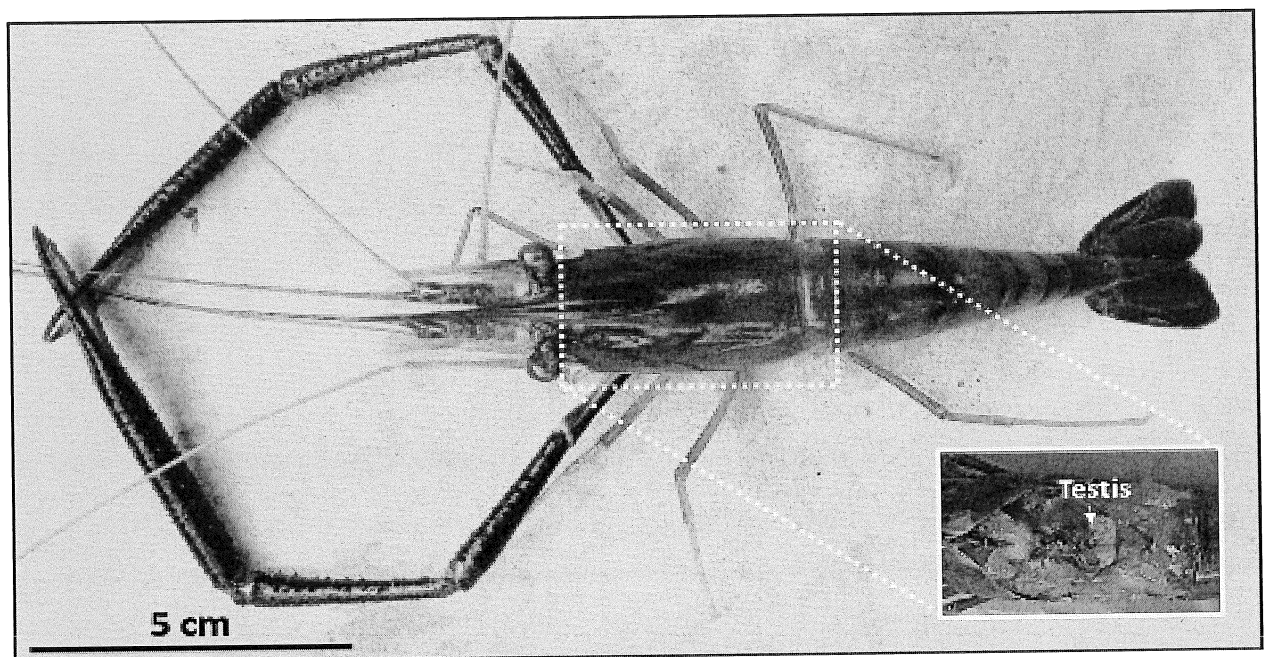


Fig. 8

8/13

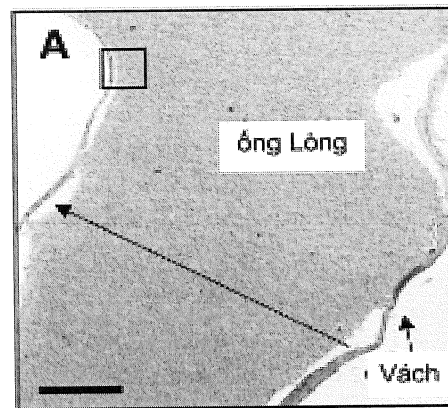


Fig. 9A

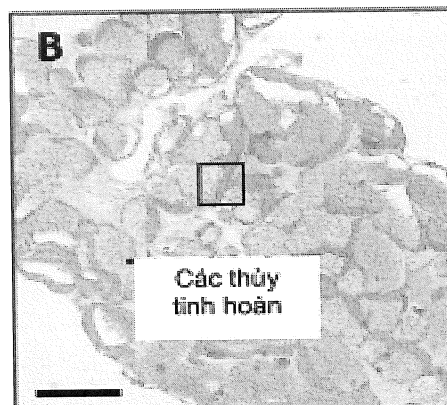


Fig. 9B

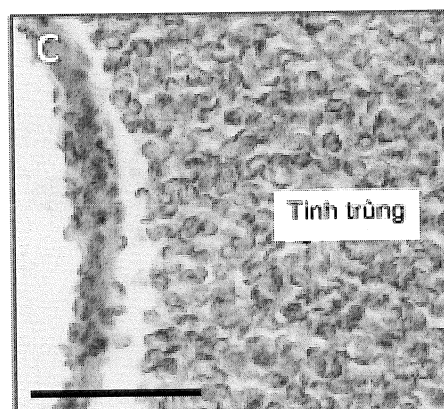


Fig. 9C

9/13

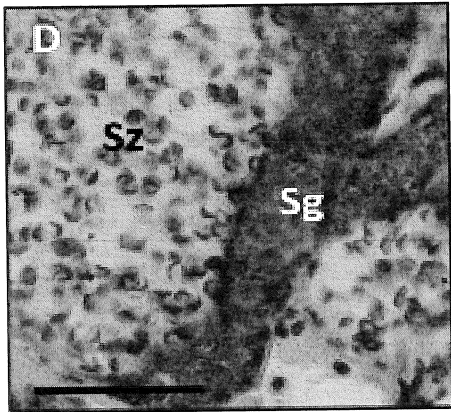


Fig. 9D

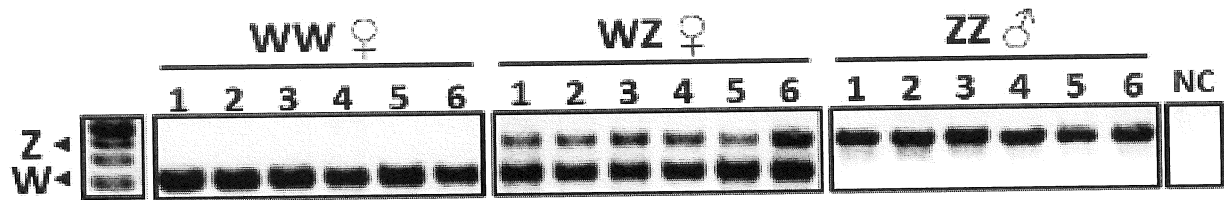


Fig. 10

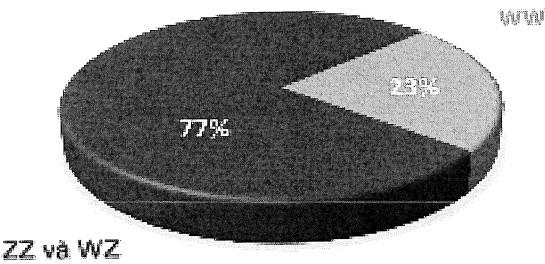


Fig. 11A

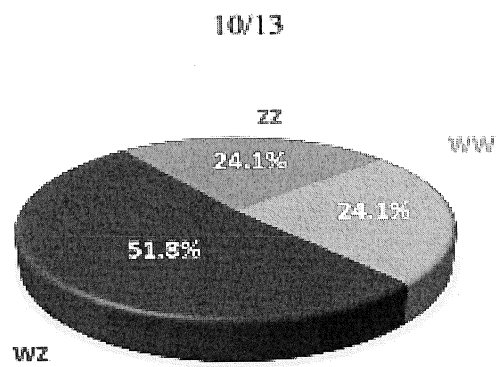


Fig. 11B

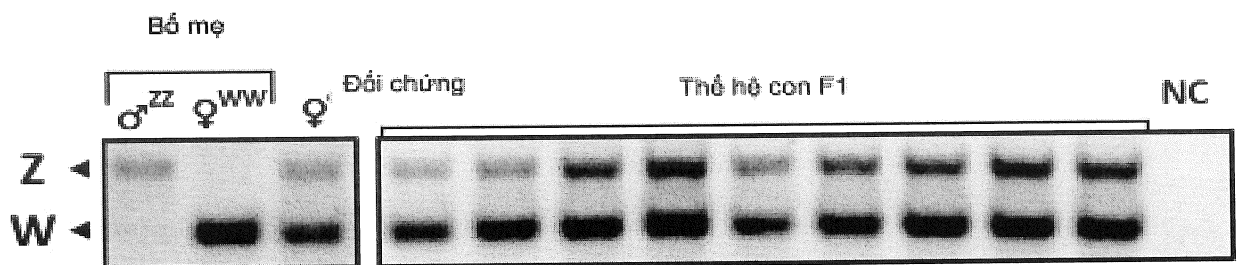


Fig. 12

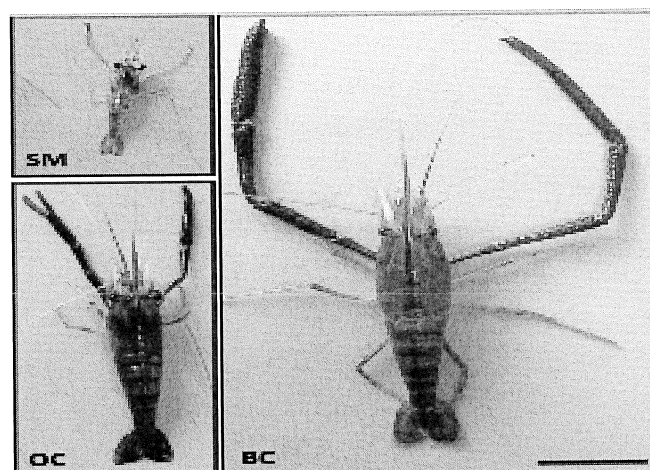


Fig. 13A

11/13

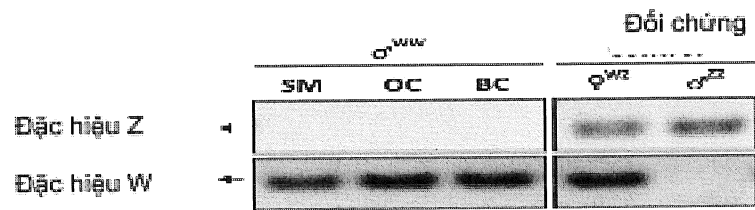


Fig. 13B

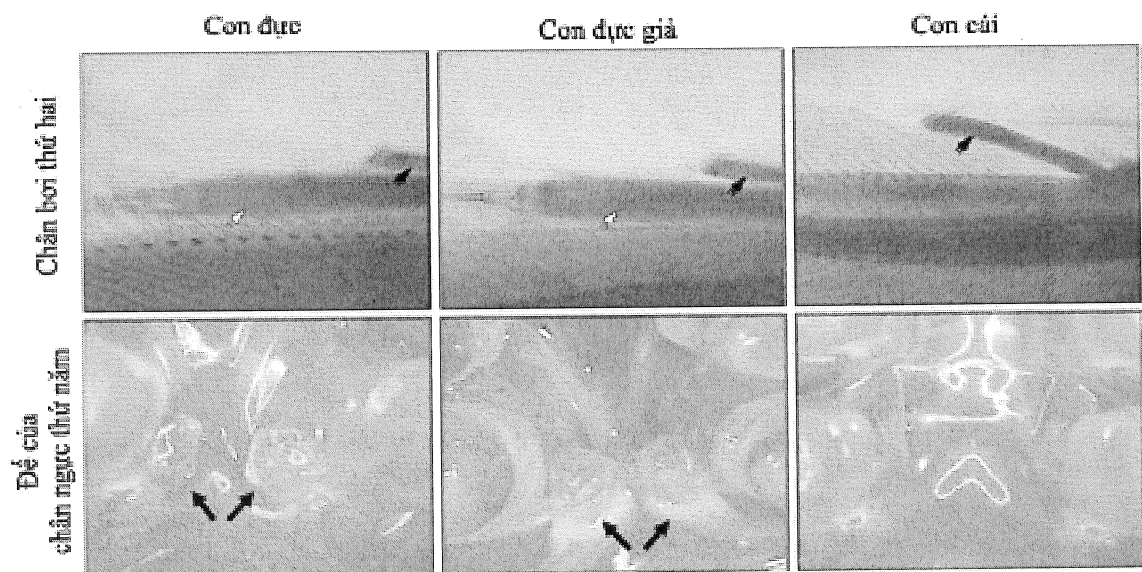


Fig. 14

12/13

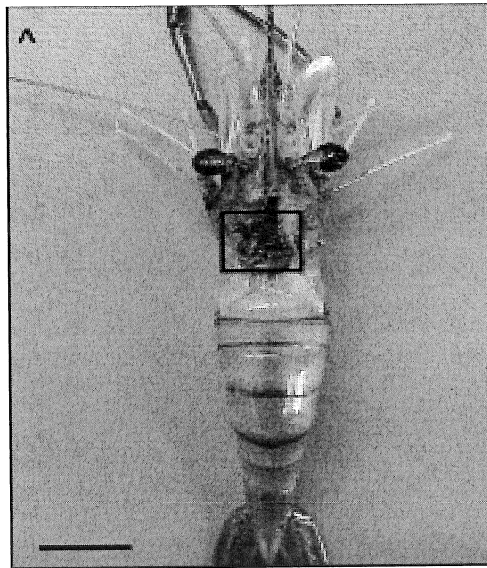


Fig. 15A

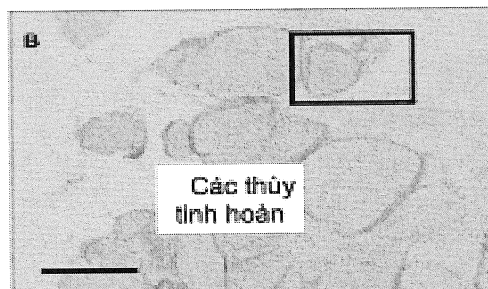


Fig. 15B

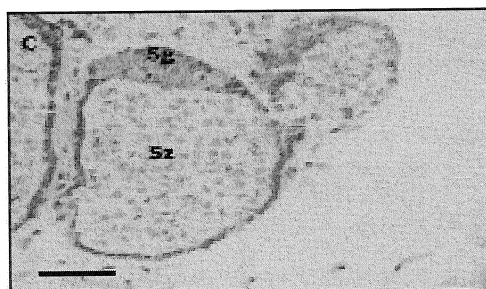


Fig. 15C

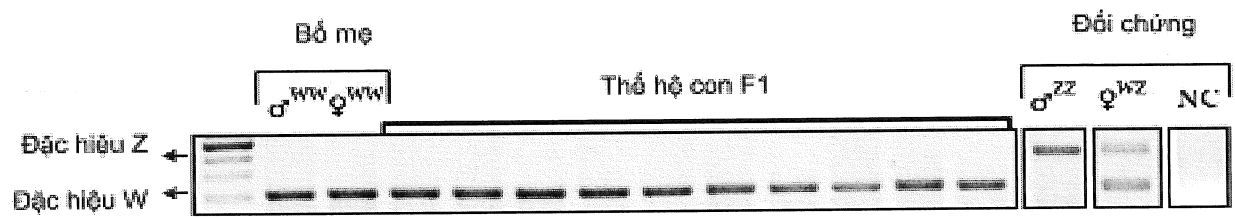


Fig. 16