



(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)



1-0036687

(51)⁸ A23G 1/30

(13) B

(21) 1-2017-02263

(22) 11/01/2016

(86) PCT/US2016/012911 11/01/2016

(87) WO2016/112396 14/07/2016

(30) 62/101,917 09/01/2015 US

(45) 25/08/2023 425

(43) 25/10/2017 355A

(73) MARS, INCORPORATED (US)

6885 Elm St. McLean, Virginia 22101, United States of America

(72) MARELLI, Jean-Philippe (FR); BIZZOTTO, Carolina Schaper (BR); ROYAERT, Stefan Emiel (BE); NWOSU, Chigozie V. (US); MOTOMAYOR ARIAS, Juan Carlos (US); CAMPOS, Rodrigo (MX).

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

(54) PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT THỰC VẬT LAI HOẶC HẠT GIỐNG LAI CỦA
THEOBROMA CACAO VÀ THEOBROMA GRANDIFLORUM

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất thực vật lai hoặc hạt giống lai của *Theobroma cacao* và *Theobroma grandiflorum*, bao gồm các bước sau: (a) lai chéo giống *Theobroma cacao* và giống *Theobroma grandiflorum* để thu được các hạt giống thế hệ sau từ đó; (b) phân tích ít nhất một phần các hạt giống thế hệ sau nêu trên về sự có mặt của chất đánh dấu dạng đa hình nucleotit đơn biểu thị dòng thực vật lai của *Theobroma cacao* và *Theobroma grandiflorum*, trong đó chất đánh dấu dạng đa hình nucleotit đơn này là w17s189(T/C), e0050s274(C/T), CIR211s1036(T/A), c3s595(C/A), w3 s41(G/T), w8s131(T/C), w3s558(A/G), hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng; và (c) chọn lọc một hoặc nhiều hạt giống lai từ các hạt giống thế hệ sau được phân tích trong bước (b) để sản xuất thực vật lai hoặc hạt giống lai mong muốn.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp lai các loài thuộc chi *Theobroma* để thu được hạt giống lai, thực vật lai và sản phẩm thực vật lai. Cụ thể, sáng chế đề cập đến hạt giống lai, thực vật lai và sản phẩm thực vật lai của *Theobroma cacao* và *Theobroma grandiflorum*, cũng như phương pháp sản xuất và xác định hạt giống lai, thực vật lai và sản phẩm thực vật lai này. Sáng chế cũng đề cập đến thực phẩm, như sản phẩm ca cao thu được từ hạt giống lai, thực vật lai và sản phẩm thực vật lai của *Theobroma cacao* và *Theobroma grandiflorum*, cũng như phương pháp sản xuất sản phẩm ca cao này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Chi *Theobroma* bao gồm 22 loài được phân loại thành 6 nhóm theo đặc tính hình thái: *Andropetalum*; *Glossopetalum*; *Oreanthes*; *Rhytidocarpus*; *Telmatocarpus*; và *Theobroma* (Cuatrecasas, 1964). Các loài đại diện từ toàn bộ các nhóm, ngoại trừ *Andropetalum* (*Theobroma grandiflorum*, *Theobroma obovatum*, *Theobroma subincanum*, *Theobroma speciosum*, *Theobroma sylvestre*, *Theobroma microcarpum*, *Theobroma bicolor*, *Theobroma cacao*) xuất hiện tự nhiên ở Brazilian Amazon.

Hàm lượng axit béo và triaxylglyxerol của bơ ca cao khác biệt đáng kể giữa các chất béo có trong hạt giống của các loài *Theobroma* khác nhau (Carpenter et al., 1994; Gilabert-Escriva et al., 2002). Các thành phần axit béo thông thường của các loài *Theobroma* khác nhau được thể hiện trên Fig.1 (được trích dẫn từ Bảng 2 trong tài liệu Gilabert-Escriva et al.).

Các thực vật lai tự nhiên giữa các loài *Theobroma* là hiếm gặp, tuy nhiên đã có báo cáo về hiện tượng lai tự nhiên này, chủ yếu giữa các loài thuộc nhóm *Glossopetalum* (Silva et al., 2004). Một trong số các thực vật lai tự nhiên giả định này (5 thực vật lai *Theobroma grandiflorum* và *Theobroma subincanum*) vẫn tồn tại trong bộ sưu tập phôi mầm CEPLAC ở Marituba, Para state (Silva et al., 2004). Các thực vật lai tự nhiên giữa *Theobroma cacao* và *Theobroma grandiflorum* không tồn tại.

Thử nghiệm lai giữa các loài thuộc chi *Theobroma* đã được thực hiện lần đầu vào năm 1937 ở Trinidad, nhưng chỉ có một vài kết quả sơ bộ được báo cáo (Posnette 1945).

Một loạt các thử nghiệm lai giữa các loài *Theobroma* ở Brazil được thực hiện trong khoảng thời gian từ 1945 đến 1951, bởi George O'Neill Addison và Rosendo Tavares tại “*Instituto Agrônomico do Norte*”, ở Belem, Para, Brazil, và các thực vật lai này được mô tả chi tiết trong tài liệu Addison & Tavares 1951; 1952. Các thực vật lai này bao gồm toàn bộ các loài thuộc chi *Theobroma* ở Brazil và chi *Herrania* liên quan (*H. mariae*).

Quá trình lai giữa các loài *Theobroma* từ các nhóm riêng biệt, lần đầu tiên được cho là vô cùng khó khăn, đã được chứng minh là có thể. Có báo cáo về thực vật trưởng thành từ các thực vật lai giữa các loài thuộc nhóm *Glossopetalum* và *Andropetalum* (các thực vật lai giữa *T. angustifolium* và *T. mammosum*; và giữa *T. simiarum* và *T. mammosum* thu được ở CATIE, Costa Rica (Cuatrecasas 1964)). Thực vật lai nội loài thành công bao gồm *Theobroma cacao* đã thu được, theo báo cáo (Silva et al., 2004), dưới dạng quả lai giữa *Theobroma cacao* x *T. mammosum*, *Theobroma cacao* x *T. simiarum*, và *Theobroma cacao* x *Theobroma speciosum*; thực vật lai chưa trưởng thành từ *Theobroma cacao* x *Theobroma microcarpum* và *Theobroma cacao* x *T. angustifolium*; và thực vật lai trưởng thành từ *Theobroma cacao* x *Theobroma grandiflorum*. Có báo cáo về thực vật lai chưa trưởng thành từ *Theobroma grandiflorum* (nhóm *Glossopetalum*) và *Theobroma cacao* (nhóm *Theobroma*) được xác định chủ yếu dựa trên đặc điểm lá (Martinson 1966).

Do đó, các thực vật lai nội loài bao gồm *Theobroma cacao* và các loài *Theobroma* đã đạt được mức độ phát triển quả và thực vật khác nhau (Silva et al. 2004). Nhìn chung, *Theobroma cacao* đã được sử dụng làm thực vật mẹ, và thực vật lai chưa trưởng thành giả định thành công đã thu được ít nhất từ các thực vật lai bao gồm *Theobroma microcarpum* (nhóm *Telmatocarpus*), *Theobroma angustifolium* và *Theobroma grandiflorum* (nhóm *Glossopetalum*), nhưng các thực vật này đã ngừng phát triển sau khi đạt được chiều cao khoảng 10 đến 15cm. Do đó, các thực vật lai giả định này, bao gồm các thực vật lai đã được ghi nhận giữa *Theobroma cacao* và *Theobroma grandiflorum*, cho đến nay đã tạo ra thực vật không có khả năng sinh trưởng độc lập hoặc ra hoa, quả, và/hoặc hạt giống. Hơn nữa, cho đến nay, các hạt thu được từ các thực vật lai của *Theobroma cacao* và *Theobroma grandiflorum* bất kỳ này chưa được phân tích hóa học, hoặc sử dụng để sản xuất sản phẩm ca cao, như ca cao lỏng.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề cập đến thực vật lai *Theobroma*, như thực vật lai của *Theobroma cacao* và *Theobroma grandiflorum*, và bộ phận của nó, như hoa, cũng như hạt giống thu được từ quá trình lai chéo *Theobroma cacao* và *Theobroma grandiflorum*. Sản phẩm lai, như hạt giống thu được từ quá trình lai chéo *Theobroma cacao* và *Theobroma grandiflorum*, có thành phần hóa học được cải biến, như hàm lượng axit béo được cải tiến và/hoặc hàm lượng alkaloit được cải biến so với *Theobroma cacao* và/hoặc *Theobroma grandiflorum*. Theo một số phương án, sản phẩm lai có các đặc tính, như hàm lượng axit palmitic thấp hơn *Theobroma cacao*; và/hoặc hàm lượng theobromin thấp hơn *Theobroma cacao*. Theo các phương án khác, sản phẩm lai chứa axit tetramethyluric. Theo các phương án khác, thực vật lai và/hoặc sản phẩm lai chứa một hoặc nhiều chất đánh dấu dạng đa hình nucleotit đơn sau: w17s189(T/C), e0050s274(C/T), CIR211s1036(T/A), w11s867(T/C), w8s204(T/C), c3s595(C/A), w3s41(G/T), w8s131(T/C), w3s558(A/G), và tổ hợp bất kỳ của nó. Theo các phương án khác, thực vật lai và sản phẩm thực vật có một hoặc nhiều đặc tính và/hoặc chất đánh dấu dạng đa hình nucleotit đơn nêu trên.

Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất thực vật lai của *Theobroma*, như thực vật lai của *Theobroma cacao* và *Theobroma grandiflorum*, và bộ phận của nó, như hoa, cũng như phương pháp sản xuất hạt giống từ quá trình lai chéo *Theobroma cacao* và *Theobroma grandiflorum*. Theo một số phương án, phương pháp sản xuất thực vật lai *Theobroma cacao* và *Theobroma grandiflorum* và/hoặc hạt giống của thực vật lai *Theobroma cacao* và *Theobroma grandiflorum* bao gồm bước lai chéo giống *Theobroma cacao* và giống *Theobroma grandiflorum* và thu nhận hạt giống từ đó, và chọn lọc hạt giống và/hoặc thực vật thu được từ quá trình lai chéo. Hạt giống và/hoặc thực vật có thể được chọn lọc dựa trên các đặc tính sau, như hạt giống và/hoặc thực vật có hàm lượng axit palmitic thấp hơn *Theobroma cacao*; hàm lượng theobromin thấp hơn *Theobroma cacao*; sự có mặt của axit tetramethyluric; và/hoặc một hoặc nhiều chất đánh dấu dạng đa hình nucleotit đơn sau: w17s189(T/C), e0050s274(C/T), CIR211s1036(T/A), w11s867(T/C), w8s204(T/C), c3s595(C/A), w3s41 (G/T), w8s131 (T/C), w3s558(A/G), và tổ hợp bất kỳ của chúng. Sáng chế cũng đề cập đến thực vật lai và sản phẩm thực vật (ví dụ hạt giống) được sản xuất bằng phương pháp này.

Theo các phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất thực vật lai của *Theobroma cacao* và *Theobroma grandiflorum*, bao gồm bước (a) xác định xem hạt

giống được sản xuất bằng cách lai chéo giống *Theobroma cacao* và giống *Theobroma grandiflorum* có một hoặc nhiều đặc tính sau hay không: hàm lượng axit palmitic thấp hơn *Theobroma cacao*; hàm lượng theobromin thấp hơn *Theobroma cacao*; sự có mặt của axit tetramethyluric; và/hoặc một hoặc nhiều chất đánh dấu dạng đa hình nucleotit đơn sau: w17s189(T/C), e0050s274(C/T), CIR211s1036(T/A), w11s867(T/C), w8s204(T/C), c3s595(C/A), w3s41(G/T), w8s131(T/C), w3s558(A/G), và tổ hợp bất kỳ của chúng; và (b) gieo hạt giống có một hoặc nhiều đặc tính và/hoặc chất đánh dấu dạng đa hình nucleotit đơn nêu trên thu được trong bước (a) để thu được thực vật lai của *Theobroma cacao* và *Theobroma grandiflorum*. Sáng chế cũng đề cập đến thực vật lai được sản xuất bằng phương pháp này.

Theo các phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất thực vật lai của *Theobroma cacao* và *Theobroma grandiflorum*, bao gồm bước (a) lai chéo giống *Theobroma cacao* và giống *Theobroma grandiflorum* và thu nhận hạt giống từ đó; (b) xác định xem hạt giống thu được trong bước (a) có một hoặc nhiều đặc tính sau hay không: hàm lượng axit palmitic thấp hơn *Theobroma cacao*; hàm lượng theobromin thấp hơn *Theobroma cacao*; sự có mặt của axit tetramethyluric; và/hoặc một hoặc nhiều chất đánh dấu dạng đa hình nucleotit đơn sau: w17s189(T/C), e0050s274(C/T), CIR211s1036(T/A), w11s867(T/C), w8s204(T/C), c3s595(C/A), w3s41(G/T), w8s131(T/C), w3s558(A/G), và tổ hợp bất kỳ của chúng; và (c) gieo hạt giống có một hoặc nhiều đặc tính và/hoặc chất đánh dấu dạng đa hình nucleotit đơn nêu trên thu được trong bước (b) để thu được thực vật lai của *Theobroma cacao* và *Theobroma grandiflorum*. Sáng chế cũng đề xuất thực vật lai được sản xuất bằng phương pháp này.

Theo các phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất thực vật lai của *Theobroma cacao* và *Theobroma grandiflorum*, bao gồm bước (a) lai chéo giống *Theobroma cacao* và giống *Theobroma grandiflorum* và thu nhận hạt giống lai từ đó; (b) gieo hạt giống lai thu được trên môi trường sinh trưởng và ủ chúng trong buồng sinh trưởng cho đến khi thu được các thực vật lai chưa trưởng thành; (c) chuyển các thực vật lai chưa trưởng thành thu được vào giá thể thích hợp; và (d) tùy ý ghép các thực vật lai chưa trưởng thành này lên thực vật. Theo các phương án khác, sau bước (a), và trước bước (b), mẫu hạt được tách và thành phần hóa học và/hoặc thành phần chất đánh dấu được phân tích. Theo các phương án khác, chỉ hạt giống có một số đặc tính nhất định, như các đặc tính và/hoặc chất đánh dấu dạng đa hình nucleotit đơn nêu trên, được gieo

trong bước (b). Sáng chế cũng đề cập đến thực vật lai được sản xuất bằng phương pháp này.

Sáng chế đề cập đến phương pháp xác định, chọn lọc, sàng lọc và/hoặc kiểm chứng thực vật lai của *Theobroma cacao* và/hoặc *Theobroma grandiflorum* hoặc bộ phận của chúng, cũng như hạt giống thu được từ *Theobroma cacao* và/hoặc *Theobroma grandiflorum*. Thực vật lai, bộ phận thực vật và/hoặc hạt giống có thể được xác định, chọn lọc, sàng lọc và/hoặc kiểm chứng dựa trên một số đặc tính nhất định, như hàm lượng axit palmitic thấp hơn *Theobroma cacao*; hàm lượng theobromin thấp hơn *Theobroma cacao*; sự có mặt của axit tetramethyluric; và/hoặc một hoặc nhiều chất đánh dấu dạng đa hình nucleotit đơn sau: w17s189(T/C), e0050s274(C/T), CIR211s1036(T/A), w11s867(T/C), w8s204(T/C), c3s595(C/A), w3s41(G/T), w8s131(T/C), w3s558(A/G), và tổ hợp bất kỳ của chúng. Theo các phương án cụ thể, thực vật lai, bộ phận thực vật và/hoặc hạt giống có thể được xác định, chọn lọc, sàng lọc và/hoặc kiểm chứng dựa trên sự có mặt của axit tetramethyluric và/hoặc một hoặc nhiều chất đánh dấu dạng đa hình nucleotit đơn sau: w17s189(T/C), e0050s274(C/T), CIR211s1036(T/A), w11s867(T/C), w8s204(T/C), c3s595(C/A), w3s41(G/T), w8s131(T/C), w3s558(A/G), và tổ hợp bất kỳ của chúng.

Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất thực vật bao gồm bước (a) chọn lọc thực vật thể hệ sau thu được từ quá trình lai chéo giống *Theobroma cacao* và giống *Theobroma grandiflorum*, trong đó thực vật thể hệ sau hoặc hạt giống của thực vật thể hệ sau có một hoặc nhiều đặc tính sau: hàm lượng axit palmitic thấp hơn *Theobroma cacao*; hàm lượng theobromin thấp hơn *Theobroma cacao*; sự có mặt của axit tetramethyluric; và/hoặc một hoặc nhiều chất đánh dấu dạng đa hình nucleotit đơn sau: w17s189(T/C), e0050s274(C/T), CIR211s1036(T/A), w11s867(T/C), w8s204(T/C), c3s595(C/A), w3s41(G/T), w8s131(T/C), w3s558(A/G), và tổ hợp bất kỳ của chúng; và (b) lai chéo thực vật thể hệ sau với một thực vật khác. Theo các phương án khác, phương pháp này còn bao gồm bước lai chéo giống *Theobroma cacao* và giống *Theobroma grandiflorum*. Theo phương án bất kỳ, thực vật khác có thể là *Theobroma cacao* hoặc *Theobroma grandiflorum*, như một trong số thực vật cha mẹ được sử dụng trong lai chéo *Theobroma cacao* và *Theobroma grandiflorum*.

Sáng chế đề cập đến phương pháp phân tích thực vật lai hoặc hạt giống lai của *Theobroma cacao* và *Theobroma grandiflorum* thu được bằng cách lai chéo *Theobroma*

cacao và *Theobroma grandiflorum*, bao gồm bước (a) lai chéo giống *Theobroma cacao* và giống *Theobroma grandiflorum* và thu nhận hạt giống từ đó; (b) tách mẫu hạt giống này, và (c) phân tích thành phần hóa học và/hoặc thành phần gen của hạt giống này. Theo một số phương án, 1/3 hạt giống được tách. Theo các phương án khác, ít nhất 100mg hạt giống được tách. Theo các phương án khác, phương pháp này bao gồm bước phân tích axit béo, flavanol, và/hoặc metyl xanthen. Theo các phương án khác, phương pháp này bao gồm bước phân tích axit palmitic, theobromin, và/hoặc axit tetrametylic. Theo các phương án khác, phương pháp này bao gồm bước phân tích chất đánh dấu dạng đa hình nucleotit đơn biểu thị dòng thực vật lai của *Theobroma cacao* và *Theobroma grandiflorum*, như w17s189 (T/C), e0050s274(C/T), CIR211s1036(T/A), w11s867(T/C), w8s204(T/C), c3s595(C/A), w3s41(G/T), w8s131(T/C), w3s558(A/G), hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng.

Sáng chế đề cập đến sản phẩm thu được bằng, hoặc có nguồn gốc từ, thực vật lai hoặc sản phẩm lai theo sáng chế (ví dụ hạt giống thu được từ quá trình lai chéo *Theobroma cacao* và *Theobroma grandiflorum*), cụ thể là thực phẩm. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất sản phẩm ca cao, như ca cao lỏng, thu được bằng cách chế biến quả thu được từ quá trình lai chéo *Theobroma cacao* và *Theobroma grandiflorum*. Theo các phương án khác, sáng chế cũng đề cập đến sản phẩm ca cao có nhiệt độ nóng chảy và/hoặc nhiệt độ kết tinh cao hơn sản phẩm ca cao tương ứng thu được chỉ từ *Theobroma cacao*. Theo các phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất sản phẩm ca cao từ sản phẩm thực vật theo sáng chế (ví dụ hạt giống thu được từ *Theobroma cacao* và *Theobroma grandiflorum*). Theo các phương án khác, sáng chế cũng đề cập đến phương pháp sản xuất sản phẩm ca cao có nhiệt độ nóng chảy và/hoặc nhiệt độ kết tinh cao hơn sản phẩm ca cao thu được chỉ từ *Theobroma cacao*.

Các dấu hiệu và ưu điểm khác của sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn dưới đây.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Fig.1 là bảng thể hiện hàm lượng axit béo của các loài *Theobroma* khác nhau.

Fig.2 là hình ảnh thể hiện bước thụ phấn được thực hiện theo một khía cạnh của sáng chế, trong đó Fig.2A là hình ảnh thể hiện phương pháp bảo vệ được áp dụng cho nụ *Theobroma cacao* chưa nở một ngày trước khi thụ phấn. Fig.2B là hình ảnh thể hiện hoa của *Theobroma grandiflorum* được sử dụng làm nguồn phấn hoa, Fig.2C là hình ảnh thể

hiện phương pháp thụ phấn bằng tay, và Fig.2D là hình ảnh thể hiện hoa của *Theobroma cacao* 5 ngày sau thụ phấn.

Fig.3 là hình ảnh thể hiện phương pháp thu nhận hạt giống theo một phương án của sáng chế, trong đó Fig.3A là hình ảnh thể hiện quả thu được sau khi thụ phấn như được thể hiện trên Fig.2, Fig.3B là hình ảnh thể hiện thực vật lai sinh trưởng trên môi trường sinh trưởng thực vật thân gỗ, và Fig.3C là hình ảnh thể hiện mẫu hạt để đông khô.

Fig.4 là hình ảnh thể hiện mức độ khác biệt giữa (A) hạt giống của *Theobroma cacao*, (B) hạt giống của *Theobroma grandiflorum*, và (C-D) hạt giống lai thu được từ quả lai, toàn bộ các hạt này không chứa vỏ ngoài.

Fig.5 là hình ảnh thể hiện phương pháp thu nhận mẫu hạt để phân tích, trong đó một đoạn lá mầm được sử dụng để phân tích hóa học, và đoạn còn lại được trồng trên môi trường sinh trưởng.

Fig.6 là hình ảnh thể hiện hạt giống lai chưa trưởng thành được thích nghi với điều kiện khí hậu trong buồng ươm.

Fig.7 là hình ảnh thể hiện hoa được sản sinh bởi thực vật lai MCGH-067-002-31.

Fig.8A và Fig.8B là hình ảnh thể hiện thực vật lai Tc x Tg được ghép lên đỉnh thân rễ của *Theobroma grandiflorum*. Fig.8A là hình ảnh thể hiện thực vật lai MCGH-031-011-36, và Fig.8B là hình ảnh thể hiện thực vật lai MCGH-023-009-11.

Fig.9 là bảng thể hiện phân bố hàm lượng axit palmitic của các thực vật lai khác nhau được đánh giá bằng phép kiểm định Shapiro-Wilk ở xác suất bằng 5%. “Lượng” thể hiện lượng hạt giống được đánh giá cho mỗi thực vật lai cụ thể.

Fig.10 là biểu đồ thể hiện các thực vật lai có phân bố hàm lượng axit palmitic bình thường. Số lượng thực vật lai được thể hiện ở phía trên mỗi biểu đồ, trục x tương ứng với tỷ lệ phần trăm của axit palmitic, và trục y tương ứng với mật độ (hoặc tần suất) của các trị số.

Fig.11 là biểu đồ thể hiện các thực vật lai có phân bố hàm lượng axit palmitic không bình thường. Số lượng thực vật lai được thể hiện ở phía trên mỗi biểu đồ, trục x tương ứng với tỷ lệ phần trăm của axit palmitic, và trục y tương ứng với mật độ (hoặc tần suất) của các trị số.

Fig.12 là biểu đồ thể hiện thực vật lai số 31 (tương ứng với NA-45 x MCGS-122),

có phân bố hàm lượng axit palmitic bình thường được thể hiện bởi các mẫu được thu nhận vào năm 2012 và 2013.

Fig.13 là biểu đồ thể hiện thực vật lai số 31, có phân bố hàm lượng theobromin được thể hiện bởi các mẫu được thu nhận vào năm 2012 và 2013.

Fig.14 là biểu đồ thể hiện thực vật lai số 31, có phân bố hàm lượng cafein bình thường được thể hiện bởi các mẫu được thu nhận vào năm 2012 và 2013.

Fig.15 là biểu đồ thể hiện thực vật lai số 31, có phân bố hàm lượng axit tetrametyluric được thể hiện bởi các mẫu được thu nhận vào năm 2012 và 2013.

Fig.16 là bảng thể hiện hàm lượng của catechin và epicatechin có trong hạt giống thu được từ hai thực vật lai số 61 (tương ứng với ALMC5 x MCSG-46) và 64 (tương ứng với LCT37A x MCSG-122).

Fig.17 là bảng thể hiện hàm lượng của flavanol ca cao tổng số có trong hạt giống thu được từ hai thực vật lai số 61 và 64.

Fig.18A và Fig.18B là bảng thể hiện các giống *Theobroma cacao* và *Theobroma grandiflorum* được sử dụng để sản xuất thực vật lai.

Fig.19A và Fig.19B là bảng thể hiện 81 thực vật lai được đánh giá.

Fig.20A và Fig.20B là bảng thể hiện kiểu gen của *Theobroma cacao* và *Theobroma grandiflorum* được sử dụng để sản xuất thực vật lai chứa 22 chất đánh dấu dạng đa hình nucleotit đơn.

Fig.21A và Fig.21B là bảng thể hiện kiểu gen của 81 thực vật lai được đánh giá bằng 11 chất đánh dấu dạng đa hình nucleotit đơn.

Fig.22 là bảng thể hiện các alen của 9 chất đánh dấu dạng đa hình nucleotit đơn có trong thực vật lai đối với 12 dòng thực vật lai khác nhau.

Fig.23 là đồ thị thể hiện hàm lượng palmitic (C16:0) (thanh đồ thị) và theobromin (đường đồ thị), và sự có mặt hoặc vắng mặt của axit tetrametyluric đối với thực vật lai NA-45 x MCSG-122.

Fig.24 là đồ thị thể hiện hàm lượng palmitic (thanh đồ thị) và theobromin (đường đồ thị) để thu nhận hạt giống từ các thực vật lai sau: NA-45 x MCSG-122, EET400 x MCSG-46, và MA-45 x MCSG-46.

Fig.25A và Fig.25B là đồ thị thể hiện nhiệt độ nóng chảy của ca cao lỏng từ *Theobroma grandiflorum* (Tg), hạt giống lai thu được từ NA-45 x MCGS-122, EET400 x MCSG-46, và MA-45 x MCSG-46 (bảng 1-6), hạt giống không lai thu được từ NA-45 x MCGS-122, EET400 x MCSG-46, và MA-45 x MCSG-46 (bảng 7 và 8), và *Theobroma cacao* (LRWA).

Fig.26A và Fig.26B là đồ thị thể hiện nhiệt độ kết tinh của ca cao lỏng từ *Theobroma grandiflorum* (Tg), hạt giống lai thu được từ NA-45 x MCGS-122, EET400 x MCSG-46, và MA-45 x MCSG-46 (bảng 1-6), hạt giống không lai thu được từ NA-45 x MCGS-122, EET400 x MCSG-46, và MA-45 x MCSG-46 (bảng 7 và 8), và *Theobroma cacao* (LRWA).

Fig.27 là đồ thị thể hiện thể hiện nhiệt độ nóng chảy của ca cao lỏng từ *Theobroma grandiflorum* (Tg), hạt giống lai thu được từ NA-45 x MCGS-122, EET400 x MCSG-46, và MA-45 x MCSG-46 (bảng 1-6), và *Theobroma cacao* (LRWA).

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến phương pháp lai các loài thuộc chi *Theobroma* để thu được hạt giống lai, thực vật lai và bộ phận thực vật lai, cụ thể sáng chế đề cập đến phương pháp lai *Theobroma cacao* và *Theobroma grandiflorum*. Sáng chế đề cập đến hạt giống lai và thực vật lai, cũng như hoa, quả và thực vật lai mang hạt của *Theobroma*. Sáng chế đề xuất phương pháp kiểm chứng thực vật thể hệ sau thu được là thực vật lai, và phương pháp xác định và/hoặc chọn lọc thực vật lai của *Theobroma cacao* và *Theobroma grandiflorum*. Sáng chế cũng đề xuất sản phẩm thực vật lai *Theobroma*, như hạt giống thu được từ quá trình lai chéo *Theobroma cacao* và *Theobroma grandiflorum*, có thành phần hóa học được cải biến, như hàm lượng axit béo được cải tiến và/hoặc hàm lượng alkaloid được cải biến. Sáng chế cũng đề cập đến sản phẩm có nguồn gốc từ hạt giống lai hoặc thực vật lai, đặc biệt là thực phẩm, như sản phẩm ca cao.

Các tác giả sáng chế đã ngạc nhiên phát hiện thấy rằng sản phẩm lai của *Theobroma cacao* và *Theobroma grandiflorum*, như hạt giống thu được từ quá trình lai chéo *Theobroma cacao* và *Theobroma grandiflorum*, có các đặc tính nổi trội. Ví dụ, sản phẩm lai của *Theobroma cacao* và *Theobroma grandiflorum* theo sáng chế có hàm lượng axit palmitic thấp hơn *Theobroma cacao*, và/hoặc có hàm lượng theobromin thấp hơn *Theobroma cacao*. Hơn nữa, các tác giả sáng chế cũng đã ngạc nhiên phát hiện thấy rằng

sản phẩm lai của *Theobroma cacao* và *Theobroma grandiflorum* thích hợp để sản xuất sản phẩm ca cao, ví dụ có nhiệt độ nóng chảy và nhiệt độ kết tủa cao hơn *Theobroma cacao*. Các tác giả sáng chế cũng đã xác định được một số chất đánh dấu hóa học và/hoặc chất đánh dấu có thể được sử dụng để xác định và/hoặc chọn lọc thực vật lai của *Theobroma cacao* và *Theobroma grandiflorum*.

Thuật ngữ “thực vật lai” được dùng trong bản mô tả để chỉ thực vật chưa trưởng thành được lai hoàn toàn và là thể dị hợp tử so với thực vật cha mẹ, cũng như thực vật chưa trưởng thành được lai một phần thu được từ quá trình hoán vị gen.

Thuật ngữ “hạt giống” được sử dụng thay thế với thuật ngữ “hột”.

Thuật ngữ “quả” được sử dụng thay thế với thuật ngữ “trái”.

Thuật ngữ “sản phẩm ca cao có khả năng chịu nhiệt” được dùng trong bản mô tả để chỉ sản phẩm ca cao có nhiệt độ nóng chảy cao hơn sản phẩm ca cao được sản xuất chỉ từ *Theobroma cacao*.

Sáng chế đề cập đến sản phẩm lai *Theobroma*, như hạt giống thu được bằng lai chéo *Theobroma cacao* và *Theobroma grandiflorum*, và thực vật được sinh trưởng từ hạt giống lai này. Sản phẩm lai thu được từ quá trình lai chéo hai loài *Theobroma* khác nhau.

Các loài *Theobroma* có thể được sử dụng bao gồm *Theobroma angustifolium*, *Theobroma bicolor*, *Theobroma cacao*, *Theobroma canumanense*, *Theobroma grandiflorum*, *Theobroma mammosum*, *Theobroma microcarpum*, *Theobroma obovatum*, *Theobroma simiarum*, *Theobroma speciosum*, *Theobroma stipulatum*, *Theobroma subincanum*, và *Theobroma sylvestre*. Các loài được ưu tiên sử dụng bao gồm *Theobroma cacao* và *Theobroma grandiflorum*.

Các giống *Theobroma cacao* cụ thể có thể được sử dụng bao gồm ALMC 5, P7-B, ICS39, NA168, ALMC 3, IP268, ICS40, N034, UF 677, NA-45, EET400, P10B, PH85, COCA 3370/5, GU114, AMAZ 12/4, FADA100, LCT 37F, RB37, AMAZ 1515, CA-1.4, CAB-0022, CAB-0266, CCN 10, CCN 51, COMUM, GU- 296H, HUALLAGA-7, HUALLAGA-9, IAC-1, IP 38, LCTEEN-1621010, LCTEEN-37A, LCTEEN-37G, MOQ 4.25, PAIN 9 316, PAQUETA 01, PH 123, PH 9, RB 39, ROSA MARIA, S THIAGO, SC-1, SJ-02, UF-667, VB-1151, VB-1156, VB-276, VB-515, và AMAZ 6.3. Trong số đó, các giống được ưu tiên bao gồm NA-45, ICS-39, ICS-40,

NA-168, NO-34, P-10B, P-7B, PH-85, và ALMC-5. Mỗi giống *Theobroma cacao* nêu trên đã biết trong lĩnh vực này, và vật liệu (ví dụ phôi mầm) của các giống này có thể được truy cập thông qua các cơ sở lưu trữ khác nhau, như *International Cocoa Germplasm Database* (<http://www.icgd.rdg.ac.uk/index.php>), *International Cocoa Collection* (IC3) (<http://catie.ac.cr/en/products-and-services/collections-and-germplasm-banks/international-cocoa-collection>), hoặc *International Cocoa Genebank, Trinidad* (ICG,T) (<http://sta.uwi.edu/cru/GeneticResources.Asp>).

Các giống *Theobroma grandiflorum* cụ thể có thể được sử dụng theo sáng chế bao gồm SUBCANUM, MCSG-17, MCSG-122, MCSG-174, MCSG-134, MCSG-74, MCSG-148, MCSG-36, MCSG-42, MCSG-101, MCSG-30, MCSG-46, MCSG-69, MCSG-89, MCSG-95, MCSG-11, MCSG-139, MCSG-150, MCSG-173, MCSG-2, MCSG-28, MCSG-3, MCSG-37, MCSG-41, MCSG-47, MCSG-98, và MCSG-35. Trong số đó, các giống được ưu tiên bao gồm MCSG-36, MCSG-69, MCSG-89, MCSG-122, MCSG-148, và MCSG-46. Toàn bộ các giống *Theobroma grandiflorum* được ký hiệu là “MCSG” sẵn có từ *Mars Center for Cocoa Science*, Itajuípe, Brazil. Các giống *Theobroma grandiflorum* khác có thể được sử dụng theo sáng chế bao gồm *Mamorano* và *Mamau cultivars*.

Tổ hợp các giống có thể tạo ra thực vật lai theo sáng chế bao gồm 81 thực vật lai được mô tả trong Fig.19A và Fig.19B. Các tổ hợp được ưu tiên bao gồm 37 thực vật lai được mô tả trong Fig.9. Trong số đó, các tổ hợp được ưu tiên hơn bao gồm NA-45 x MCSG-36, ICS-39 x MCSG-69, ICS-40 x MCSG-89, NA-168 x MCSG-89, NA-45 x MCSG-122, NO-34 x MCSG-89, P-10B x MCSG-122, P-7B x MCSG-69, PH-85 x MCSG-148, NA-45 x MCSG-46, ALMC-5 x MCSG-122, và P-7B x MCSG-122.

Theo các phương án khác, sáng chế đề cập đến hạt giống lai và thực vật sinh trưởng từ hạt giống này, bao gồm: MCGH-015-001-13, MCGH-022-002-01, MCGH-022-003-03, MCGH-022-006-04, MCGH-022-020-11, MCGH-023-008-14, MCGH-023-009-01, MCGH-023-009-11, MCGH-023-009-14, MCGH-023-013-02, MCGH-023-014-03, MCGH-023-014-06, MCGH-023-024-14, MCGH-023-037-05, MCGH-023-037-07, MCGH-030-012-04, MCGH-031-006-19, MCGH-031-006-22, MCGH-031-020-16, MCGH-031-028-34, MCGH-031-051-11, MCGH-031-052-34, MCGH-031-057-07, MCGH-031-061-05, MCGH-031-066-01, MCGH-031-066-05, MCGH-031-066-24, MCGH-031-070-10, MCGH-031-072-07, MCGH-031-073-04,

MCGH-031-074-14, MCGH-031-079-06, MCGH-031-079-16, MCGH-031-081-02, MCGH-031-092-09, MCGH-031-095-08, MCGH-031-096-04, MCGH-031-103-09, MCGH-031-104-32, MCGH-031-110-15, MCGH-031-111-16, MCGH-031-113-11, MCGH-031-113-19, MCGH-031-116-03, MCGH-031-119-04, MCGH-031-123-18, MCGH-031-124-02, MCGH-031-69-06, MCGH-033-014-01, MCGH-034-002-12, MCGH-034-006-01, MCGH-059-029-03, MCGH-059-041-13, MCGH-065-010-09, MCGH-067-001-41, MCGH-067-002-31; hoặc MCGH-067-003-06. Ba chữ số thứ nhất thể hiện thực vật lai (được thể hiện trong cột thứ nhất của Fig.19A và Fig.19B), ba chữ số thứ hai thể hiện số lượng quả trong thực vật lai này, và hai chữ số cuối cùng thể hiện số lượng hạt trong quả cụ thể. Ví dụ, “MCGH-015-001-13” thể hiện thực vật lai số 15 (tức là NA-45 x MCSG-36), “001” thể hiện 1 quả từ thực vật lai số 15; và “13” thể hiện 13 hạt của 1 quả từ thực vật lai số 15.

Theo một số khía cạnh, thực vật mẹ được sử dụng trong lai chéo là *Theobroma cacao*. Ví dụ, như được thể hiện trên Fig.2A-2D, hạt phấn của *Theobroma grandiflorum* được rắc lên bộ nhụy của *Theobroma cacao* (cơ quan sinh sản cái của hoa). Các phương pháp sử dụng để chuyển hạt phấn đã biết trong lĩnh vực này, và thường bao gồm bước bảo vệ hoa chưa nở, ví dụ bằng màng chắn như màng nhựa hoặc màng thủy tinh (ví dụ, xem Fig.2A), trong khoảng thời gian nhất định trước khi và cũng tùy ý sau khi thụ phấn bằng tay. Hoa chưa nở có thể được bảo vệ, ví dụ trong khoảng 1 tuần trước khi thụ phấn, tốt hơn nếu 3 ngày trước khi thụ phấn, tốt hơn nữa nếu khoảng 1 ngày trước khi thụ phấn. Hoa đã thụ phấn cũng có thể tùy ý được bảo vệ, ví dụ trong khoảng 1 đến 3 ngày sau thụ phấn.

Sau đó, hoa của thực vật mẹ đã thụ phấn (ví dụ, xem Fig.20) được để trưởng thành trong khoảng thời gian thích hợp để tạo quả. Các quả được thu hoạch và tiếp tục chế biến khi chúng trưởng thành, thường từ 100 đến 200 ngày sau thụ phấn, ví dụ từ 140 đến 160 ngày sau thụ phấn. Ví dụ về các quả thu được được thể hiện trên Fig.3A-3C.

Hạt giống được thu nhận từ các quả. Hạt giống được làm sạch, và vỏ ngoài được tách, ví dụ trong các điều kiện vô trùng. Hình dạng của hạt giống từ *Theobroma cacao* (Fig.4A), *Theobroma grandiflorum* (Fig.4B), và các thực vật lai khác nhau (Fig.4C-Fig.4D) được so sánh. Hình dạng của hạt giống có thể tùy ý được quan sát bằng phương pháp xác định xem quá trình lai chéo có diễn ra không.

Hạt giống có thể được phân tích hóa học và/hoặc gen. Theo một khía cạnh, mẫu lá mầm được tách từ hạt giống và thành phần hóa học và/hoặc thành phần chất đánh dấu của mỗi hạt giống được phân tích, như được thể hiện trên Fig.5. Khi phân tích hóa học và/hoặc gen được thực hiện, lượng vật liệu vừa đủ có thể được tách từ lá mầm để cho phép phân tích được thực hiện mà không ảnh hưởng đến khả năng sống sót của phần hạt giống còn lại. Theo một số khía cạnh, khoảng 1/3 lá mầm hoặc nhỏ hơn được tách để phân tích. Theo các khía cạnh khác, 100mg mô đông khô hoặc cao hơn của hạt giống được sử dụng để phân tích hóa học và/hoặc gen. Phần còn lại của lá mầm có thể được sinh trưởng trên môi trường thích hợp, ví dụ môi trường sinh trưởng thực vật thân gỗ. Theo một số khía cạnh, chỉ các hạt giống được xác định là hạt giống lai (ví dụ bằng cách sử dụng chất đánh dấu hóa học và/hoặc chất đánh dấu dạng đa hình nucleotit đơn) và/hoặc có đặc tính mong muốn (ví dụ hàm lượng axit palmitic thấp hơn *Theobroma cacao*) được sinh trưởng để tạo thực vật chưa trưởng thành và/hoặc thực vật trưởng thành. Theo các khía cạnh khác, hạt giống được xác định là hạt giống lai (ví dụ bằng cách sử dụng chất đánh dấu hóa học và/hoặc chất đánh dấu dạng đa hình nucleotit đơn) và/hoặc có đặc tính mong muốn (ví dụ hàm lượng axit palmitic thấp hơn *Theobroma cacao*) được sử dụng để sản xuất sản phẩm cao cấp. Theo các khía cạnh khác, hạt giống là sản phẩm của quá trình lai không hoàn toàn (ví dụ hạt giống lai hoán vị) được sinh trưởng để tạo thực vật chưa trưởng thành và/hoặc thực vật trưởng thành.

Phân tích thành phần hóa học của hạt giống có thể được thực hiện để xác định hàm lượng của các axit béo, flavanol, và/hoặc alkaloid khác nhau chứa trong đó. Thông thường, mẫu có thể được sấy kết đông trước khi thực hiện phân tích hóa học, do bước này tạo điều kiện thuận lợi cho việc xử lý và thu được kết quả phân tích chính xác. Hàm lượng của các thành phần hóa học khác nhau của hạt giống có thể được xác định bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này.

Ví dụ, hàm lượng axit béo có thể được phân tích bằng phương pháp chiết lipid sử dụng dung môi, sau đó định lượng bằng phương pháp sắc ký (phương pháp sắc ký khí (ví dụ GC-FID, GS-MS), phương pháp sắc ký khí-lỏng (ví dụ GLC-FID, GLC-MS), và phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)). Ví dụ, xem Christie, W.W., (1989) *Gas Chromatography and Lipids: A Practical Guide*, The Oily Press, Dundee; Christie, W.W. (1982) *J. Lipid Res.*, 23, 1072-1075; Ciucanu, I. and Kerek, F., (1984) *J. Chromatography*, 279, 493-506, được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn.

Hàm lượng alkaloit và flavanol có thể được phân tích bằng phương pháp chiết pha lỏng, sau đó định lượng bằng phương pháp quang phổ (ví dụ phương pháp quang phổ tử ngoại khả kiến, IR, NIR, và Raman), phương pháp sắc ký (ví dụ HPLC, GS-MS), hoặc phương pháp điện di mao quản. Ví dụ, xem Blauch, J.L. and Stanley, M. T., “*Determination of Cafein và Theobromin in Coffee, Tea and Instant Hot Cocoa Mixes*,” Journal of Food Science, 48, (1983), pp. 745-747; G.E. Adamson et al., “*HPLC method for the Quantification of Proxynidin in Cocoa and Chocolate Mẫu and Correlation to Total Anti-oxidant Capacity*,” J. Agric. Food Chern. 47, 1999, 4184-4188; M. A. Keirn et al., “*HPLC separation and purification of cacao (Theobroma cacao L.) proxynidin theo degree of polymerization using a diol stationary phase*,” J Agric. Food Chern. 54, 2006, 1571, được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn.

Khi thành phần hóa học của hạt giống đã được phân tích, ví dụ như được thể hiện trên Fig.9-Fig.17, hàm lượng của các hợp chất quan tâm khác nhau có thể được so sánh với thành phần hóa học của thực vật cha mẹ để xác định, ví dụ khi hạt giống là hạt giống lai có tính trạng của một hoặc cả hai thực vật cha mẹ. Hơn nữa, phân tích thành phần hóa học có thể được sử dụng để chọn lọc hạt giống có thành phần hóa học quan tâm. Ví dụ, hàm lượng axit béo của hạt giống có thể được so sánh với hàm lượng axit béo của một hoặc cả hai thực vật cha mẹ (xem Fig.1), hoặc đặc tính thành phần hóa học mong muốn khác.

Ví dụ, theo một số khía cạnh, thực vật lai của *Theobroma cacao* và *Theobroma grandiflorum* được phát triển có đặc tính hàm lượng axit béo được cải biến như so với *Theobroma cacao*. Đặc tính hàm lượng axit béo được cải biến cụ thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, hàm lượng axit béo chứa nhiều liên kết không no được gia tăng (ví dụ axit linoleic), và hàm lượng axit béo no được giảm (ví dụ axit palmitic); và hàm lượng axit béo no stearic được gia tăng, liên quan đến hàm lượng LDL thấp hơn các axit béo no khác.

Theo một số khía cạnh, hàm lượng của axit linoleic được gia tăng khoảng 25%-500%, 50%-250%, hoặc 75%-100% so với *Theobroma cacao* và/hoặc *Theobroma grandiflorum*.

Theo các khía cạnh khác, hàm lượng của axit palmitic của thực vật lai bất kỳ theo sáng chế được giảm khoảng 10%-95%, 25%-75%, hoặc 50%-67% so với *Theobroma*

cacao. Theo các khía cạnh khác, hàm lượng của axit palmitic được đo là tỷ lệ phần trăm của tổng hàm lượng axit béo trong mẫu và nằm trong khoảng từ 7% đến 20%, nằm trong khoảng từ 7% đến 19%, nằm trong khoảng từ 7% đến 18%, nằm trong khoảng từ 7% đến 17%, nằm trong khoảng từ 7% đến 16%, hoặc nằm trong khoảng từ 7% đến 15%. Theo các khía cạnh khác, hàm lượng của axit palmitic được đo là tỷ lệ phần trăm của tổng hàm lượng axit béo trong mẫu và nằm trong khoảng từ 10% đến 20%, nằm trong khoảng từ 10% đến 19%, nằm trong khoảng từ 10% đến 18%, nằm trong khoảng từ 10% đến 17%, nằm trong khoảng từ 10% đến 16%, hoặc nằm trong khoảng từ 10% đến 15%. Theo các khía cạnh khác, hàm lượng của axit palmitic được đo là tỷ lệ phần trăm của tổng hàm lượng axit béo trong mẫu và nằm trong khoảng từ 5% đến 15%, nằm trong khoảng từ 5% đến 12%, hoặc nằm trong khoảng từ 5% đến 10%. Theo các khía cạnh khác, hàm lượng của axit palmitic được đo là tỷ lệ phần trăm của tổng hàm lượng axit béo trong mẫu và nhỏ hơn 30%, 29%, 28%, 27%, 26%, 25%, 24%, 23%, 22%, 21%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, hoặc 8%.

Theo các khía cạnh khác, hàm lượng của axit stearic được gia tăng khoảng 10%-100%, tốt hơn nếu 20%-70%, tốt hơn nữa nếu 30%-40% so với *Theobroma cacao*.

Theo các khía cạnh khác, hạt giống lai của *Theobroma cacao* và *Theobroma grandiflorum* được phát triển có đặc tính hàm lượng alkaloid được cải biến như so với *Theobroma cacao*. Đặc tính hàm lượng alkaloid được cải biến cụ thể bao gồm hàm lượng của metyl xanthin (ví dụ theobromin, cafein, và axit tetrametylic (TMUA, cũng được gọi là theacrin hoặc ATMU)) được cải biến. Theo một số khía cạnh, hàm lượng của cafein có thể được gia tăng hoặc giảm khoảng 10%-100%, khoảng 25%-75%, hoặc khoảng 40%-60% so với *Theobroma cacao*. Theo một số khía cạnh, hàm lượng của cafein trong thực vật lai bất kỳ theo sáng chế nằm trong khoảng từ 1 đến 10mg/g, nằm trong khoảng từ 2 đến 8mg/g, hoặc nằm trong khoảng từ 4 đến 6mg/g. Trong *Theobroma cacao*, hàm lượng của cafein thường nằm trong khoảng từ 2 đến 5mg/g.

Theo các khía cạnh khác, hàm lượng của theobromin trong thực vật lai bất kỳ theo sáng chế được giảm 10%-100%, 25%-75%, hoặc 40%-60% so với *Theobroma cacao*. Theo các khía cạnh khác, hàm lượng của theobromin nhỏ hơn 5mg/g, nhỏ hơn 4,5mg/g, nhỏ hơn 4mg/g, nhỏ hơn 3,5mg/g, nhỏ hơn 3mg/g, nhỏ hơn 2,5mg/g, nhỏ hơn 2mg/g, nhỏ hơn 1,5mg/g, nhỏ hơn 1mg/g, nhỏ hơn 0,5mg/g, nhỏ hơn 0,25mg/g, hoặc nhỏ hơn 0,1mg/g. Theo các khía cạnh khác, hàm lượng của theobromin nằm trong khoảng từ

0mg/g đến 5mg/g, nằm trong khoảng từ 0,05mg/g đến 5mg/g, nằm trong khoảng từ 0,10mg/g đến 5mg/g, nằm trong khoảng từ 0,5mg/g đến 5mg/g, nằm trong khoảng từ 1mg/g đến 5mg/g, nằm trong khoảng từ 1,5mg/g đến 5mg/g, nằm trong khoảng từ 2mg/g đến 5mg/g, nằm trong khoảng từ 2,5mg/g đến 5mg/g, nằm trong khoảng từ 3mg/g đến 5mg/g. Theo các khía cạnh khác, hàm lượng của theobromin nằm trong khoảng từ 0mg/g đến 4,5mg/g, nằm trong khoảng từ 0,05mg/g đến 4,5mg/g, nằm trong khoảng từ 0,10mg/g đến 4,5mg/g, nằm trong khoảng từ 0,5mg/g đến 4,5mg/g, nằm trong khoảng từ 1mg/g đến 4,5mg/g, nằm trong khoảng từ 1,5mg/g đến 4,5mg/g, nằm trong khoảng từ 2mg/g đến 4,5mg/g, nằm trong khoảng từ 2,5mg/g đến 4,5mg/g, nằm trong khoảng từ 3mg/g đến 4,5mg/g. Theo các khía cạnh khác, hàm lượng của theobromin nằm trong khoảng từ 0mg/g đến 4mg/g, nằm trong khoảng từ 0,05mg/g đến 4mg/g, nằm trong khoảng từ 0,10mg/g đến 4mg/g, nằm trong khoảng từ 0,5mg/g đến 4mg/g, nằm trong khoảng từ 1mg/g đến 4mg/g, nằm trong khoảng từ 1,5mg/g đến 4mg/g, nằm trong khoảng từ 2mg/g đến 4mg/g, nằm trong khoảng từ 2,5mg/g đến 4mg/g, nằm trong khoảng từ 3mg/g đến 4mg/g. Theo các khía cạnh khác, hàm lượng của theobromin nằm trong khoảng từ 0mg/g đến 3,5mg/g, nằm trong khoảng từ 0,05mg/g đến 3,5mg/g, nằm trong khoảng từ 0,10mg/g đến 3,5mg/g, nằm trong khoảng từ 0,5mg/g đến 3,5mg/g, nằm trong khoảng từ 1mg/g đến 3,5mg/g, nằm trong khoảng từ 1,5mg/g đến 3,5mg/g, nằm trong khoảng từ 2mg/g đến 3,5mg/g, nằm trong khoảng từ 2,5mg/g đến 3,5mg/g, nằm trong khoảng từ 3mg/g đến 3,5mg/g. Trong *Theobroma cacao*, hàm lượng của Theobromin nằm trong khoảng từ 15 đến 40mg/g.

Theo các khía cạnh khác, sự có mặt của axit tetramethyluric được xác định trong thực vật lai hoặc hạt giống lai bất kỳ theo sáng chế. Theo một số khía cạnh, hàm lượng của axit tetramethyluric nằm trong khoảng từ 0,5mg/g đến 3mg/g, nằm trong khoảng từ 0,5mg/g đến 2,5mg/g, nằm trong khoảng từ 0,5mg/g đến 2mg/g, hoặc nằm trong khoảng từ 0,5mg/g đến 1,5mg/g. Theo các khía cạnh khác, hàm lượng của axit tetramethyluric nằm trong khoảng từ 1,0mg/g đến 3mg/g, nằm trong khoảng từ 1,0mg/g đến 2,5mg/g, nằm trong khoảng từ 1,0mg/g đến 2,0mg/g, hoặc nằm trong khoảng từ 1,0mg/g đến 1,5mg/g. Trong *Theobroma cacao*, TMUA không có mặt.

Theo các khía cạnh khác, hạt giống lai của *Theobroma cacao* và *Theobroma grandiflorum* được phát triển có đặc tính hàm lượng flavanol được cải biến như so với *Theobroma cacao*. Các đặc tính hàm lượng flavanol được cải tiến cụ thể bao gồm hàm

lượng flavanol tổng số, catechin, và epicatechin được cải biến. Theo một số khía cạnh, hàm lượng của flavanol tổng số có thể được gia tăng hoặc giảm khoảng 10%-100%, 25%-75%, hoặc khoảng 40%-60% so với *Theobroma cacao*. Theo các khía cạnh khác, hàm lượng của catechin có thể được gia tăng hoặc giảm khoảng 10%-100%, khoảng 25%-75%, hoặc khoảng 40%- 60% so với *Theobroma cacao*. Theo các khía cạnh khác, hàm lượng của epicatechin có thể được gia tăng hoặc giảm khoảng 10%-100%, khoảng 25%-75%, hoặc khoảng 40%-60% so với *Theobroma cacao*.

Theo một số khía cạnh, hạt giống lai có đặc tính bất kỳ nêu trên được sử dụng để sản xuất sản phẩm ca cao. Ví dụ, hạt giống lai có hàm lượng axit palmitic thấp hơn *Theobroma cacao* và/hoặc hàm lượng theobromin thấp hơn *Theobroma cacao* được sử dụng để sản xuất sản phẩm ca cao.

Theo các khía cạnh khác, sự có mặt của axit tetrametyluric được sử dụng để kiểm chứng xem hạt giống có phải là kết quả của quá trình lai giữa *Theobroma cacao* và *Theobroma grandiflorum* hay không.

Theo các khía cạnh khác, hạt giống lai chứa axit tetrametyluric được sử dụng để sản xuất sản phẩm ca cao.

Phân tích thành phần gen của hạt giống cũng có thể được thực hiện để kiểm chứng xem hạt giống có phải là kết quả của quá trình lai giữa hai thực vật cha mẹ hay không. Ví dụ, phân tích ADN của mẫu lá mầm thu được từ hạt giống có thể được thực hiện để xác định sự có mặt của hoặc sự vắng mặt của chất đánh dấu đặc hiệu. Các chất đánh dấu dạng đa hình nucleotit đơn đặc hiệu có thể được chọn lọc, ví dụ dựa trên sự phân bố của chúng trong các nhiễm sắc thể của các thực vật cha mẹ được lai chéo, để cho phép kiểm chứng quá trình lai đã xuất hiện trong bộ gen. Theo một số khía cạnh, sự có mặt của hoặc sự vắng mặt của một hoặc nhiều trong số 22 chất đánh dấu dạng đa hình nucleotit đơn được thể hiện trong Fig.20A và Fig.20B được xác định. Theo các khía cạnh khác, sự có mặt của hoặc sự vắng mặt của một hoặc nhiều trong số 11 chất đánh dấu dạng đa hình nucleotit đơn được thể hiện trong Fig.21A và 21B được xác định.

Theo các khía cạnh khác, sự có mặt của hoặc vắng mặt của một hoặc nhiều (ví dụ 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, hoặc 9) trong số 9 chất đánh dấu sau được xác định: w17s189(T/C), e0050s274(C/T), cIR211s1036(T/A), w11s867(T/C), w8s204(T/C), c3s595(C/A), w3s41(G/T), w8s131(T/C), w3s558(A/G). Các chất đánh dấu dạng đa hình nucleotit đơn

này được mô tả trong một hoặc nhiều tài liệu sau, được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn: Borrone et al., *Theor. Appl. Genet.* 109 (3), 495-507 (2004); Pugh et al., *Theor. Appl. Genet.* 108 (6), 1151-1161 (2004); Kuhn et al., *Tree Genetics & Genomes* 6, 783-792 (2010); Livingstone et al., *Mol Breeding* (2011) 27:93-106; Kuhn et al., *Tree Genetics & Genomes* 8, 97-111 (2012). Thông tin liên quan đến các chất đánh dấu dạng đa hình nucleotit đơn này (ví dụ mã truy cập NCBI, tổ hợp đoạn môi/mẫu dò và trình tự được sử dụng để phát hiện các chất đánh dấu dạng đa hình nucleotit đơn này) được thể hiện trong Bảng 1. Cụ thể, các chất đánh dấu dạng đa hình nucleotit đơn này có thể được phát hiện, chọn lọc, sàng lọc, và/hoặc phát hiện bằng cách sử dụng các tổ hợp đoạn môi và/hoặc mẫu dò được mô tả trong Bảng 1.

Bảng 1 Gen chỉ thị dạng đa hình nucleotit đơn

Cụm gen	Mã NCBI	Gen chỉ thị	Nhóm liên kết	Tổ hợp đoạn mẫu/mẫu dò	Alen	Chất đánh dấu huỳnh quang	Trình tự	Tm	%GC
WRKY17	EF173893	w17s189	1	Wky17 189 F			TGATTACACTGTTACACCAACTTTAGACG	59.8	38
				Wky17 189 R			ACGTGTAAGAAGGAGGAAAACTTT	58.1	35
				Wky17 189 t	T	VIC	TCTTGGGAGATATC	67	40
				Wky17 189 c	C	FAM	TCTCTGGcGAGATAT	67	44
				Est 0050 229 F			CTCAGGTTCCCAACCATTTGATTAA	58.1	38
	CA797820	e0050s274	3	Est 0050 229 R			CCGAGATCCCATGGTTAACAA	58.4	48
				EST 0050 274 c	C	FAM	AAGCTGCCAcGGAGT	67	60
				EST 0050 274 t	T	VIC	AAGCTGCCAcGGAGT	67	53
				Wky11 867 F			AACCTTGTCAGCTGCTCTCTCTTCTTG	58.5	42
				Wky11 867 R			CAGAACCTGTGCATGCTTGAAGC'	59.7	50
WRKY11	AY331171	w11s867	5	Wky11 867 t	T	VIC	CTAAATGAATCAICCAAAAGA	65	30
				Wky11 867 c	C	FAM	AAATGAATCAcCCAAAGA	65	33
				w3s41 FW			AAAGGCAATCCTTACCCAAAGGT	58.9	45
				w3s41 RV			AAGAATGAACCACTTTGCAGTAGATAGT	58.1	36
				w3s41 pG	G	FAM	ATgCcCtTgTgt	65	57
WRKY3	AY331158	w3s41 pT	2	w3s41 pT	T	VIC	atGcCcTgTgt	65	50
				w3s558 FW			GTGTGTGTTCTGTTCAATTCGTATGA	58.2	35
				w3s558 RV			ATCAGGAATGCTCCAAATAATCAA	58.9	32
				w3s558 pA	A	FAM	tgacTACenttngTgAtCt	66	33
				N w3s558	G	VIC	TGACTgcCTTTTATGTGAT	66	37
WRKY8	AY331165	w8s131 (mẫu dò 119)	9	w8s131 FW			GCCTGTCAAAAAGAGAGGTACTG	64.7	48
				w8s131 RV			TTACTGTGCTTTCCCATTTTCTAAGTG	64.1	33
				w8s119 pT	T	VIC	TTCTGAGGTATCATTCCCA	69	42
				w8s119 pC	C	FAM	TTCTGAGGCAATCATTCC	71	47
				w8s204 FW			cacttngaaatlgaaagcancagt	63.2	36
WRKY8	AY331165	w8s204	9	w8s204 RV			accagagccgaaagatgaattgatt	64.6	37
				w8s204 pT	T	VIC	ttecTgagacttgacttga	68	40
				w8s204 pC	C	FAM	ttecCgaatctgtactt	68	44
				c3s595 FW			TGCTGGTGGCAAGAAGTATTATATAG	58.1	37
				c3s595 RV			CAGATCCTCAATCAATACCTGTATCAA	58.6	37
CO3 (Tc_Ar1g444-46)	XM007019015	c3s595	8	c3s595 pA	A	6FAM	CTCTGGcTCAATTGGT	66	47
				c3s595 pC	C	VIC	CTCTGGcTCAATTGGT	67	53
				CIR211s1036 FW			ACCTTAATTTTATGGGAAACGAGGT	58.4	36
				CIR211s1036 RV			CCAAACAAAATCTTAATGCACGTG	58.7	36
				CIR211s1036 pT	T	VIC	AATCGTGTGCTGACTGAT	67	41
mTeCIR211	AJ566534	CIR211s1036	8	CIR211s1036 pA	A	6FAM	CAATCgTGTGCTGACTG	65	50

Để thực hiện phân tích chất đánh dấu dạng đa hình nucleotit đơn, đặc tính gen của các thực vật cha mẹ so với các chất đánh dấu dạng đa hình nucleotit đơn quan tâm cần được đánh giá trước tiên. Các giống ưu tiên của *Theobroma cacao* và *Theobroma grandiflorum* có thể được sử dụng làm các thực vật cha mẹ được thể hiện trên Fig.18A và Fig.18B. Tốt hơn nếu mỗi thực vật cha mẹ có alen khác nhau đối với chất đánh dấu dạng đa hình nucleotit đơn được chọn, và ở trạng thái đồng hợp tử, để cho phép chất đánh dấu dạng đa hình nucleotit đơn này được sử dụng để đánh giá kết quả lai. Đặc tính gen của các thực vật cha mẹ so với 22 chất đánh dấu dạng đa hình nucleotit đơn được thể hiện trên Fig.20A và Fig.20B. Thực vật thế hệ sau ở trạng thái dị hợp tử ở chất đánh dấu dạng đa hình nucleotit đơn đối với các chất đánh dấu dạng đa hình nucleotit đơn đáp ứng tiêu chuẩn này đã trải qua một số mức độ lai. Ví dụ về 81 thực vật lai chéo khác nhau được tạo ra bằng cách sử dụng các thực vật cha mẹ là các giống khác nhau của *Theobroma cacao* và *Theobroma grandiflorum* được thể hiện trên Fig.19A-19B, và đặc tính gen của các thực vật lai này so với 11 chất đánh dấu dạng đa hình nucleotit đơn được thể hiện trên Fig.21A và 21B. Ví dụ về 12 thực vật lai khác nhau và đặc tính gen của chúng so với 9 chất đánh dấu dạng đa hình nucleotit đơn được thể hiện trong Fig.22.

Hạt giống, và cụ thể hạt giống được chọn sau khi phân tích hóa học và/hoặc gen, được gieo vào môi trường sinh trưởng thực vật thích hợp (ví dụ như được thể hiện trên Fig.5). Theo phương án cụ thể, môi trường được sử dụng trong bước (b) là môi trường sinh trưởng thực vật thân gỗ, như môi trường sinh trưởng thực vật thân gỗ (Lloyd and McCown's, 1981). Tuy nhiên, môi trường bất kỳ có khả năng hỗ trợ sinh trưởng thực vật lai có thể được sử dụng.

Hạt giống được ủ trong môi trường sinh trưởng ở nhiệt độ thích hợp, như nằm trong khoảng từ 20°C đến 35°C, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 25°C đến 32°C, tốt hơn nữa nếu nằm trong khoảng từ 27°C đến 30°C. Theo một số khía cạnh, hạt giống có thể được duy trì trong điều kiện không khí ẩm, ví dụ trong môi trường có độ ẩm tương đối ít nhất khoảng 50%, độ ẩm tương đối ít nhất khoảng 70%, hoặc độ ẩm tương đối ít nhất khoảng 85%. Tuy nhiên, điều kiện bất kỳ có khả năng hỗ trợ sinh trưởng thực vật lai có thể được sử dụng theo sáng chế.

Hạt giống được để phát triển thành thực vật chưa trưởng thành trong các điều kiện này. Thông thường, quá trình này kéo dài từ 5 đến 25 ngày, hoặc từ 10 đến 15 ngày.

Theo các khía cạnh khác, sau khi thực vật lai chưa trưởng thành đã trưởng thành, chúng có thể được duy trì trong buồng ươm với độ ẩm cao, ví dụ độ ẩm tương đối ít nhất 80%, tốt hơn nếu độ ẩm tương đối ít nhất 90% để cho phép chúng thích nghi với điều kiện khí hậu (ví dụ như được thể hiện trên Fig.6).

Các thực vật chưa trưởng thành được chuyển vào và sinh trưởng trên giá thể thích hợp. Theo một số khía cạnh, giá thể này chứa than bùn, bột dừa, peclit, và hỗn hợp của chúng. Theo các khía cạnh khác, môi trường này chứa bột dừa và đất carolina (có bán trên thị trường; đất carolina tiêu chuẩn CE = 0,7ms/cm +/- 0,3; thành phần: vermiculit dạng nở, rêu bùn, vôi dùng trong nông nghiệp, thạch cao và phân bón vi lượng (NPK), độ pH = 5,5 +/- 0,5)).

Các thực vật lai chưa trưởng thành có thể được ghép vào các thực vật khác. Ví dụ, thực vật thích hợp để ghép các thực vật lai chưa trưởng thành bao gồm *Theobroma grandiflorum* (ví dụ như được thể hiện trên Fig.8A và Fig.8B) và *Theobroma cacao*. Theo một số khía cạnh, các thực vật lai chưa trưởng thành được ghép vào thân rễ của *Theobroma cacao* VB-1151. Theo một khía cạnh cụ thể, các thực vật lai chưa trưởng thành từ P-7B x MCSG-122 hoặc NA-45 x MCSG-122 được ghép vào thân rễ của *Theobroma cacao*, như VB-1151.

Thực vật lai theo sáng chế có thể được sinh trưởng đến giai đoạn trưởng thành và ra hoa (ví dụ như được thể hiện trên Fig.7), quả/trái, và hạt giống. Hoa trưởng thành có thể được ghép vào các thực vật khác (ví dụ *Theobroma cacao*) hoặc thân rễ đặc hiệu (ví dụ VB-1151) như được mô tả trong đoạn nêu trên.

Phân tích thành phần gen của thực vật lai có thể được thực hiện ở giai đoạn trưởng thành bằng các phân tích mẫu thực vật, như lá, thân, rễ, hoặc mô hoa, để kiểm chứng xem thực vật lai có phải là kết quả của quá trình lai giữa hai thực vật cha mẹ hay không. Ví dụ, phân tích ADN của mẫu như mẫu lá thu được từ các thực vật có thể được thực hiện để xác định sự có mặt của hoặc sự vắng mặt của chất đánh dấu đặc hiệu được mô tả nêu trên đối với hạt giống.

Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất thực vật lai của *Theobroma cacao* và *Theobroma grandiflorum* và bộ phận của nó, cũng như sản phẩm lai, như hạt giống thu được bằng cách lai chéo *Theobroma cacao* và *Theobroma grandiflorum*. Theo một số khía cạnh, phương pháp này bao gồm bước lai chéo giống *Theobroma cacao* và

Theobroma grandiflorum và thu nhận hạt giống từ đó, và chọn lọc hạt giống và/hoặc thực vật thu được từ quá trình lai chéo. Hạt giống và/hoặc thực vật có thể được chọn lọc dựa trên các đặc tính theo sáng chế, như xem chúng có hàm lượng axit palmitic thấp hơn *Theobroma cacao*; hàm lượng theobromin thấp hơn *Theobroma cacao*; sự có mặt của axit tetramethyluric; và/hoặc một hoặc nhiều chất đánh dấu dạng đa hình nucleotit đơn sau hay không: w17s189(T/C), e0050s274(C/T), CIR211s1036(T/A), w11s867(T/C), w8s204(T/C), c3s595(C/A), w3s41(G/T), w8s131(T/C), w3s558(A/G), và tổ hợp bất kỳ của chúng. Theo các khía cạnh khác, sáng chế cũng đề xuất phương pháp xác định, chọn lọc, sàng lọc và/hoặc kiểm chứng thực vật lai của *Theobroma cacao* và/hoặc *Theobroma grandiflorum* hoặc sản phẩm thực vật, như hạt giống thu được từ quá trình lai chéo *Theobroma cacao* và *Theobroma grandiflorum*, dựa trên một hoặc nhiều đặc tính nêu trên.

Theo các phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất thực vật lai của *Theobroma cacao* và *Theobroma grandiflorum*, bao gồm bước (a) lai chéo giống *Theobroma cacao* và giống *Theobroma grandiflorum* và thu nhận hạt giống lai từ đó; (b) gieo hạt giống lai thu được trên môi trường sinh trưởng và ủ chúng trong buồng sinh trưởng cho đến khi thu được các thực vật lai chưa trưởng thành; (c) chuyển các thực vật lai chưa trưởng thành thu được vào giá thể thích hợp; và (d) tùy ý ghép các thực vật lai chưa trưởng thành này lên thực vật. Theo các phương án khác, sau bước (a), và trước bước (b), mẫu hạt giống được tách và thành phần hóa học và/hoặc thành phần chất đánh dấu được phân tích. Theo các phương án khác, chỉ hạt giống có một số đặc tính nhất định, như các đặc tính và/hoặc chất đánh dấu dạng đa hình nucleotit đơn nêu trên, được gieo trong bước (b). Sáng chế cũng đề xuất thực vật lai được sản xuất bằng phương pháp này.

Theo các khía cạnh khác, thực vật lai thu được từ thực vật lai chéo bất kỳ theo sáng chế được lai chéo với một thực vật khác. Theo một số khía cạnh, thực vật lai được lai ngược với một trong số các thực vật cha mẹ của nó (*Theobroma cacao* hoặc *Theobroma grandiflorum*), và hạt giống được thu nhận. Theo các khía cạnh khác, thực vật lai chưa trưởng thành được ghép vào thân rễ, như được mô tả nêu trên, và thực vật thu được được lai chéo với một thực vật khác hoặc được lai ngược với một trong số các thực vật cha mẹ của nó (*Theobroma cacao* hoặc *Theobroma grandiflorum*).

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp tách quả khỏi thực vật lai của *Theobroma*

cacao và *Theobroma grandiflorum* và chế biến nó thành sản phẩm ca cao. Theo các khía cạnh khác, sáng chế đề xuất sản phẩm có nguồn gốc từ thực vật lai, tốt hơn nếu hạt giống thu được từ quá trình lai chéo *Theobroma cacao* và *Theobroma grandiflorum*, chứa axit béo. Hạt giống này có đặc tính hàm lượng axit béo được biến đổi như so với hàm lượng axit béo của hạt giống được sản sinh bởi các thực vật cha mẹ mà từ đó thực vật lai được tạo ra. Đặc tính hàm lượng axit béo này theo sáng chế có ưu điểm do axit béo no, như axit palmitic, có thể liên quan đến nguy cơ bệnh tim mạch cao, axit béo không no, như axit linoleic, có thể hữu ích để làm giảm hàm lượng cholesterol LDL và nguy cơ bệnh tim mạch. Do đó, thực vật lai, hoặc hạt giống thu được từ quá trình lai chéo *Theobroma cacao* và *Theobroma grandiflorum*, theo sáng chế tạo ra nguyên liệu ban đầu đặc biệt thích hợp để sản xuất thực phẩm có đặc tính hàm lượng của axit béo, flavanol, và alkaloit của sản phẩm thực vật mà từ đó thực phẩm này được sản xuất, như sản phẩm bánh kẹo, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở sôcôla và sản phẩm chứa ca cao.

Phương pháp chế biến được sử dụng để sản xuất sản phẩm ca cao bao gồm bước tách lớp thịt quả một phần hoặc toàn của quả thu được từ thực vật (ví dụ từ thực vật lai của *Theobroma cacao* và *Theobroma grandiflorum*), lên men hạt bằng phương pháp vi sinh vật hoặc phương pháp hóa học, sấy khô hạt bằng cách phơi nắng hoặc sấy bằng máy sấy, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, máy sấy Samoan, máy sấy Buttner, và máy sấy sàn.

Theo một số khía cạnh, hạt đã được sấy khô có thể được tiếp tục rang và sàng để thu được nhân hạt được chế biến thành ca cao lỏng hoặc bơ ca cao. Ca cao lỏng có thể được chế biến thành bột ca cao. Dịch lỏng vẫn chứa bơ ca cao, có thể được trộn với đường hoặc chất làm ngọt tự nhiên hoặc tổng hợp khác. Theo một số khía cạnh, hỗn hợp thu được có thể ở dạng bột nhão.

Bột nhão có thể được nghiền, tùy ý bằng máy nghiền kiểu trục lăn, để thu được bột nhão có kích cỡ hạt nhỏ hơn. Theo các khía cạnh khác, sữa đặc có thể được bổ sung vào, sau đó hỗn hợp này tiếp tục được chế biến thành canh sữa. Hỗn hợp này có thể được trộn trong máy tạo hình, tùy ý với bơ ca cao và chất nhũ hóa. Bột nhão và canh sữa cũng có thể được trộn với bơ ca cao và chất nhũ hóa trong máy tạo hình. Máy tạo hình được sử dụng để trộn bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, máy tạo hình Frissee, máy tạo hình Tourell, máy tạo hình và tinh chế Macintyre, và hệ thống Wiener.

Sản phẩm cuối cùng của quy trình sản xuất, và tùy ý nghiền và tiếp tục chế biến bột nhão là sản phẩm chứa ca cao dùng làm thực phẩm, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, sôcôla, sản phẩm sôcôla, hoặc sản phẩm tương tự sôcôla.

Sản phẩm ca cao được ưu tiên hiện nay có thể được sản xuất bằng cách sử dụng quả từ các thực vật được nhân giống theo phương pháp của sáng chế (ví dụ quả từ thực vật lai của *Theobroma cacao* và *Theobroma grandiflorum*) bao gồm ca cao lỏng, sôcôla, sản phẩm sôcôla, sản phẩm tương tự sôcôla, bột ca cao, và bơ ca cao. Sáng chế cũng đề xuất sản phẩm chứa ca cao thu được bằng phương pháp nêu trên.

Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất sản phẩm ca cao có nhiệt độ nóng chảy và/hoặc nhiệt độ kết tinh cao hơn sản phẩm thu được chỉ từ *Theobroma cacao*. Theo các khía cạnh khác, sáng chế đề xuất sản phẩm ca cao có khả năng chịu nhiệt.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các phương án khác nhau của sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn thông qua các ví dụ sau. Tuy nhiên, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng các chi tiết cụ thể không bắt buộc để thực hiện sáng chế. Phần mô tả các phương án cụ thể dưới đây nhằm mục đích minh họa và mô tả. Các phương án này không nhằm mục đích giới hạn phạm vi của sáng chế. Nhiều cải biến và biến thể có thể được thực hiện dựa trên phần mô tả nêu trên. Các phương án này được thể hiện và mô tả để giải thích nguyên lý và thực hành sáng chế, để cho phép người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sử dụng tốt nhất sáng chế và các phương án khác nhau với các cải biến khác nhau phù hợp với mục đích sử dụng cụ thể.

Ví dụ 1

Ví dụ này mô tả các thực vật lai của *Theobroma cacao* và *Theobroma grandiflorum* và sản phẩm lai, như hạt giống thu được từ quá trình lai chéo *Theobroma cacao* và *Theobroma grandiflorum*, cũng như đặc tính hóa học và đặc tính gen của thực vật lai và sản phẩm lai này.

1. Chọn lọc thực vật cha mẹ

Các thực vật cho hạt phấn được chọn lọc trong số các thực vật từ bộ sưu tập *Theobroma grandiflorum* được lưu trữ ở trung tâm M CCS. Các thực vật mẹ được chọn từ bộ sưu tập phôi mầm của *Theobroma cacao* M CCS dựa trên bảng đa dạng gen của thực

vật ca cao.

Các giống được chọn lọc để sử dụng trong phát triển các thực vật lai được thể hiện trên Fig.18A và Fig.18B.

2. Thụ phấn

Quá trình thụ phấn được thực hiện bằng tay, bằng cách đập hoa mẹ bằng ống trong suốt polyetylen trong 24 giờ, trước khi chồi nở (Fig.2A). Sau đó, các hoa từ *Theobroma grandiflorum* được thu nhận (Fig.28) và phần hoa của chúng được rắc vào nhụy hoa cái của *Theobroma cacao* (Fig.2C). Hoa đã thụ phấn được đập một lần nữa trong 24 giờ bằng cùng ống trong suốt polyetylen.

Sau 24 giờ, quá trình thụ phấn thành công được kiểm chứng và quá trình này được lặp lại sau 5, 15, và 30 ngày. Ví dụ về hoa sau khi thụ phấn thành công được thể hiện trong Fig.20.

3. Thu nhận hạt giống lai

Các hoa đã thụ phấn được để phát triển và các quả trưởng thành được thu hoạch sau 140 đến 160 ngày thụ phấn, như được thể hiện trên Fig.3A. Sau khi thu hoạch, các quả trưởng thành được chuyển vào phòng thí nghiệm, làm sạch bằng nước tẩy trắng, hồ trên ngọn lửa và bỏ trong điều kiện tủ hút. Hạt giống được tách ra bằng kẹp vô trùng và vỏ ngoài của mỗi hạt giống được bóc ra, và các hạt giống thu được được thể hiện trên Fig.4A-Fig.4D.

Sau đó, các hạt giống lai thu được được gieo trên môi trường sinh trưởng thực vật thân gỗ (Lloyd and McCown's, 1981) có thành phần được thể hiện trong Bảng 1, và đặt vào buồng sinh trưởng ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 27°C đến 30°C, và độ ẩm tương đối bằng 70%, như được thể hiện trên Fig.3B-Fig.3C.

Bảng 1: Thành phần môi trường sinh trưởng thực vật thân gỗ

Môi trường dung dịch sinh trưởng thực vật thân gỗ I NH_4NO_3 20 g/L $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 27,8 g/L Môi trường dung dịch sinh trưởng thực vật thân gỗ II K_2SO_4 49,5 g/L Dung dịch MS II $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 37 g/L $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 2,23 g/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,86 g/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,0025 g/L Nồng độ cuối cùng (mg/L) NH_4NO_3 400 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 556 K_2SO_4 900 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 96 H_3BO_3 6,2 KH_2PO_4 170 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,25 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 370 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 22,3 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 8,6 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,25 $\text{FeNaEDTA} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 42,1	Môi trường dung dịch sinh trưởng thực vật thân gỗ III $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 19,2 g/L Môi trường dung dịch sinh trưởng thực vật thân gỗ IV H_3BO_3 0,62 g/L KH_2PO_4 17 g/L $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,025 g/L Dung dịch MS IV Na_2EDTA 3,73 g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2,78 g/L
--	---

4. Phân tích hóa học

Theo một số phương án, sau khi thu nhận hạt giống lai và trước khi gieo, mẫu chứa khoảng 1/3 lá mầm được cắt từ hạt giống như được thể hiện trên Fig.5 để xác định thành phần hóa học của hạt giống lai. Trước tiên, mẫu được sấy kết đông, và phân tích hóa học. Các mẫu được phân tích về hàm lượng axit béo, flavanol, và alkaloit.

Thành phần axit béo (ví dụ axit palmitic) được xác định bằng phương pháp sắc ký khí mao quản. Các axit béo này được trans este hóa thành este metyl của axit béo tương ứng của chúng bằng hỗn hợp metanol và tetrametylamoni hydroxit. Sau đó, các este metyl của axit béo được phân tách trên cột mao quản HP Innowax với thành phần este metyl của axit béo được xác định bằng cách chuẩn hóa diện tích. Quá trình định lượng được thực hiện bằng cách sử dụng đường chuẩn ngoại. Chuẩn ngoại thường được sử dụng là chất chuẩn đối chiếu Nu-Chek GLC 68C. Các đường chuẩn tuyến tính được xây dựng cho toàn bộ các thành phần, nhờ đó xác định được mức độ khác biệt về hệ số đáp ứng tương đối của các axit béo.

Hàm lượng flavanol cao được xác định bằng phương pháp HPLC pha thuận. Bột hạt cao đã đông khô được chiết bằng hexan để loại bỏ các thành phần lipid trước khi chiết flavanol/proxyanidin. Tiếp theo, flavanol/proxyanidin (DP1 - 10) được chiết từ

các mẫu đã loại lipid bằng hệ dung môi axeton/nước đã được axit hóa. Sau đó, các dịch chiết được nạp qua cột chiết pha rắn, lọc và chuyển vào bình sắc ký để phân tích bằng phương pháp HPLC pha thuận. Quá trình định lượng được thực hiện bằng phương pháp chuẩn ngoại, và đường chuẩn được xây dựng cho mỗi phân đoạn flavanol/proxyanidin. Các trị số ghi nhận hàm lượng flavanol tổng số và proxyanidin của mẫu là tổng của các trị số định lượng được cho mỗi phân đoạn oligome (DP1 - 10).

Hàm lượng alkaloit (theobromin, cafein và axit tetrametylic) được xác định bằng phương pháp HPLC pha đảo và phát hiện bằng UV ở bước sóng 274nm. Các mẫu bột hạt đông khô được điều chế bằng cách hòa tan trong nước nóng ($> 95^{\circ}\text{C}$), lọc và phân tích bằng phương pháp HPLC. Đường chuẩn ngoại được sử dụng để định lượng alkaloit, và khối sôcôla NIST được sử dụng làm chất chuẩn thứ hai để đánh giá và đảm bảo hiệu suất của phương pháp và hệ thống.

Phân bố hàm lượng axit palmitic trong các hạt giống thu được từ năm 2009 đến 2013 từ 37 thực vật lai khác nhau như được thể hiện trên Fig.9, được phân tích bằng phép kiểm định Shapiro-Wilk. Biểu “lượng” trên Fig.9 thể hiện số lượng hạt giống được phân tích cho mỗi thực vật lai. 4 thực vật lai không được phân tích bằng phép kiểm định này, do số lượng mẫu (hạt giống) < 3 . Hàm lượng axit palmitic trung bình (tức là trung vị) của nhiều thực vật lai thấp hơn đáng kể so với hàm lượng axit palmitic của *Theobroma cacao* (xem Fig.1).

Các đồ thị thể hiện phân bố hàm lượng axit palmitic trong các hạt giống lai của các thực vật lai, cả bình thường và không bình thường, được thể hiện trên Fig.10-Fig.11. Hàm lượng axit palmitic của các thực vật lai này thấp hơn đáng kể so với hàm lượng axit palmitic của *Theobroma cacao* (xem Fig.1).

Trong năm 2012 và 2013, metyxantin từ hạt giống được phân tích, để hỗ trợ kiểm chứng kết quả lai chéo nội loài. 957 mẫu được phân tích trong năm 2012, và 678 mẫu trong năm 2013 (chỉ các mẫu chứa axit tetrametylic được phân tích về hàm lượng axit palmitic).

Hàm lượng axit palmitic, axit tetrametylic, theobromin, và cafein của hạt giống thu được trong năm 2012-2013 đối với NA-45 x MCGS-122, được thể hiện trên Fig.12-15. Kết quả phân tích trên Fig.12 cho thấy phân bố hàm lượng axit palmitic là bình thường và hàm lượng trung bình bằng 15,36% trong năm 2012, và 17,24% trong năm

2013, thấp hơn hàm lượng đã biết của *Theobroma cacao* (xem Fig.1).

Kết quả phân tích trên Fig.13 cho thấy phân bố hàm lượng bình thường của theobromin và có hàm lượng trung bình bằng 0,993mg/g trong năm 2012, thấp hơn *Theobroma cacao*. Trong năm 2013, hàm lượng trung bình bằng 4,043mg/g và píc thứ hai có trị số hàm lượng nằm trong khoảng từ 20 đến 30mg/g được quan sát. Hàm lượng gia tăng này của theobromin là do thực tế thực vật lai này đã sản sinh một số hạt giống không lai.

Kết quả phân tích trên Fig.14 cho thấy phân bố hàm lượng bình thường của cafein và hàm lượng trung bình bằng 11,26mg/g trong năm 2012, và 10,61mg/g trong năm 2013, cao hơn hàm lượng đã biết của *Theobroma cacao*.

Kết quả phân tích trên Fig.15 cho thấy phân bố hàm lượng bình thường của axit tetramethyluric và trong năm 2012, toàn bộ các thực vật thể hệ sau là thực vật lai do toàn bộ các thực vật lai này chứa axit tetramethyluric. Mặt khác, trong năm 2013, có một số thực vật lai giả định chứa hàm lượng axit tetramethyluric tương tự *Theobroma cacao* (tức là không chứa axit tetramethyluric), do đó các thực vật thể hệ sau này không được xem là thực vật lai thực sự của *Theobroma cacao* và *Theobroma grandiflorum* (xem phần mô tả nêu trên liên quan đến theobromin).

Ngoài ra, các thực vật riêng biệt được phân tích về hàm lượng flavanol ca cao tổng số, cũng như catechin và epicatechin, và các kết quả được thể hiện trên Fig.16-Fig.17.

5. Quá trình sinh trưởng của hạt giống lai

Sau 10-15 ngày trong buồng sinh trưởng, thực vật lai chưa trưởng thành được dừng sinh trưởng trong buồng ẩm được phát triển để duy trì độ ẩm tương đối cao (100%) cho đến khi chúng được thích nghi với điều kiện khí hậu (Fig.6). Sau đó chúng được trồng vào giá thể chứa than bùn, bột dừa và peclit.

Chiều cao của thực vật chưa trưởng thành cũng như số lượng lá được theo dõi trong từng tháng. Kiểu hình của chúng cũng được ghi nhận ở thời điểm này. Nhiều thực vật không sinh trưởng và tỷ lệ chết cao. Tuy nhiên, phụ thuộc vào tổ hợp *Theobroma cacao* x *Theobroma grandiflorum* cụ thể một số thực vật vẫn sống sót và đạt được các chiều cao khác nhau. Ví dụ, một số thực vật lai nhỏ có kiểu hình *Theobroma grandiflorum* có chiều cao nằm trong khoảng từ 16cm (MCGH-023-037-07) đến 22cm

(MCGH-031-020-16), trong khi đó một số thực vật lai lớn có kiểu hình *Theobroma grandiflorum* có chiều cao nằm trong khoảng từ 64cm (MCGH-023-013-02) đến 85cm (MCGH-023-014-03). Toàn bộ các thực vật lai có kiểu hình *Theobroma cacao* phát triển bình thường và có chiều cao nằm trong khoảng từ 180cm (MCGH-023-017-03) đến 260cm (MCGH-059-014-12). Thực vật lai có kiểu hình *Theobroma cacao* cũng đã ra quả. Toàn bộ các thực vật lai này là khoảng 5 năm tuổi.

Một số thực vật đã ra hoa như được thể hiện trên Fig.6. Các hoa này có đặc tính chung của hai loài được sử dụng để lai, tức là trong trường hợp cụ thể này hoa có kiểu hình *Theobroma grandiflorum* nhưng chiều cao thấp hơn (vẫn cao hơn *Theobroma cacao*) và cuống hoa tương tự hoa ca cao.

6. Phân tích ADN

Các mảnh lá của các thực vật lai được thu nhận và ADN được chiết bằng kit DNeasy Plant Mini (Qiagen).

Kiểu gen được phân tích bằng cách sử dụng các chất đánh dấu dạng đa hình nucleotit đơn được phát triển cho *Theobroma cacao* (Kuhn et al. 2010).

51 dòng *Theobroma cacao* và 25 dòng *Theobroma grandiflorum* được phân tích để mô tả đặc điểm 81 thực vật lai chéo giữa *Theobroma cacao* và *Theobroma grandiflorum*, và 22 chất đánh dấu dạng đa hình nucleotit đơn được sử dụng để phân tích ban đầu (xem Fig.20A và Fig.20B). Các mảnh lá của các thực vật lai được thu nhận và ADN được chiết bằng kit DNeasy Plant Mini (Qiagen). Trong số đó, 11 chất đánh dấu dạng đa hình nucleotit đơn được chọn lọc (xem Fig.21A và Fig.22B), sau đó 9 chất đánh dấu dạng đa hình nucleotit đơn được chọn lọc (được thể hiện trong Fig.22).

Theo một ví dụ được thể hiện trên Fig.22, 9 chất đánh dấu dạng đa hình nucleotit đơn, được phân bố trong 6 nhiễm sắc thể khác nhau, được sử dụng trong phân tích thực vật thể hệ sau của 12 thực vật lai (86 cá thể được phân tích), bao gồm thực vật lai từ 7 thực vật mẹ *Theobroma cacao* khác nhau, và 5 thực vật cho phấn hoa *Theobroma grandiflorum* khác nhau. Các chất đánh dấu dạng đa hình nucleotit đơn được in đậm là hữu ích trong kiểm chứng quá trình lai đã diễn ra. Ví dụ, trong thực vật lai số 15 (NA-45 x MCSG-36), 5 chất đánh dấu dạng đa hình nucleotit đơn sau là hữu ích trong xác định các thực vật lai: w17s189(T/C), e0050s274(C/T), CIR211s1036(T/A), w11s867(T/C), và w8s204(T/C). Theo ví dụ cụ thể, một thực vật thể hệ sau từ thực vật lai số 15, ở trạng thái

dị hợp tử đối với 3 trong số 5 chất đánh dấu dạng đa hình nucleotit đơn này (w17s189(T/C), e0050s274(C/T), và w11s867(T/C)), tức là thực vật thế hệ sau này có 1 alen từ mỗi thực vật cha mẹ ở vị trí nucleotit đặc hiệu. Theo đó, một hoặc nhiều chất đánh dấu dạng đa hình nucleotit đơn này được thể hiện trong Fig.22 có thể được sử dụng trong xác định và kiểm chứng các thực vật lai của *Theobroma cacao* và *Theobroma grandiflorum*.

7. Ghép thực vật lai

Một số thực vật lai chưa trưởng thành được ghép vào thân rễ của *Theobroma grandiflorum*, các thực vật còn lại được ghép vào thân rễ của *Theobroma cacao*. Các thực vật đã phát triển tốt và được trồng trên thực địa, như được thể hiện trên Fig.8A (MCGH-031-011-36), và Fig.8B (MCGH-023-009-11). Trong trường hợp cụ thể này, thực vật lai được ghép vào thân rễ của *Theobroma grandiflorum*. Quá trình ra hoa của thực vật lai đã đạt được, như được thể hiện trên Fig.7 (MCGH-067-002-31).

Ví dụ 2

Trong năm 2010, hàm lượng axit palmitic, axit tetramethyluric, và theobromin của các hạt giống từ thực vật lai số 31 (NA-45 x MCGS-122) được phân tích bằng các phương pháp nêu trên. 10 quả và 211 hạt giống được thu nhận. Các kết quả được thể hiện trên Fig.23. Dữ liệu này cho thấy có mối tương quan giữa hàm lượng axit palmitic, axit tetramethyluric, và theobromin. Cụ thể, hàm lượng axit palmitic thấp là liên quan đến hàm lượng theobromin thấp và sự có mặt của axit tetramethyluric. Mặt khác, hàm lượng axit palmitic cao là liên quan đến hàm lượng theobromin cao và sự vắng mặt của axit tetramethyluric. Theo đó, khi không có axit tetramethyluric, hàm lượng theobromin thấp (ví dụ nhỏ hơn 5mg/g), thì các cá thể có hàm lượng axit palmitic thấp (ví dụ nhỏ hơn 15%).

Ví dụ 3

Ví dụ này so sánh ca cao lỏng thu được từ hạt giống của thực vật lai của *Theobroma cacao* và *Theobroma grandiflorum* và thực vật không lai, thực vật *Theobroma cacao* chuẩn (Low Roast West African-ELZ), và thực vật *Theobroma grandiflorum*.

Quá trình lên men vi sinh vật

Quá trình lên men vi sinh vật các quả trưởng thành từ NA-45 x MCSG-122,

EET400 x MCSG46, và NA45 x MCSG-46 được thực hiện như sau. Các quả được bỏ 1 ngày sau khi thu hoạch bên ngoài phòng thí nghiệm và các hạt được tách cẩn thận và đặt vào các túi lưới ni-lông riêng, sau đó đặt vào trong các túi kín có khóa kéo. Đồng thời, khối thịt quả mới được điều chế và chuyển vào bình được đậy nắp ở nhiệt độ môi trường trong khoảng 1-3 giờ để hoạt hóa quá trình lên men. Sau đó mỗi túi chứa các hạt được chuyển vào phòng thí nghiệm ở đó 5mL khối thịt quả mới lên men được bổ sung vào túi có khóa kéo này. Các túi này được ủ ở nhiệt độ có kiểm soát. Vào ngày thứ hai và thứ tư, dịch nhầy của mỗi túi có khóa kéo này được tách và loại bỏ. Sau khi lên men, các hạt được sấy bằng cách phơi nắng đến độ ẩm nằm trong khoảng từ 7 đến 8%. Sau khi sấy, các hạt từ mỗi túi riêng được bảo quản trong các túi đậy. Hạt từ thực vật *Theobroma cacao* (Low Roast West African-Ell) và thực vật *Theobroma grandiflorum* có bán trên thị trường, do đó dễ dàng được lên men.

Sau khi sấy, 1/3 hạt giống được tách, đông khô (sấy kết đông) và phân tích về hàm lượng axit palmitic (C 16:0) bằng phương pháp sắc ký khí mao quản, và hàm lượng theobromin và axit tetramethyluric bằng phương pháp HPLC pha đảo, như được mô tả nêu trên.

Dựa trên hàm lượng axit palmitic, các hạt được chia thành 8 nhóm hoặc băng sau:

Băng 1 8,38 - 9,99% C16:0
Băng 2 10,00 - 10,99% C16:0
Băng 3 11,01 - 11,99% C16:0
Băng 4 12,00 - 12,98% C16:0
Băng 5 13,03 - 13,99% C16:0
Băng 6 13,26 - 15,37% C16:0
Băng 7 17,65 - 19,43% C16:0
Băng 8 19,62 - 22,07% C16:0

Các nhóm này cũng được thể hiện trong Fig.24. Hàm lượng theobromin được thể hiện dưới dạng các đường đồ thị với các điểm dữ liệu cụ thể, trong khi đó hàm lượng axit palmitic được thể hiện dưới dạng các phần đồ thị có màu (hoặc thanh đồ thị) trong mỗi băng. Dựa trên hàm lượng axit palmitic và theobromin thấp, đã kiểm chứng được rằng các hạt ở băng 1-6 là hạt giống lai. Mặt khác, dựa trên hàm lượng axit palmitic và theobromin cao, đã kiểm chứng được rằng các hạt ở băng 7 và 8 không phải là hạt giống lai.

Phương pháp sản xuất ca cao lỏng

Để sản xuất ca cao lỏng, các hạt được đặt vào các khay thép không gỉ và rang

trong lò Binder ở nhiệt độ 121°C trong 21 phút. Các hạt được làm nguội ở nhiệt độ phòng và bỏ sao cho nhân hạt được tách khỏi vỏ hạt một cách dễ dàng. Sau đó, chúng được nhặt bằng tay để loại bỏ toàn bộ vỏ. Sau đó, nhân hạt (tổng cộng 35g) được nghiền trong máy nghiền Restch RM200 trong 30 phút. Cuối cùng, ca cao lỏng được chuyển vào ống và bảo quản ở nhiệt độ -20°C để phân tích.

Hàm lượng axit palmitic (C 16:0) và theobromin của ca cao lỏng từ hạt giống của các thực vật lai (bảng B1-B6), các thực vật lai không lai (bảng B7-B8), *Theobroma cacao*, và *Theobroma grandiflorum* được phân tích. Axit palmitic được tính toán dưới dạng tỷ lệ phần trăm của hàm lượng tổng cộng của axit béo, và theobromin được tính toán theo đơn vị mg/g. Các kết quả phân tích được thể hiện dưới đây:

	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	Tc	Tg
Axit palmitic (C 16:0)	14,03	14,6	15,52	16,52	17,8	18,35	24,51	26,21	25,8	6,49
Theobromin	0,07	0,06	0,08	0,05	0,04	0,04	0,99	0,99	1.13	0

Các kết quả cho thấy ca cao lỏng từ hạt giống của thực vật lai *Theobroma cacao* và *Theobroma grandiflorum* có hàm lượng axit palmitic, và hàm lượng theobromin thấp hơn *Theobroma cacao*.

Nhiệt độ nóng chảy, nhiệt độ kết tinh và đặc tính nóng chảy cũng được phân tích theo phương pháp mô tả trong tài liệu Campos R. (2005) *Experimental Methodology, in Fat Crystal Networks*, Editor Alejandro G. Marangoni, Marcel Dekker, USA pp. 267-348.

Các kết quả được thể hiện trên Fig.25 (nhiệt độ nóng chảy), Fig.26 (nhiệt độ kết tinh), và Fig.27 (đặc tính nóng chảy). Dữ liệu này cho thấy ca cao lỏng từ hạt giống của thực vật lai *Theobroma cacao* và *Theobroma grandiflorum* có nhiệt độ nóng chảy cao hơn *Theobroma cacao*, nhiệt độ kết tinh cao hơn *Theobroma cacao*, và thích hợp để sản xuất sản phẩm ca cao do đặc tính nóng chảy tương tự *Theobroma cacao*.

Để sản xuất sản phẩm sôcôla 70%, ví dụ 30% đường được bổ sung vào ca cao lỏng. Phương pháp sản xuất sôcôla hoặc caramel v.v. (không chứa xenlodextrin) đã biết trong lĩnh vực này và được mô tả trong tài liệu *Chocolate, Cocoa and Confectionery*, Bernard W. Minifie Third Edition, được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn.

Ví dụ 4

Ví dụ này cho thấy rằng thực vật lai của *Theobroma cacao* và *Theobroma*

grandiflorum có thể được lai ngược với một trong số hai thực vật cha mẹ của nó.

Chọn lọc thực vật cha mẹ

Thực vật cha được chọn lọc từ một trong số các thực vật lai theo sáng chế dựa trên đặc tính hàm lượng axit palmitic thấp của nó, tính trạng hình thái và phân tích ADN kiểm chứng quá trình lai giữa *Theobroma cacao* và *Theobroma grandiflorum*. Thực vật mẹ được sử dụng trong lai ngược là thực vật *Theobroma cacao*.

Quá trình thụ phấn

Quá trình thụ phấn được thực hiện bằng tay bằng cách đập hoa của thực vật mẹ bằng các ống polyetylen trong 24 giờ, trước khi nở hoa. Vào ngày thụ phấn, các ống được lấy ra và ống nhụy hoa của thực vật mẹ được bộc lộ bằng cách loại bỏ các nhị lép. Sau đó, phấn hoa từ loài *Herrania* sp được nhúng vào ống nhụy để khắc phục sự không tương thích của phấn hoa. Tiếp theo, phấn hoa từ hoa tươi của thực vật lai được rắc vào ống nhụy của thực vật *Theobroma cacao* mẹ. Ngoài ra, quá trình thụ phấn không sử dụng phấn hoa từ loài *Herrania* sp. cũng được thực hiện. Trong bước tiếp theo, các hoa đã thụ phấn được bảo vệ bằng cùng ống polyetylen để ngăn ngừa quá trình thụ phấn không mong muốn trong 24 giờ. Sau khoảng thời gian này, ống được lấy ra và quá trình thụ phấn thành công được kiểm chứng trong 30 ngày.

Thu nhận hạt giống lai

Khoảng 140 đến 160 ngày sau thụ phấn các quả trưởng thành được thu nhận và chuyển vào phòng thí nghiệm, ở đó chúng được làm sạch bằng nước tẩy trắng, hơi trên ngọn lửa và bỏ trong tủ hút. Sau đó, hạt giống được tách khỏi các quả bằng kẹp vô trùng và đặt vào các đĩa petri vô trùng. Sau đó, vỏ hạt giống được bóc ra và 1/3 hạt giống, tương ứng với vùng chứa nội nhũ, được cắt và phân tích hóa học về hàm lượng axit béo. Sau đó, phần còn lại của hạt giống được gieo vào môi trường sinh trưởng thực vật thân gỗ (Lloyd and McCown's, 1981), và đặt vào buồng sinh trưởng ở nhiệt độ khoảng 27°C, độ ẩm tương đối bằng 70% và cường độ chiếu sáng nằm trong khoảng từ 90 đến 120 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{giây}^{-1}$.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng phần mô tả nêu trên chỉ nhằm mục đích minh họa và các cải biến chi tiết có thể được thực hiện trong phạm vi của sáng chế. Các patent và công bố đơn được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn.

Các phương án theo sáng chế có thể được cải biến, thay đổi và biến đổi tương đương về hình thức và chức năng, như được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

Tài liệu tham khảo

Adamson et al., "HPLC method for the Quantification of Procyanidins in Cocoa and Chocolate Samples and Correlation to Total Anti-oxidant Capacity," J. Agric. Food Chem. 47, 1999, 4184-4188

Addison G.O., Tavares R.M. 1951. Observações sobre as espécies do gênero Theobroma que ocorrem na Amazônia. Boletim Técnico do Instituto Agrônômico do Norte 25:3-20.

Addison G.O., Tavares R.M. 1952. Hybridization and grafting in species of Theobroma which occur in Amazonia. Evolution 6: 380-386.

Bartley B.G.D. 2005. The Genetic diversity of cacao and its utilization. CABI Publishing. 341 pp.

Blauch, J.L. and Stanley, M.T., "Determination of Caffeine and Theobromine in Coffee, Tea and Instant Hot Cocoa Mixes," Journal of Food Science, 48, (1983), pp. 745-747.

Borrone et al., Theor. Appl. Genet. 109 (3), 495-507 (2004).

Campos R. (2005) Experimental Methodology, in Fat Crystal Networks, Editor Alejandro G. Marangoni, Marcel Dekker, USA. pp. 267-348

Carpenter D.R., Hammerstone J.F., Romanczyk L.J. and Aitken W.M. 1994. Lipid Composition of Herrania and Theobroma Seeds. J. Am. Oil Chem. Soc. 71: 845-851.

Christie, W.W., J. Lipid Res., 23, 1072-1075 (1982).

Christie, W.W., (1989) Gas Chromatography and Lipids: A Practical Guide, The Oily Press, Dundee.

Ciucanu, I. and Kerek, F., J. Chromatography, 279, 493-506 (1984).

Cuatrecasas, J. 1964. Cacao and its allies: a taxonomic revision of the genus Theobroma. Contributions from The United States National Herbarium 35: 379-614.

Figueira A., Pires J.L., Cascardo J.C.M., Cardoso R.D., Nascimento C.S., Lambert S.V. 2000. Cocoa butter quality can be improved by genetic breeding for fatty acid and

triacylglycerol composition and hardness. In. Proceedings 12th International Cocoa Research Conference, Salvador, Bahia, Brazil, 17-23 de novembro de 1996. Cocoa Producers' Alliance, Lagos, Nigeria. pp. 399-407.

Gilabert-Escrivá M.V., Gonçalves L.A.G., Figueira A. Silva C.R.S. 2002. Fatty acid and triacylglycerol composition and thermal behavior of fats from seeds of Brazilian Amazonian *Theobroma* species. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 82:1425-1431.

Gunstone F.D., Harwood J.L., Padley F.B. 1994. *The lipid handbook*. Chapman and Hall. London.

Kelm et al., "HPLC separation and purification of cacao (*Theobroma cacao* L.) procyanidins according to degree of polymerization using a diol stationary phase," *J Agric. Food Chem.* 54, 2006, 1571

Kuhn D.N., Figueira A. Lopes, U. Motamayor J.C., Meerow A.W. Cariaga K. & Freeman B. & Livingstone D.S Schnell R.J. 2010. Evaluating *Theobroma grandiflorum* for comparative genomic studies with *Theobroma cacao*. *Tree Genetics & Genomes* . 6:783–792

Kuhn et al., *Tree Genetics & Genomes* 8, 97-111 (2012).

Livingstone et al., *Mol Breeding* 27:93–106 (2011).

Martinson V.A. 1966. Hybridisation of cacao and *Theobroma grandiflora*. *Journal of Heredity* 57: 134-136.

Posnette A.F. 1945. Interspecific pollination in *Theobroma*. *Tropical Agriculture* 22: 188-190.

Pugh et al., *Theor. Appl. Genet.* 108 (6), 1151-1161 (2004).

Silva C.R.S., Venturieri G.A., Figueira A. 2004. Description of Amazonian *Theobroma* L. collections, species identification, và characterization of interspecific hybrids. *Acta Botanica Brasilis* 18: 333-341.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp sản xuất thực vật lai hoặc hạt giống lai của *Theobroma cacao* và *Theobroma grandiflorum*, bao gồm các bước sau: (a) lai chéo giống *Theobroma cacao* và giống *Theobroma grandiflorum* để thu được các hạt giống thế hệ sau từ đó; (b) phân tích ít nhất một phần các hạt giống thế hệ sau nêu trên về sự có mặt của chất đánh dấu dạng đa hình nucleotit đơn biểu thị dòng thực vật lai của *Theobroma cacao* và *Theobroma grandiflorum*, trong đó chất đánh dấu dạng đa hình nucleotit đơn này là w17s189(T/C), e0050s274(C/T), CIR211s1036(T/A), c3s595(C/A), w3 s41(G/T), w8s131(T/C), w3s558(A/G), hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng; và (c) chọn lọc một hoặc nhiều hạt giống lai từ các hạt giống thế hệ sau được phân tích trong bước (b) để sản xuất thực vật lai hoặc hạt giống lai mong muốn.
2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước trồng hạt giống được chọn lọc trong bước (c).
3. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 2, trong đó ít nhất một trong số các điều kiện sau được áp dụng: (i) bước (a) bao gồm việc rắc phấn hoa của *Theobroma grandiflorum* lên cơ quan sinh sản cái của *Theobroma cacao*; (ii) bước (a) còn bao gồm việc thu hoạch quả trưởng thành sau 140 đến 160 ngày thụ phấn, và phân tách hạt từ quả này; và/hoặc (iii) bước (b) bao gồm việc phân tách mẫu lá mầm từ hạt giống này và phân tích thành phần hóa học và/hoặc thành phần gen của các hạt giống này.
4. Phương pháp theo điểm 3, trong đó bước (b) còn bao gồm việc phân tách 1/3 lá mầm này.
5. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước gieo các hạt giống lai này trên môi trường sinh trưởng và ủ các hạt giống lai này trong buồng sinh trưởng cho đến khi thu được các thực vật lai chưa trưởng thành.
6. Phương pháp theo điểm 5, trong đó môi trường sinh trưởng là môi trường sinh trưởng thực vật thân gỗ.
7. Phương pháp theo điểm 5 hoặc 6, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước ủ các hạt giống lai này ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 27°C đến 30°C và độ ẩm tương đối

bằng 70%.

8. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 5 đến 7, trong đó các hạt giống lai này được ủ trong 10 đến 15 ngày.

9. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 5 đến 8, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước duy trì các thực vật lai chưa trưởng thành này trong buồng ẩm với độ ẩm tương đối ít nhất bằng 90%.

10. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 5 đến 9, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước chuyển các thực vật lai chưa trưởng thành này sang giá thể thích hợp chứa than bùn, bột dừa, peclit hoặc hỗn hợp của chúng.

11. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 5 đến 10, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước ghép các thực vật lai chưa trưởng thành này lên thực vật *Theobroma cacao* hoặc *Theobroma grandiflorum*.

12. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 11, trong đó bước (b) còn bao gồm việc phân tích ít nhất một phần các hạt giống thế hệ sau nêu trên về sự có mặt của axit tetrametyluric, và trong đó một hoặc nhiều hạt giống lai này là một hoặc nhiều hạt giống thế hệ sau chứa axit tetrametyluric.

13. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 12, trong đó một hoặc nhiều hạt giống lai này là một hoặc nhiều hạt giống thế hệ sau biểu hiện chất đánh dấu dạng đa hình nucleotit đơn biểu thị dòng thực vật lai của *Theobroma cacao* và *Theobroma grandiflorum*, trong đó chất đánh dấu dạng đa hình nucleotit đơn này là w17s189(T/C), e0050s274(C/T), CIR211s1036(T/A), c3s595(C/A), w3s41(G/T), w8s131(T/C), hoặc w3s558(A/G).

14. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 13, trong đó bước (b) còn bao gồm một hoặc nhiều đặc tính sau để từ đó ít nhất một phần các hạt giống thế hệ sau nêu trên được phân tích: (i) hàm lượng axit palmitic thấp hơn *Theobroma cacao*; (ii) hàm lượng theobromin thấp hơn *Theobroma cacao*; và (iii) sự có mặt của axit tetrametyluric.

15. Phương pháp theo điểm 14, trong đó một hoặc nhiều hạt giống lai này là một hoặc nhiều hạt giống thế hệ sau còn có một hoặc nhiều đặc tính sau: (i) hàm lượng axit palmitic thấp hơn *Theobroma cacao*; (ii) hàm lượng theobromin thấp hơn *Theobroma*

cacao; và sự có mặt của axit tetrametyluric.

Loài <i>Theobroma</i>	Thành phần axit béo (%)							
	Axit palmitic (C16:0)	Axit palmitoleic (C16:1)	Axit stearic (C18:0)	Axit oleic (C18:1)	Axit linoleic (C18:2)	Axit linolenic (C18:3)	Axit arachidic (C20:0)	Axit behenic (C22:0)
<i>T. cacao</i>	30,6	0,6	33,9	31,4	2,5	vết	0,9	vết
<i>T. sylvestre</i>	42,0	0,6	24,0	28,4	4,4	vết	0,6	vết
<i>T. speciosum</i>	46,9	0,8	20,2	23,3	7,2	vết	1,3	vết
<i>T. bicolor</i>	8,1	0,2	47,8	41,0	1,2	vết	1,6	vết
<i>T. obovatum</i>	8,6	vết	31,7	42,0	6,1	vết	9,7	1,4
<i>T. grandiflorum</i>	8,5	0,2	34,6	42,0	3,4	vết	9,9	1,3
<i>T. subincanum</i>	6,8	0,4	31,8	45,6	3,2	0,7	10,3	1,4
<i>T. microcarpum</i>	14,4	0,8	6,4	31,4	27,1	3,6	6,6	9,8

Fig.1

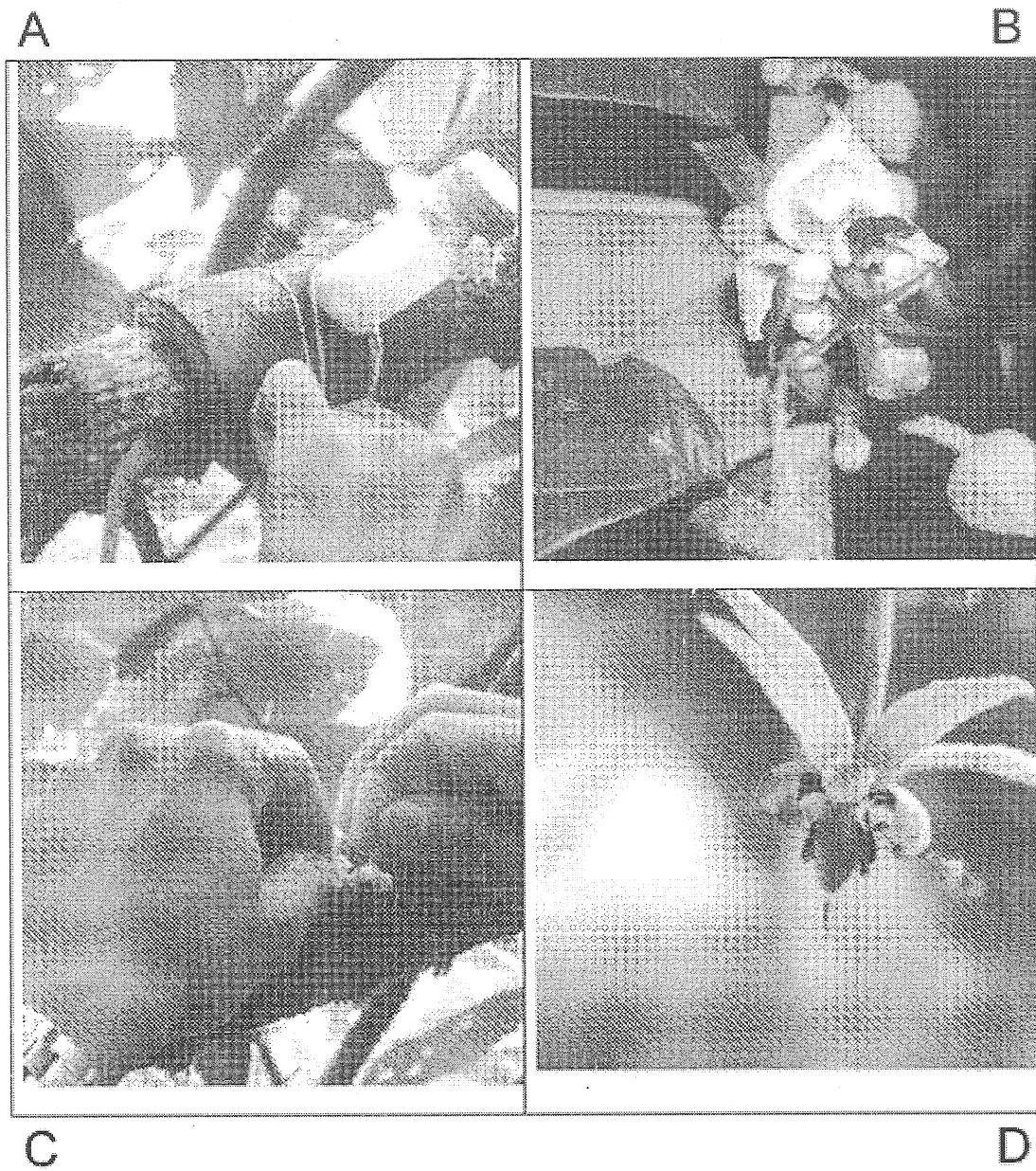
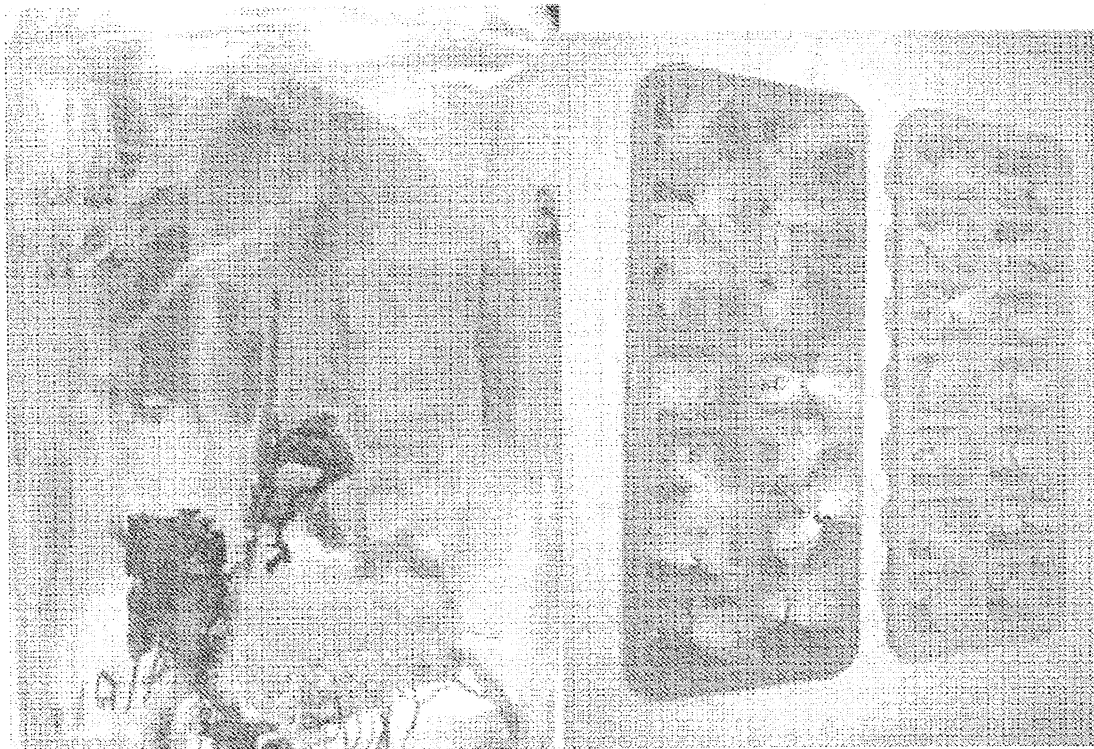
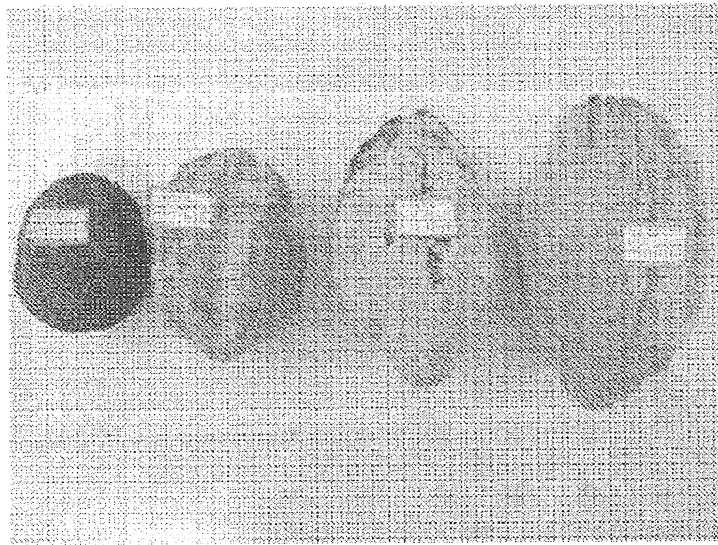


Fig.2

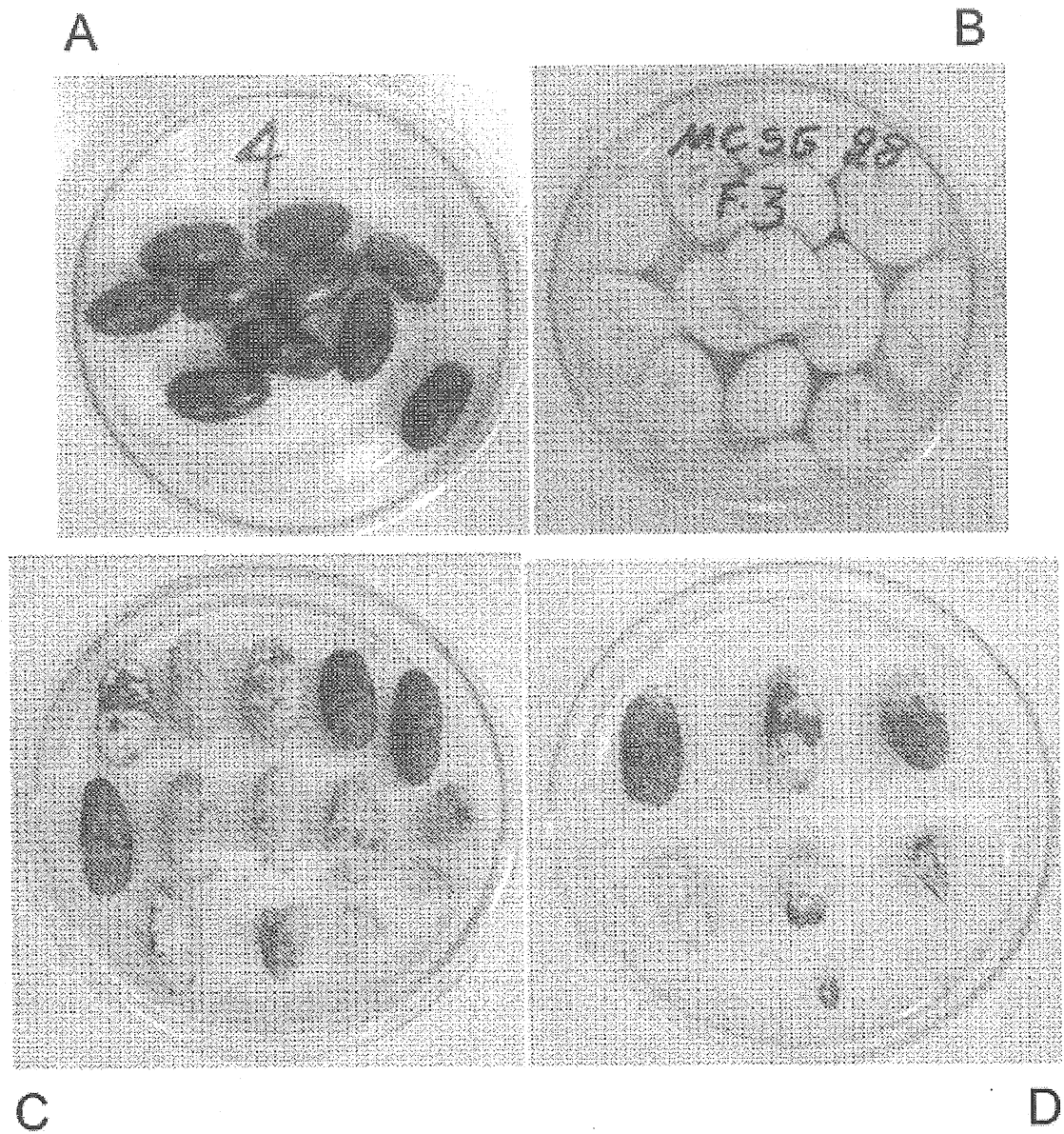
A

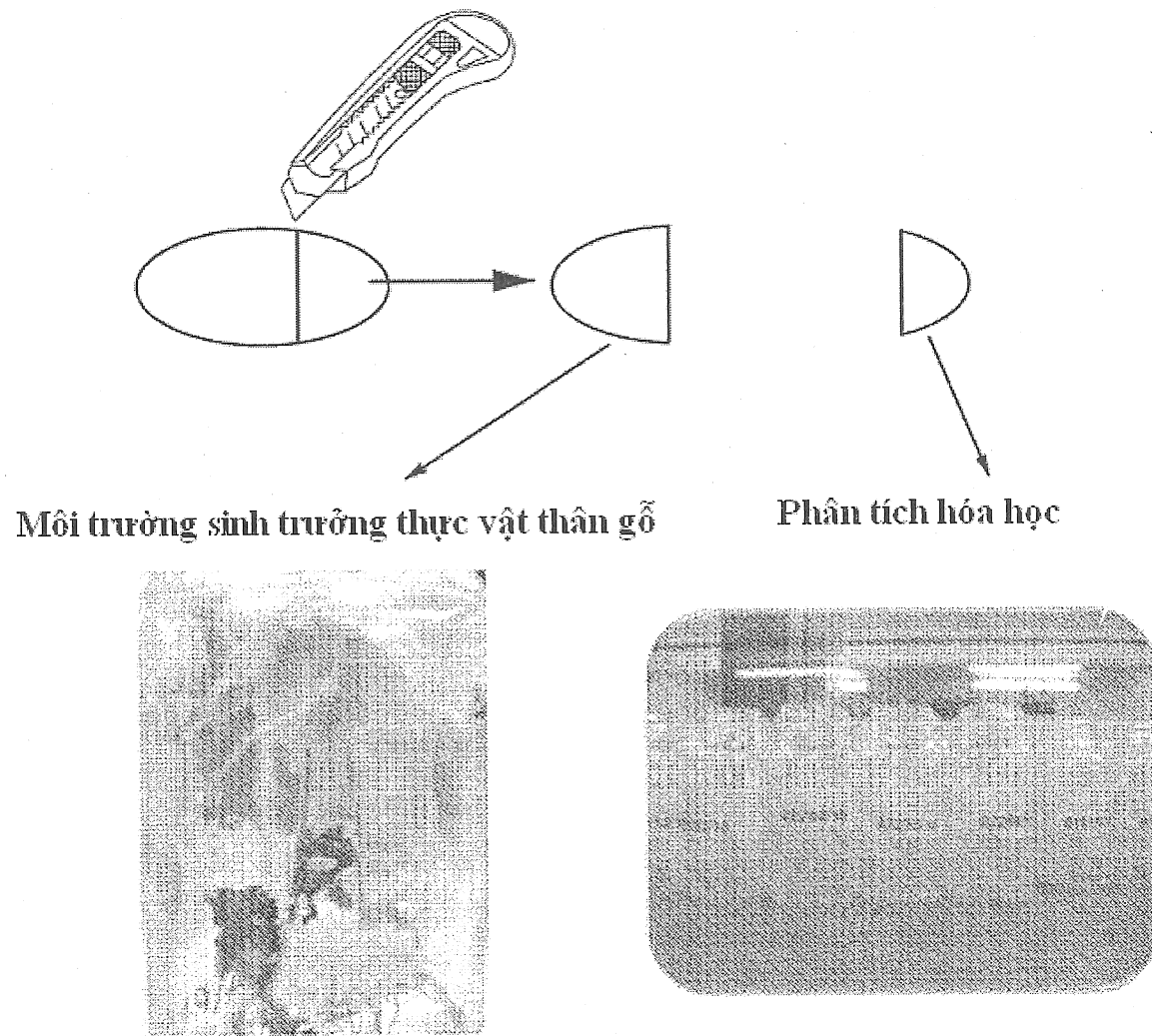


B

C

Fig.3

**Fig.4**

**Fig.5**

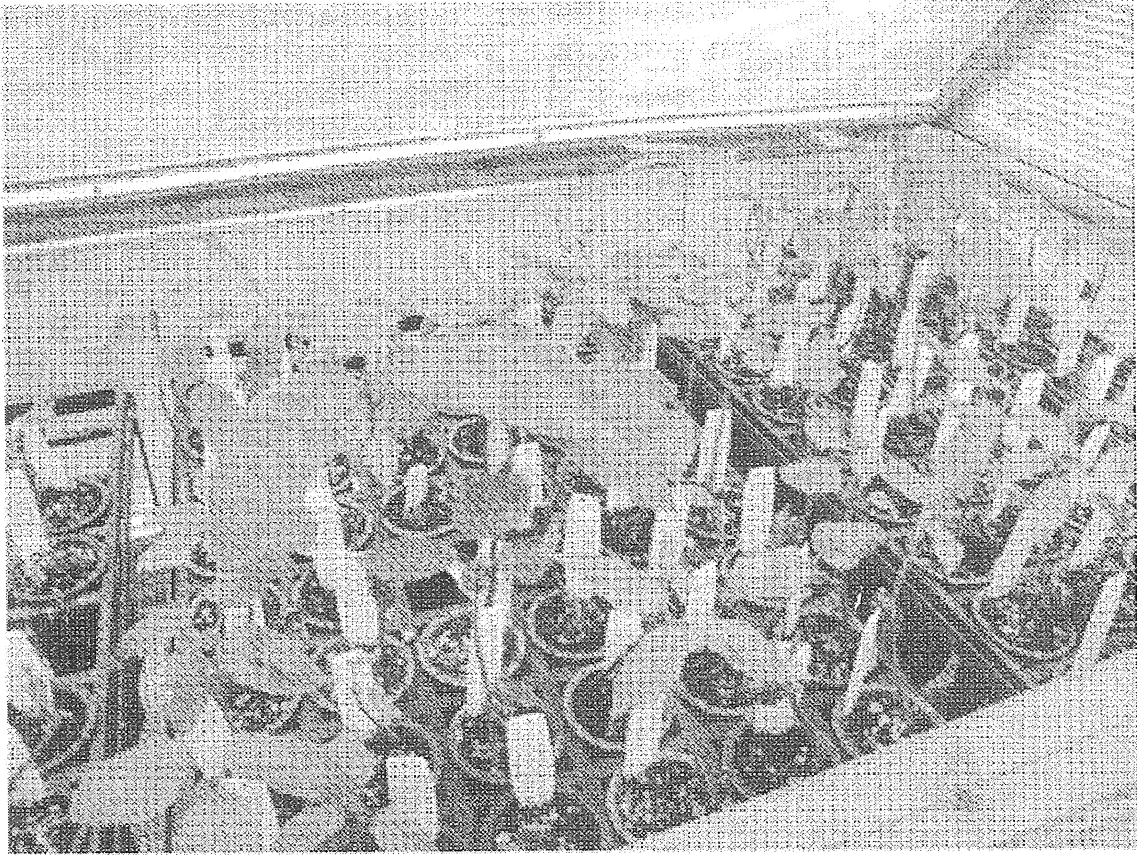


Fig.6

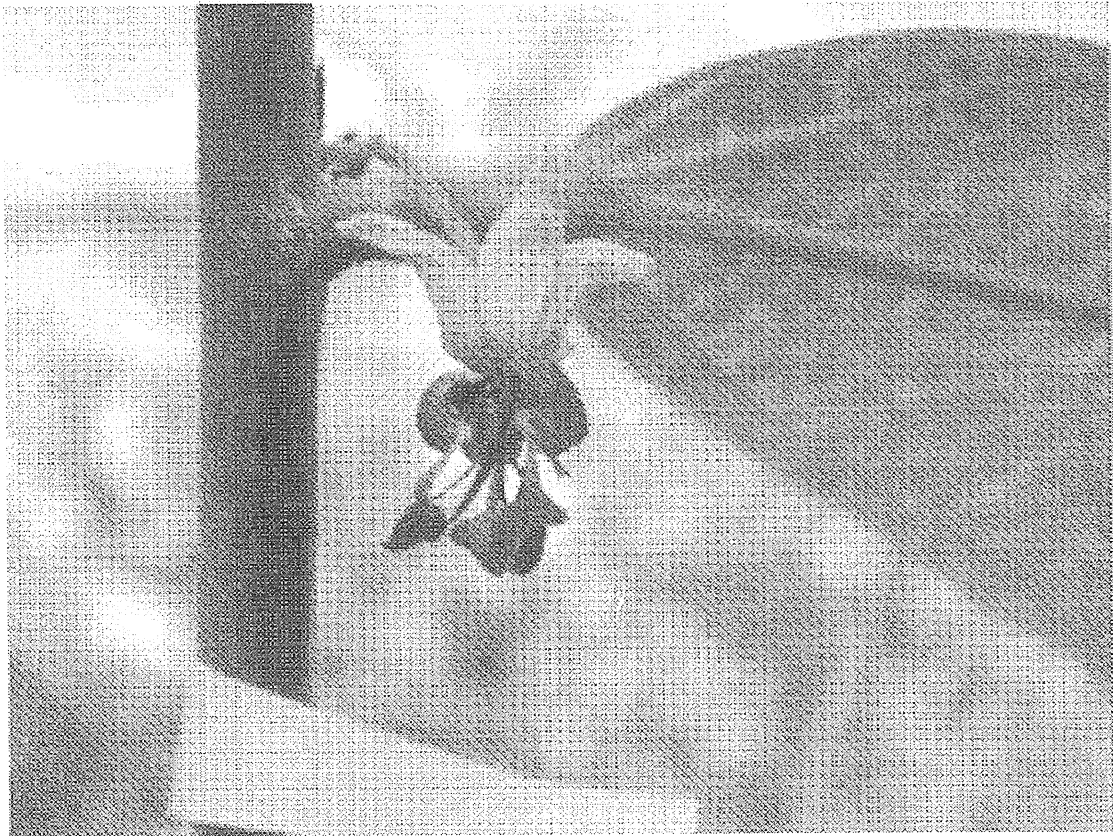
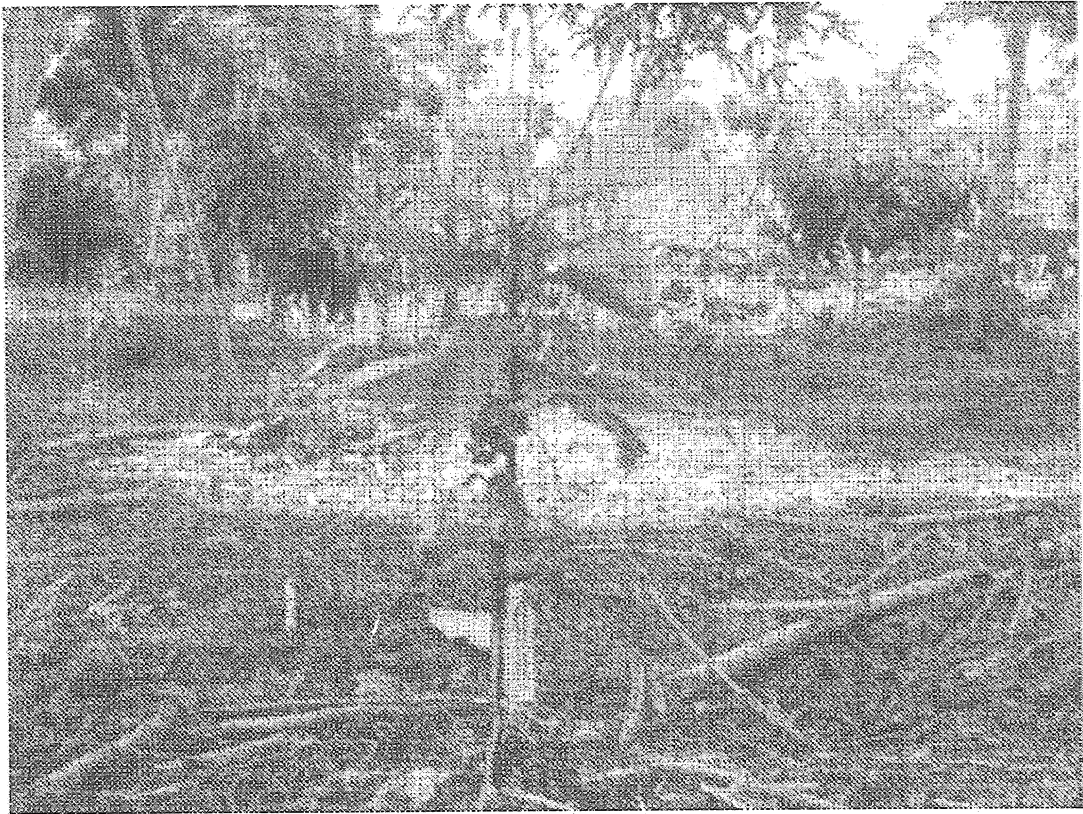
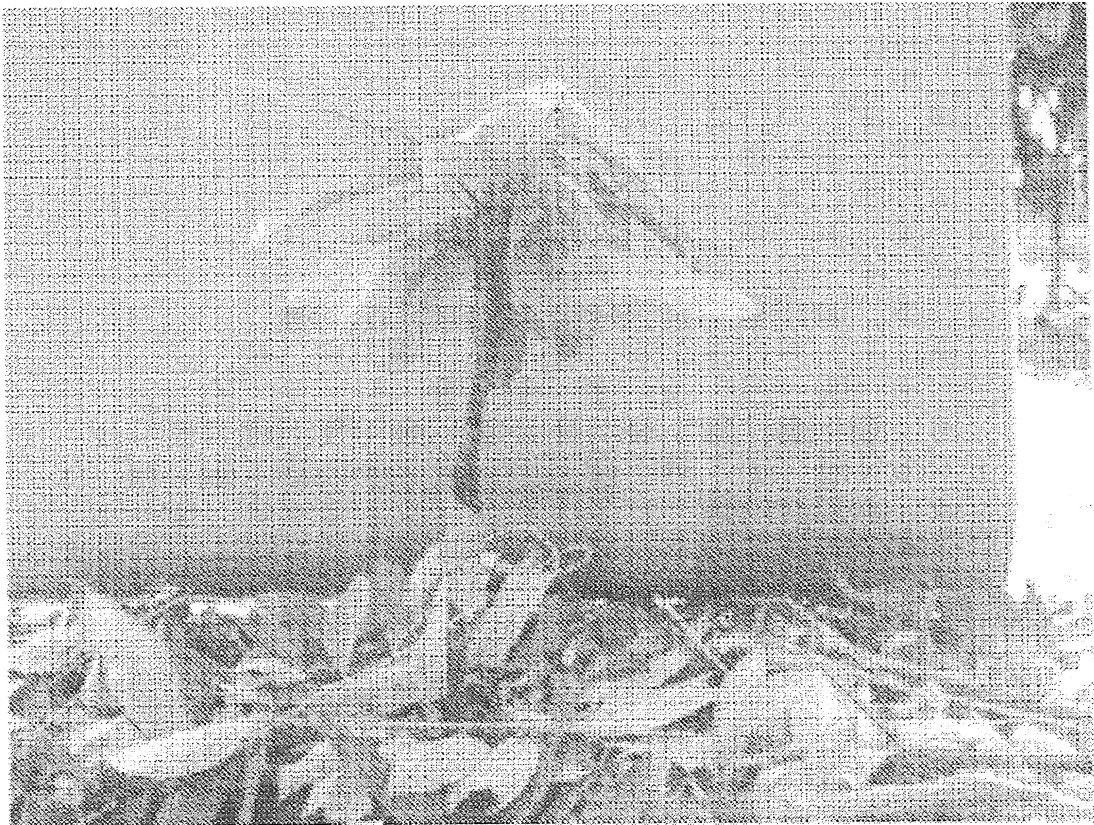


Fig.7

A

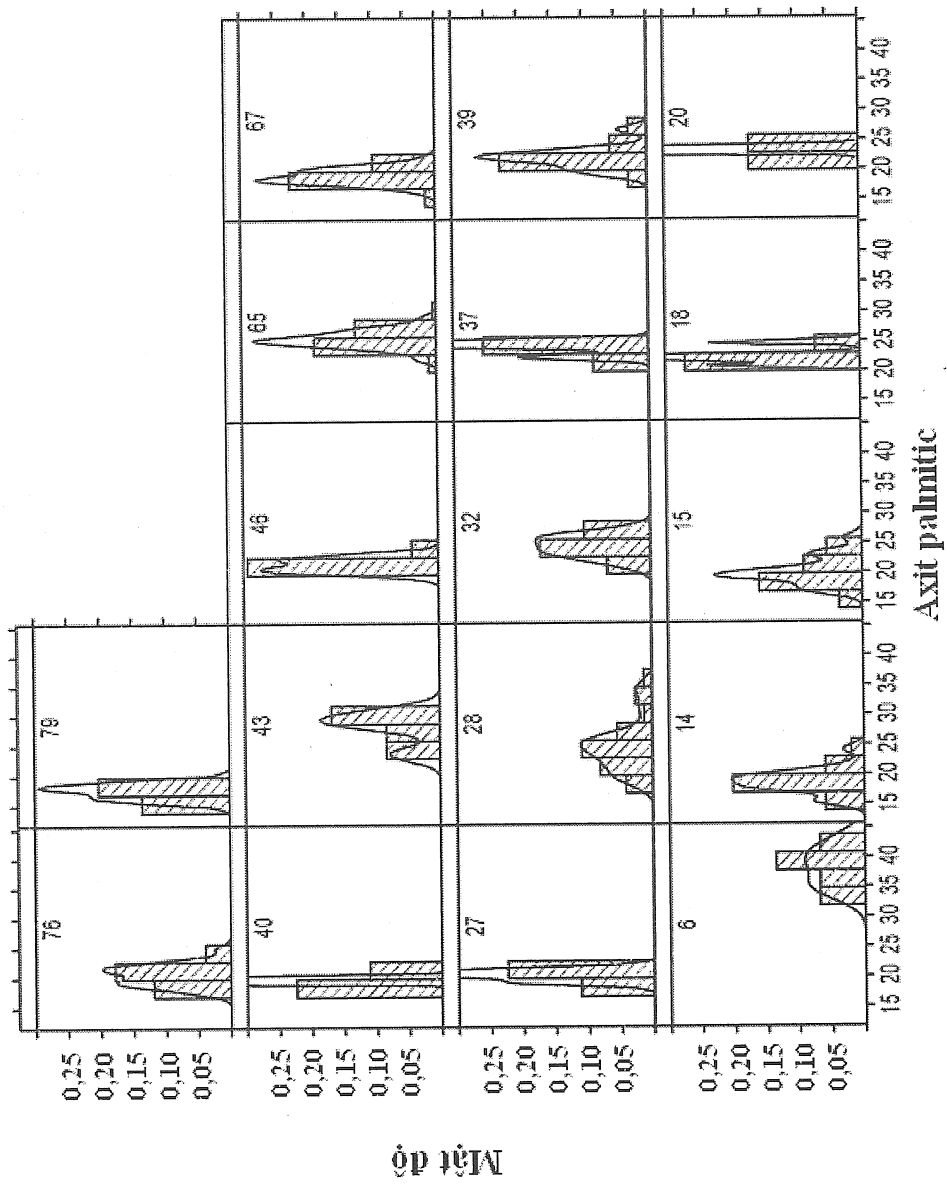


B

**Fig.8**

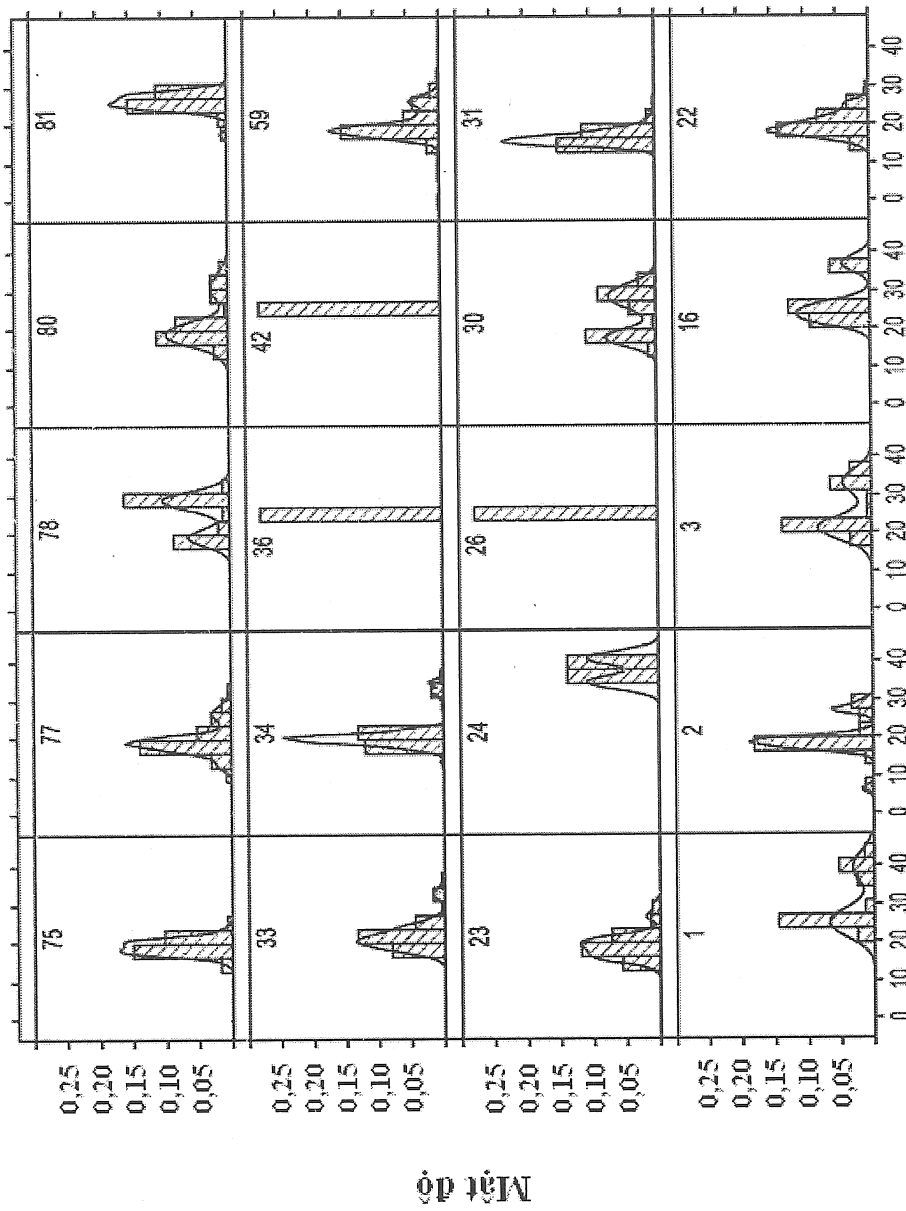
Thực vật lai	Lượng	Trung vị	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Trị số P
1	21	26,31	29,75	7,28	0,00
2	26	18,95	19,70	4,71	0,00
3	35	22,16	25,47	6,10	0,00
6	5	38,58	38,08	3,38	0,63
14	35	18,76	18,65	2,16	0,18
15	21	19,55	19,96	2,35	0,37
16	9	24,87	26,69	5,96	0,02
18	5	22,36	22,38	1,43	0,59
20	4	23,11	23,12	0,46	0,07
22	131	18,89	19,59	3,01	0,00
23	152	18,98	19,22	3,63	0,00
24	2	37,66	37,66	4,43	
26	1	24,11	24,11		
27	9	20,31	20,26	0,89	0,33
28	25	24,63	24,76	4,34	0,09
30	116	25,23	23,67	5,68	0,00
31	2096	16,13	16,44	2,01	0,00
32	47	24,58	24,39	1,83	0,50
33	84	21,09	21,98	3,93	0,00
34	113	20,20	21,01	4,18	0,00
36	1	25,09	25,09		
37	4	24,36	23,99	1,17	0,25
39	12	22,08	21,92	1,98	0,39
40	3	19,46	19,59	0,47	0,55
42	1	24,60	24,60		
43	4	28,82	27,94	3,02	0,35
46	8	21,37	21,52	1,15	0,50
59	764	19,07	20,02	3,74	0,00
65	56	25,41	25,49	1,54	0,96
67	66	18,73	18,98	1,35	0,85
75	273	19,18	19,23	2,28	0,00
76	68	20,78	20,71	1,79	0,27
77	76	19,23	19,87	4,06	0,00
78	34	27,78	25,38	4,82	0,00
79	5	18,10	17,61	1,18	0,35
80	53	20,27	21,91	6,00	0,00
81	46	26,48	26,44	2,20	0,00

Fig.9



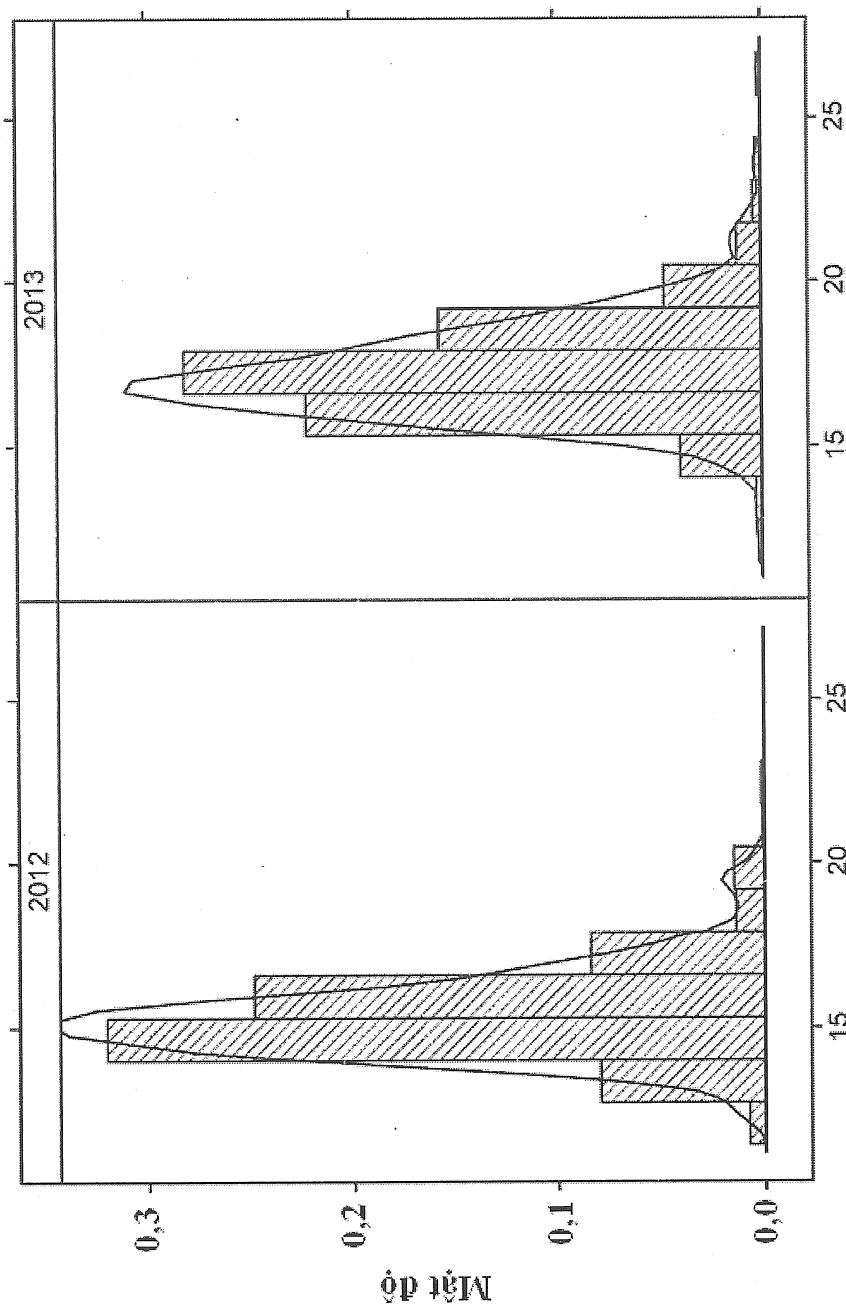
Thực vật lai có phân bố hàm lượng axit palmitic bình thường

Fig.10



Thực vật lai có phân bố hàm lượng axit palmitic không bình thường

Fig.11



Axit palmitic
 2012: 15,36%
 2013: 17,24%

Fig.12

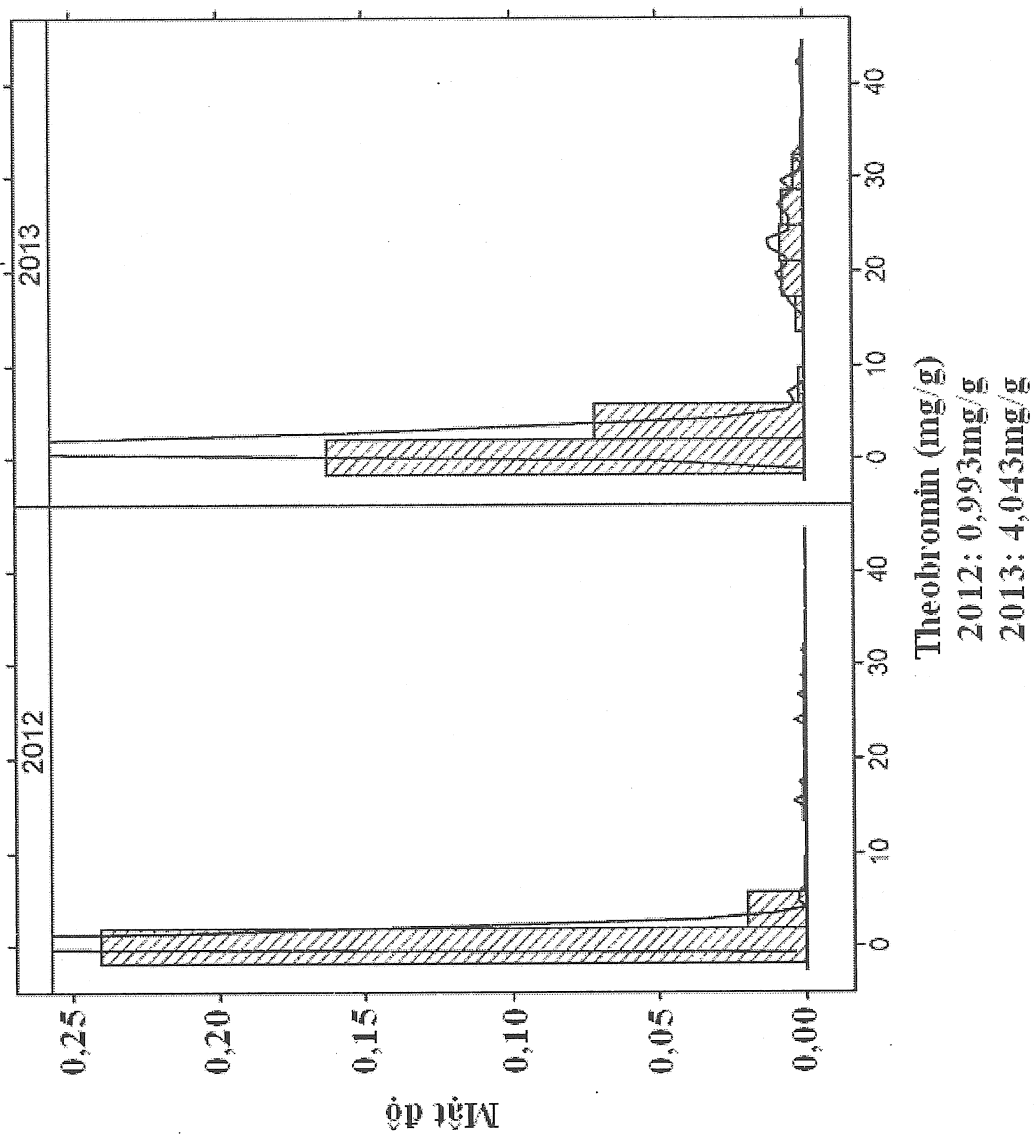


Fig.13

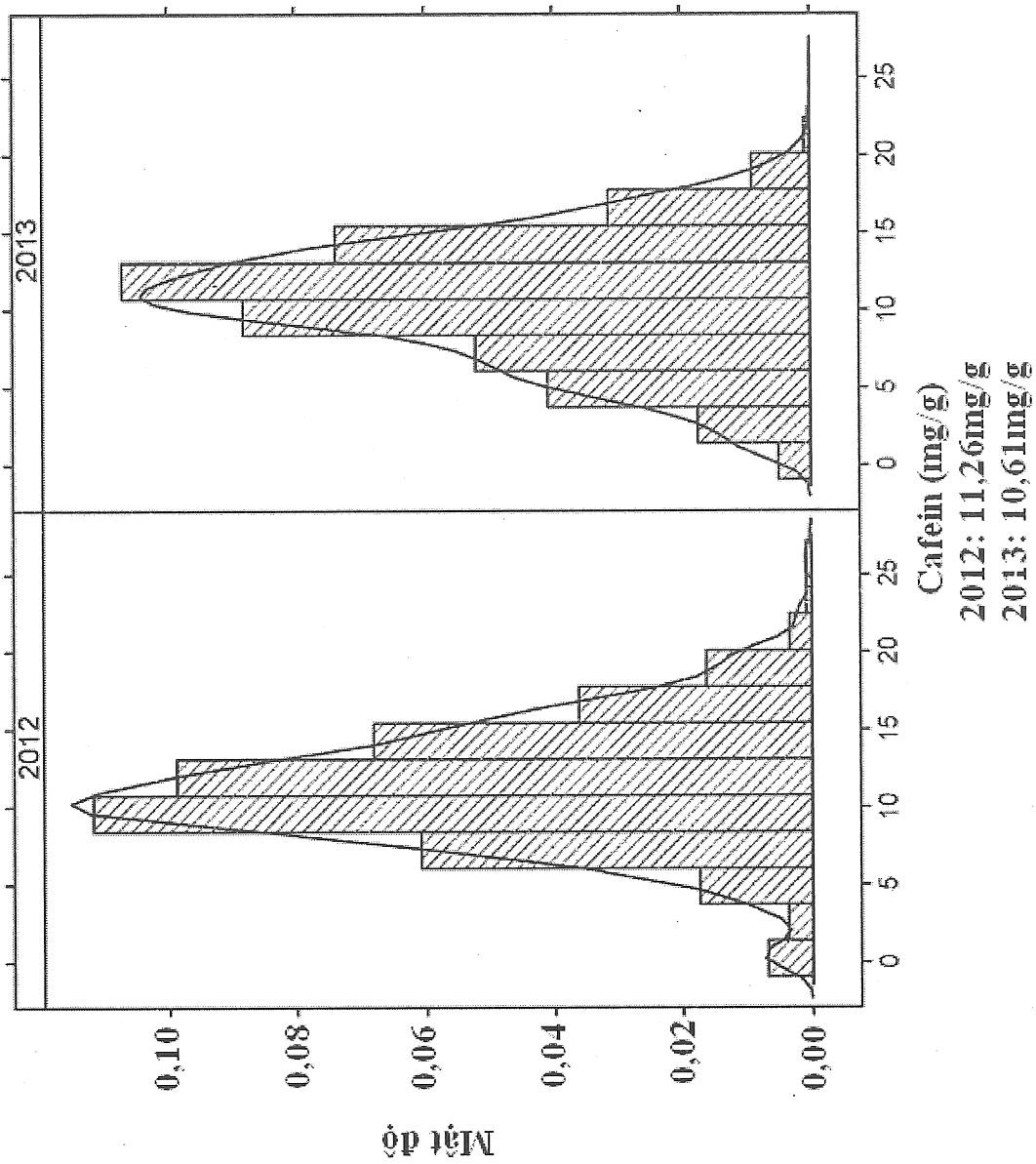
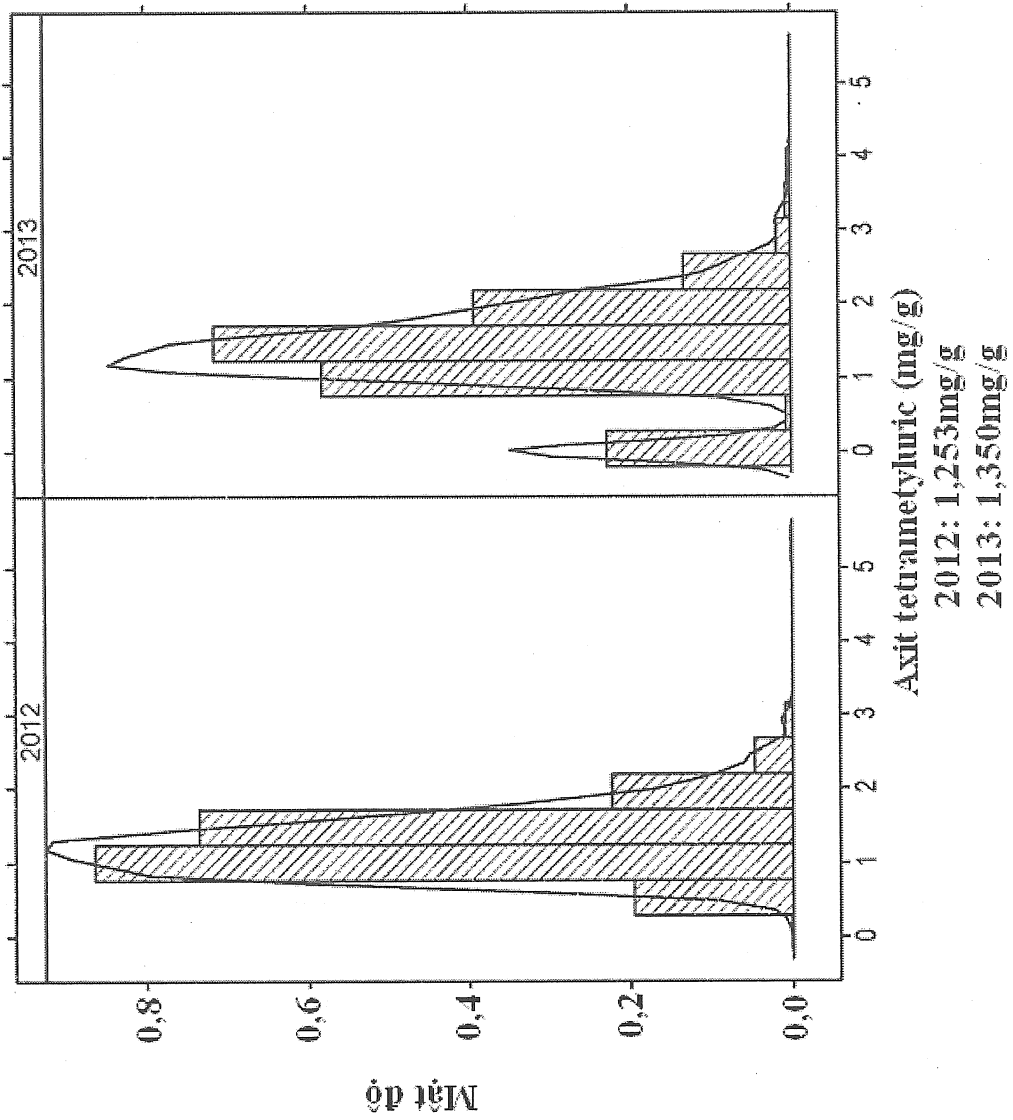


Fig.14

**Fig.15**

Thực vật lai (#)	Mẫu	Catechin (mg/g)	Epicatechin (mg/g)	Tổng Catechin + Epicatechin
ALMC5 X MCSG-46 (61)	Toàn bộ hạt	0,36	12,62	12,97
ALMC5 X MCSG-46 (61)	Toàn bộ hạt	0,23	14,37	14,60
ALMC5 X MCSG-46 (61)	Toàn bộ hạt	0,27	14,41	14,68
ALMC5 X MCSG-46 (61)	Toàn bộ hạt	0,34	14,99	15,33
ALMC5 X MCSG-46 (61)	Toàn bộ hạt	0,28	17,39	17,67
ALMC5 X MCSG-46 (61)	Toàn bộ hạt	0,15	9,58	9,73
ALMC5 X MCSG-46 (61)	Toàn bộ hạt	0,24	14,86	15,10
ALMC5 X MCSG-46 (61)	Toàn bộ hạt	0,00	3,12	3,12
ALMC5 X MCSG-46 (61)	Toàn bộ hạt	0,38	21,98	22,36
ALMC5 X MCSG-46 (61)	Toàn bộ hạt	0,26	15,85	16,12
ALMC5 X MCSG-46 (61)	Toàn bộ hạt	0,05	11,72	11,77
ALMC5 X MCSG-46 (61)	Toàn bộ hạt	0,20	5,58	5,78
ALMC5 X MCSG-46 (61)	Toàn bộ hạt	0,18	20,52	20,70
ALMC5 X MCSG-46 (61)	Toàn bộ hạt	0,34	16,60	16,94
ALMC5 X MCSG-46 (61)	Toàn bộ hạt	0,05	11,61	11,66
LCT37A X MCSG-122 (64)	Toàn bộ hạt	0,97	38,51	39,48
LCT37A X MCSG-122 (64)	Toàn bộ hạt	1,47	28,48	29,96
LCT37A X MCSG-122 (64)	Toàn bộ hạt	0,54	16,31	16,85
LCT37A X MCSG-122 (64)	Toàn bộ hạt	1,08	19,33	20,41
LCT37A X MCSG-122 (64)	Toàn bộ hạt	0,46	18,66	19,12
LCT37A X MCSG-122 (64)	Toàn bộ hạt	0,37	12,86	13,24
LCT37A X MCSG-122 (64)	Toàn bộ hạt	0,13	17,08	17,21
LCT37A X MCSG-122 (64)	Toàn bộ hạt	0,68	21,88	22,56
LCT37A X MCSG-122 (64)	Toàn bộ hạt	0,94	46,34	47,28
LCT37A X MCSG-122 (64)	Toàn bộ hạt	0,91	47,85	48,76
LCT37A X MCSG-122 (64)	Toàn bộ hạt	0,54	8,38	8,92
LCT37A X MCSG-122 (64)	Toàn bộ hạt	1,46	15,87	17,33
LCT37A X MCSG-122 (64)	Toàn bộ hạt	0,65	18,36	19,01
LCT37A X MCSG-122 (64)	Toàn bộ hạt	0,27	16,20	16,46

Fig.16

Thực vật lai (#)	Mẫu	Monome (mg/g)	Đime (mg/g)	Trime (mg/g)	Tetrame (mg/g)	Pentame (mg/g)	Hexame (mg/g)	Heptame (mg/g)	Octame (mg/g)	Noname (mg/g)	Decame (mg/g)	Flavanol cao tổng số (mg/g)
ALMC5 X MCSG-46 (61)	Toàn bộ hạt	13,44	9,25	11,11	13,70	15,11	15,26	10,44	10,10	8,22	6,34	112,98
ALMC5 X MCSG-46 (61)	Toàn bộ hạt	15,09	10,72	13,64	17,93	20,36	21,17	15,19	15,88	13,51	10,81	154,30
ALMC5 X MCSG-46 (61)	Toàn bộ hạt	15,43	11,06	14,00	18,47	21,16	21,91	15,51	15,64	12,68	9,99	155,86
ALMC5 X MCSG-46 (61)	Toàn bộ hạt	16,00	10,19	12,06	14,92	16,45	16,84	11,71	11,81	9,67	7,33	126,98
ALMC5 X MCSG-46 (61)	Toàn bộ hạt	18,43	12,96	15,65	19,78	21,79	22,07	15,26	15,23	12,21	9,18	162,56
ALMC5 X MCSG-46 (61)	Toàn bộ hạt	10,44	7,98	9,92	13,27	15,70	16,93	12,13	12,55	10,87	8,93	118,73
ALMC5 X MCSG-46 (61)	Toàn bộ hạt	15,42	11,59	14,57	18,82	21,12	21,78	15,44	15,81	13,14	10,45	158,13
ALMC5 X MCSG-46 (61)	Toàn bộ hạt	3,24	2,62	3,88	5,69	7,65	9,68	7,55	8,46	8,04	6,87	63,68
ALMC5 X MCSG-46 (61)	Toàn bộ hạt	22,76	15,83	18,42	22,35	23,94	23,64	16,61	17,28	14,46	11,33	186,63
ALMC5 X MCSG-46 (61)	Toàn bộ hạt	16,59	11,63	13,92	17,10	18,60	18,84	12,84	12,44	10,20	8,09	140,26
ALMC5 X MCSG-46 (61)	Toàn bộ hạt	12,48	10,83	13,97	18,57	21,90	23,69	17,60	19,93	17,86	15,23	172,06
ALMC5 X MCSG-46 (61)	Toàn bộ hạt	6,14	4,44	4,75	6,01	6,77	7,59	5,23	4,90	4,13	3,38	53,35
ALMC5 X MCSG-46 (61)	Toàn bộ hạt	20,69	16,33	19,79	26,45	29,38	29,64	21,23	21,57	17,47	14,16	216,71
ALMC5 X MCSG-46 (61)	Toàn bộ hạt	17,11	13,49	15,49	20,67	23,11	23,74	16,63	16,61	13,95	11,32	172,11
ALMC5 X MCSG-46 (61)	Toàn bộ hạt	12,32	9,54	11,84	15,83	18,44	20,35	14,46	14,10	11,66	9,69	138,23
LCT37A X MCSG-122 (64)	Toàn bộ hạt	41,73	24,90	25,51	29,15	29,60	29,45	21,18	22,43	18,16	14,11	256,22
LCT37A X MCSG-122 (64)	Toàn bộ hạt	29,60	20,27	24,41	30,35	32,14	32,00	22,91	22,67	17,48	13,36	245,21
LCT37A X MCSG-122 (64)	Toàn bộ hạt	17,94	12,84	16,22	21,34	24,04	24,50	17,07	16,75	13,41	10,52	174,62
LCT37A X MCSG-122 (64)	Toàn bộ hạt	21,33	13,29	15,13	18,43	19,76	20,04	13,59	12,83	9,97	7,51	151,87
LCT37A X MCSG-122 (64)	Toàn bộ hạt	20,46	12,92	15,46	19,43	21,25	21,38	14,47	13,38	10,24	7,83	156,82
LCT37A X MCSG-122 (64)	Toàn bộ hạt	14,38	8,53	10,55	13,56	15,26	15,66	10,46	9,14	6,96	5,20	109,69
LCT37A X MCSG-122 (64)	Toàn bộ hạt	18,09	11,97	14,48	19,18	21,94	22,69	15,81	15,21	12,15	9,46	160,99
LCT37A X MCSG-122 (64)	Toàn bộ hạt	23,06	16,18	19,42	24,63	26,75	26,63	18,25	17,72	13,56	10,26	196,48
LCT37A X MCSG-122 (64)	Toàn bộ hạt	50,65	30,95	31,62	35,82	36,15	35,25	26,05	28,38	23,26	18,71	316,83
LCT37A X MCSG-122 (64)	Toàn bộ hạt	53,98	34,93	36,89	42,87	43,24	42,37	32,17	36,50	28,89	22,85	374,69
LCT37A X MCSG-122 (64)	Toàn bộ hạt	9,80	6,61	8,09	11,17	13,79	15,54	11,00	10,94	9,44	7,51	103,90
LCT37A X MCSG-122 (64)	Toàn bộ hạt	18,04	11,37	12,04	14,01	14,29	13,93	8,62	7,10	5,14	3,46	108,01
LCT37A X MCSG-122 (64)	Toàn bộ hạt	19,72	13,01	15,35	18,65	19,81	19,24	12,40	10,87	7,93	5,84	142,81
LCT37A X MCSG-122 (64)	Toàn bộ hạt	18,00	12,82	15,03	19,37	21,45	21,80	14,65	13,58	10,50	8,19	155,39

Fig.17

Dòng
ALMC5
P7-B
ICS39
NA168
ALMC3
IP268
ICS40
NO34
UF 677
NA45
EET400
P10B
PH85
COCA 3370/5
GU114
AMAZ 12/4
FADA100
LCT 37F
RB37
AMAZ 1515
CA-14
CAB-0022
CAB-0266
CCN 10
CCN 51
COMUM
GU-296H
HUALLAGA-7
HUALLAGA-9
IAC-1
IP-38
LCTEEN-1621010
LCTEEN-37A
LCTEEN-37G
MOQ4 25
PAIN9 316

Fig.18A

PAQUETA 01
PH 123
PH 9
RB 39
ROSA MARIA
S.THIAGO
SC-1
SJ-02
UF-667
VB-1151
VB-1156
VB-276
VB-515
AMAZ 6.3
SUBCANUM
MCSG 17
MCSG 122
MCSG 174
MCSG 134
MCSG 74
MCSG 148
MCSG 36
MCSG 42
MCSG 101
MCSG 30
MCSG 46
MCSG 69
MCSG 89
MCSG 95
MCSG 11
MCSG 139
MCSG 150
MCSG 173
MCSG 2
MCSG 28
MCSG 3
MCSG 37
MCSG 41
MCSG 47
MCSG 98
MCSG 35

Fig. 18B

Mã	Thực vật lai	
01	ALMC-3	MCSG-69
02	ALMC-5	MCSG-42
03	AMAZ-12/4	MCSG-101
04	AMAZ-6.3	MCSG-41
06	CAB-0022	MCSG-28
07	CAB-0266	MCSG-98
09	COMUM	MCSG-2
10	CCN-10	MCSG-3
11	CCN-51	MCSG-41
12	COCA-3370/5	MCSG-37
14	EET-400	MCSG-42
15	NA-45	MCSG-36
16	FADA-100	MCSG-122
17	GU-114	MCSG-42
18	GU-296H	MCSG-101
19	HUALLAGA-7	MCSG-101
20	HUALLAGA-9	MCSG-46
21	IAC-1	MCSG-37
22	ICS-39	MCSG-69
23	ICS-40	MCSG-89
24	IP-268	MCSG-41
25	IP-38	MCSG-41
26	CTEEN-162101	MCSG-41
27	LCTEEN-37A	MCSG-46
28	LCTEEN-37F	MCSG-89
29	LCTEEN-37G	MCSG-3
30	NA-168	MCSG-89
31	NA-45	MCSG-122
32	NO-34	MCSG-89
33	P-10B	MCSG-122
34	P-7B	MCSG-69
35	PAQUETA-01	MCSG-98
36	PH-123	MCSG-41
37	PH-85	MCSG-148
38	RB-37	MCSG-74

Fig.19A

39	RB-39	MCSG-46
40	ROSA MARIA	MCSG-11
41	SC-1	MCSG-69
42	SJ-02	MCSG-122
43	UF-667	MCSG-95
44	UF-677	MCSG-95
45	VB-1151	MCSG-150
46	VB-1156	MCSG-2
47	VB-276	MCSG-2
48	VB-515	MCSG-46
49	CCN-10	MCSG-41
50	ALMC-5	MCSG-30
51	UF-677	MCSG-134
52	NA-168	MCSG-36
53	COCA-3370/5	MCSG-139
54	IP-268	MCSG-95
55	GU-114	MCSG-174
56	ALMC-3	MCSG-35
57	LCTENN-37/G	MCSG-173
58	CTEEN-162101	MCSG-47
59	NA-45	MCSG-46
60	EET-400	MCSG-46
61	ALMC-5	MCSG-46
62	NA-168	MCSG-122
63	MOQ-4.25	MCSG-46
64	LCT-37A	MCSG-122
65	ALMC-5	MCSG-122
66	AMAZ-1515	MCSG-122
67	P-7B	MCSG-122
69	ROSA MARIA	MCSG-46
70	AMAZ-1515	MCSG-46
71	NA-45	SUBCANUM
72	PAIN - 9.316	MCSG-46
74	ICS 40	MCSG 46
75	EET-400	MCSG 122
76	ICS 40	MCGS 122
77	P 10B	MCGS 46
78	CCN-51	MCGS 46
79	PH-9	MCGS 46
80	CA-1.4	MCGS 46
81	S. THIAGO	MCGS 47

Fig. 19B

Dòng	Dạng đa hình nucleotit đơn																						
	w17s189 (T/C)	w7s104 (T/A)	w3s463 (C/G)	w3s41 (G/T)	w3s558 (A/G)	e0050s274 (C/T)	TirB_339 (C/A)	w11_867 (T/C)	w8s131 (T/C) Sonda 119	c5s639 (A/G)	CIR222s296 (T/C)	w8s131 (T/C) Sonda 131	c3s595 (C/A)	c4s123 (G/A)	c4s536 (G/A)	CIR160s384 (G/A)	CIR211s1036 (T/A)	CIR222s296 (Sonda 316) (G/T)	CIR37s112 (G/C)	w8s204/w8s288 (T/C)	w8s288 (G/A)	Est_4785_737 (C/T)	
ALMC-5	H	A	C	H	A	C	H	H	T	H	T	C	H	A	G	A	H	T	H	T	G	T	
P7-B	H	A	H	G	H	C	C	C	C	A	T	C	A	A	G	A	H	T	H	C	G	H	
ICS39	H	H	H	H	H	H	C	H	H	A	T	C	C	H	H	A	H	H	G	H	G	T	
NA165	H	A	C	G	A	C	C	C	C	A	T	C	A	A	G	A	T	T	H	C	G	H	
ALMC3	H	A	C	T	A	C	A	C	H	H	T	H	C	A	G	A	T	T	G	T	H	T	
IP268	H	A	H	H	H	C	H	H	H	H	T	H	C	A	G	A	H	H	G	T	H	T	
ICS40	H	H	H	H	H	H	C	H	H	A	T	C	C	H	H	A	H	H	G	H	G	T	
NO34	H	H	C	T	A	H	A	C	H	H	T	H	C	A	G	A	T	H	G	T	H	H	
UF 677	H	H	H	H	H	H	C	H	H	A	T	C	C	H	H	A	H	H	G	H	G	T	
NA45	T	A	G	G	H	C	C	C	C	A	T	C	A	A	G	A	A	T	G	C	G	C	
EET400	T	A	G	G	G	C	H	C	C	A	T	C	C	A	H	A	H	T	G	H	G	H	
P10B	T	A	G	G	G	C	C	C	C	A	T	C	C	A	H	A	H	T	G	H	G	H	
PH85	T	A	H	H	H	C	H	T	H	A	T	C	C	G	A	A	H	G	G	H	G	T	
COCA 3370/5	C	A	G	G	G	H	C	C	C	A	T	C	A	A	G	A	H	T	G	C	G	H	
GU114	C	A	G	G	G	C	C	C	C	A	T	C	A	A	G	G	T	G	G	T	G	C	
AMAZ 12/4	C	A	C	H	H	C	C	C	C	A	T	C	A	A	G	A	H	H	G	C	G	C	
FADA 100	C	A	H	H	H	C	H	C	H	H	T	H	C	A	G	A	T	H	G	T	H	C	
LCT 37F	C	H	C	H	A	C	C	C	C	A	T	T	C	A	H	A	T	H	G	H	H	H	
RB37	C	A	C	T	A	C	C	C	C	A	T	C	A	A	G	A	T	T	G	T	G	C	
AMAZ 1515	C	A	C	G	A	C	NA	T	C	A	T	C	A	A	G	A	T	H	G	C	G	C	
CA-14	C	H	H	H	H	C	NA	H	C	H	T	H	C	A	G	A	H	H	G	H	H	H	
CAB-0022	T	A	G	G	G	C	NA	C	C	A	T	C	A	A	G	H	T	G	G	C	G	T	
CAB-0266	C	A	H	G	H	C	NA	C	H	A	T	C	A	A	G	A	T	T	G	H	G	C	
CCN 10	H	H	H	G	H	C	NA	C	H	H	T	C	C	H	A	A	H	T	G	H	G	H	
CCN 51	H	H	G	G	G	C	NA	H	C	A	T	C	A	H	H	A	H	T	G	H	G	H	
COMUM	T	A	G	G	G	C	NA	T	H	A	T	C	A	A	G	H	H	G	G	H	G	T	
GU-296H	C	A	G	G	G	C	NA	C	C	A	T	C	A	A	G	G	T	G	G	T	G	C	
HUALLAGA-7	C	A	C	T	G	C	NA	C	C	A	T	C	C	A	G	A	T	T	G	C	G	C	
HUALLAGA-9	H	A	C	G	A	C	NA	H	C	A	T	C	A	A	G	A	H	T	G	H	G	C	
IAC-1	C	H	C	T	A	H	NA	H	H	H	T	H	C	H	H	A	H	H	G	T	H	T	
IP 38	H	A	H	H	H	C	NA	H	H	H	T	H	C	A	G	A	H	H	G	T	H	H	
LCTEEN-1621010	C	A	G	G	G	H	NA	C	C	A	T	C	A	A	G	A	H	T	G	C	G	H	
LCTEEN-37 A	C	H	C	G	A	C	NA	C	C	H	T	H	C	A	H	A	T	T	G	T	H	T	
LCTEEN-37G	C	H	C	G	A	C	NA	C	C	A	T	H	C	A	H	A	T	T	G	T	H	C	
MOQ 4.25	C	H	H	H	H	C	NA	H	C	A	H	C	A	A	G	A	H	H	H	H	G	H	
PAIN 9.316	T	A	H	H	H	C	NA	H	H	A	T	C	A	A	G	A	H	G	G	H	G	H	

Fig.20A

PAQUETA 01	H	H	H	H	H	C	NA	C	H	H	T	H	C	A	G	A	T	T	G	T	H	T
PH 123	C	A	H	H	H	H	NA	H	C	H	T	H	C	A	G	A	T	T	G	H	H	H
PH 9	H	A	H	H	H	H	NA	C	H	A	T	H	C	A	G	A	A	G	G	T	H	T
RB 39	C	A	C	H	A	C	NA	C	C	H	T	C	A	A	G	A	T	T	G	T	G	C
ROSA MARIA	H	A	C	T	A	C	NA	C	H	H	T	H	C	A	G	A	H	T	H	T	H	C
S.THIAGO	T	A	H	H	H	C	NA	H	H	A	T	C	A	A	G	A	H	G	G	H	G	T
SC-1	H	H	H	H	H	H	NA	H	H	A	T	C	C	H	H	A	H	H	G	H	G	T
SJ-02	C	A	C	H	A	C	NA	C	C	H	T	H	C	A	G	A	T	H	G	T	H	H
UF-667	H	H	H	H	H	H	C	H	H	A	T	C	C	H	H	A	H	H	G	H	G	T
VB-1151	C	A	G	G	G	C	NA	H	H	H	T	C	C	A	G	A	H	G	G	T	G	H
VB-1156	H	A	H	H	H	C	NA	H	H	H	T	H	C	A	G	A	H	H	G	T	H	H
VB-276	H	H	C	T	A	H	NA	H	C	H	T	C	C	H	H	A	H	T	G	C	G	H
VB-515	H	A	C	H	A	C	NA	H	C	A	T	H	A	A	G	A	H	T	G	T	H	H
AMAZ 6.3	C	A	NA	G	A	C	NA	H	C	A	T	C	C	A	G	NA	H	T	G	C	G	C
SUBCANUM	C	NA	NA	G	A	NA	NA	T	C	A	T	C	A	NA	NA	A	T	NA	NA	NA	NA	NA
MCSG 17	C	NA	NA	G	A	T	NA	T	C	A	T	C	A	NA	NA	A	T	NA	NA	T	NA	NA
MCSG 122	C	NA	NA	G	A	T	NA	T	C	A	T	C	A	NA	NA	A	T	NA	NA	T	NA	NA
MCSG 174	C	NA	NA	G	A	T	NA	T	C	A	T	C	A	NA	NA	A	T	NA	NA	T	NA	NA
MCSG 134	C	NA	NA	G	A	T	NA	T	C	A	T	C	A	NA	NA	A	T	NA	NA	T	NA	NA
MCSG 74	C	NA	NA	G	A	T	NA	T	C	A	T	C	A	NA	NA	A	T	NA	NA	T	NA	NA
MCSG 148	C	NA	NA	G	A	T	NA	T	C	A	T	C	A	NA	NA	A	T	NA	NA	T	NA	NA
MCSG 36	C	NA	NA	G	A	T	NA	T	C	A	T	C	A	NA	NA	A	T	NA	NA	T	NA	NA
MCSG 42	C	NA	NA	G	A	T	NA	T	C	A	T	C	A	NA	NA	A	T	NA	NA	T	NA	NA
MCSG 101	C	NA	NA	G	A	T	NA	T	C	A	T	C	A	NA	NA	A	T	NA	NA	T	NA	NA
MCSG 30	C	NA	NA	G	A	T	NA	T	C	A	T	C	A	NA	NA	A	T	NA	NA	T	NA	NA
MCSG 46	C	NA	NA	G	A	T	NA	T	C	A	T	C	A	NA	NA	A	T	NA	NA	T	NA	NA
MCSG 69	C	NA	NA	G	A	T	NA	T	C	A	T	C	A	NA	NA	A	T	NA	NA	T	NA	NA
MCSG 89	C	NA	NA	G	A	T	NA	T	C	A	T	C	A	NA	NA	A	T	NA	NA	T	NA	NA
MCSG 95	C	NA	NA	G	A	T	NA	T	C	A	T	C	A	NA	NA	A	T	NA	NA	T	NA	NA
MCSG 11	C	NA	NA	G	A	T	NA	T	C	A	T	C	A	NA	NA	A	T	NA	NA	T	NA	NA
MCSG 139	C	NA	NA	G	A	T	NA	T	C	A	T	C	A	NA	NA	A	T	NA	NA	T	NA	NA
MCSG 150	C	NA	NA	G	A	T	NA	T	C	A	T	C	A	NA	NA	A	T	NA	NA	T	NA	NA
MCSG 173	C	NA	NA	G	A	T	NA	T	C	A	T	C	A	NA	NA	A	T	NA	NA	T	NA	NA
MCSG 2	C	NA	NA	G	A	T	NA	T	C	A	T	C	A	NA	NA	A	T	NA	NA	T	NA	NA
MCSG 28	C	NA	NA	G	A	T	NA	T	C	A	T	C	A	NA	NA	A	T	NA	NA	T	NA	NA
MCSG 3	C	NA	NA	G	A	T	NA	T	C	A	T	C	A	NA	NA	A	T	NA	NA	T	NA	NA
MCSG 37	C	NA	NA	G	A	T	NA	T	C	A	T	C	A	NA	NA	A	T	NA	NA	T	NA	NA
MCSG 41	C	NA	NA	G	A	T	NA	T	C	A	T	C	A	NA	NA	A	T	NA	NA	T	NA	NA
MCSG 47	C	NA	NA	G	A	T	NA	T	C	A	T	C	A	NA	NA	A	T	NA	NA	T	NA	NA
MCSG 98	C	NA	NA	G	A	T	NA	T	C	A	T	C	A	NA	NA	A	T	NA	NA	T	NA	NA
MCSG 35	C	NA	NA	G	A	T	NA	T	C	A	T	C	A	NA	NA	A	T	NA	NA	T	NA	NA

Fig.20B

Mã	Thực vật lai		w17s189 (T/C)	w3s41 (G/T)	w3s558 (A/G)	e0050s274 (C/T)	w11_867 (T/C)	w6s131 (T/C) Sonda 119	w6s131 (T/C) Sonda 131	c3s595 (C/A)	CIR160s384 (G/A)	CIR211s1036 (T/A)	w8s204/w8s288 (T/C)
01	ALMC-3	MSCG-69	H/C	T/G	A/A	C/T	C/T	H/C	H/C	C/A	A/A	T/T	T/T
02	ALMC-5	MCSG-42	H/C	H/G	A/A	C/T	H/T	T/C	C/C	H/A	A/A	H/T	T/T
03	AMAZ-12/4	MCSG-101	C/C	H/G	H/A	C/T	C/C	C/C	C/C	A/A	A/A	H/T	C/T
04	AMAZ-6.3	MCSG-41	C/C	G/G	A/A	C/T	H/T	C/C	C/C	C/A	NA/A	H/T	C/T
06	CAB-0022	MCSG-28	T/C	G/G	G/A	C/T	C/T	C/C	C/C	A/A	H/A	T/T	C/T
07	CAB-0266	MCSG-98	C/C	G/G	H/A	C/T	C/T	H/C	C/C	A/A	A/A	T/T	H/T
09	COMUM	MCSG-2	T/C	G/G	G/A	C/T	T/T	H/A	C/C	A/A	H/A	H/T	H/T
10	CCN-10	MCSG-3	H/C	G/G	H/A	C/T	C/T	H/C	C/C	C/A	A/A	H/T	H/T
11	CCN-51	MCSG-41	H/C	G/G	G/A	C/T	H/T	C/C	C/C	A/A	A/A	H/T	H/T
12	COCA-3370/5	MCSG-37	C/C	G/G	G/A	H/T	C/T	C/C	C/C	A/A	A/A	H/T	C/T
14	EET-400	MCSG-42	T/C	G/G	G/A	C/T	C/T	C/C	C/C	C/A	A/A	H/T	H/T
15	NA-45	MCSG-36	T/C	G/G	H/A	C/T	C/T	C/C	C/C	A/A	A/A	A/T	C/T
16	FADA-100	MCSG-122	C/C	H/G	H/A	C/T	C/T	H/C	H/C	C/A	A/A	T/T	T/T
17	GU-114	MCSG-42	C/C	G/G	G/A	C/T	C/T	C/C	C/C	A/A	G/A	T/T	T/T
18	GU-296H	MCSG-101	C/C	G/G	G/A	C/T	C/T	C/C	C/C	A/A	G/A	T/T	T/T
19	HUALLAGA-7	MCSG-101	H/C	G/G	A/A	C/T	H/T	C/C	C/C	A/A	A/A	H/T	H/T
20	HUALLAGA-9	MCSG-46	H/C	G/G	A/A	C/T	H/T	C/C	C/C	A/A	A/A	H/T	H/T
21	IAC-1	MCSG-37	C/C	T/G	A/A	H/T	H/T	H/C	H/C	C/A	A/A	H/T	T/T
22	ICS-39	MCSG-69	H/C	H/G	H/A	H/T	H/T	H/C	C/C	C/A	A/A	H/T	H/T
23	ICS-40	MCSG-89	H/C	H/G	H/A	H/T	H/T	H/C	C/C	C/A	A/A	H/T	H/T
24	IP-268	MCSG-41	H/C	H/G	H/A	C/T	H/T	H/C	H/C	C/A	A/A	H/T	T/T
25	IP-38	MCSG-41	H/C	H/G	H/A	C/T	H/T	H/C	H/C	C/A	A/A	H/T	T/T
26	CTEEN-162101	MCSG-41	C/C	G/G	G/A	H/T	C/T	C/C	C/C	A/A	A/A	H/T	C/T
27	LCTEEN-37A	MCSG-46	C/C	G/G	A/A	C/T	C/T	C/C	H/C	C/A	A/A	T/T	T/T
28	LCTEEN-37F	MCSG-89	C/C	H/G	A/A	C/T	C/T	C/C	T/C	C/A	A/A	T/T	H/T
29	LCTEEN-37G	MCSG-3	C/C	G/G	A/A	C/T	C/T	C/C	H/C	C/A	A/A	T/T	T/T
30	NA-168	MCSG-89	H/C	G/G	A/A	C/T	C/T	C/C	C/C	A/A	A/A	T/T	C/T
31	NA-45	MCSG-122	T/C	G/G	H/A	C/T	C/T	C/C	C/C	A/A	A/A	A/T	C/T
32	NO-34	MCSG-89	H/C	T/G	A/A	H/T	C/T	H/C	H/C	C/A	A/A	T/T	T/T
33	P-10B	MCSG-122	T/C	G/G	G/A	C/T	C/T	C/C	C/C	C/A	A/A	H/T	H/T
34	P-7B	MCSG-69	H/C	G/G	H/A	C/T	C/T	C/C	C/C	A/A	A/A	H/T	C/T
35	PAQUETA-01	MCSG-98	H/C	H/G	H/A	C/T	C/T	H/C	H/C	C/A	A/A	T/T	T/T
36	PH-123	MCSG-41	C/C	H/G	H/A	H/T	H/T	C/C	H/C	C/A	A/A	T/T	H/T
37	PH-85	MCSG-148	T/C	H/G	H/A	C/T	T/T	H/C	C/C	C/A	A/A	H/T	H/T
38	RB-37	MCSG-74	C/C	T/G	A/A	C/T	C/T	C/C	C/C	A/A	A/A	T/T	T/T

Fig.21A

39	RB-39	MCSG-46	C/C	H/G	A/A	C/T	C/T	C/C	C/C	A/A	A/A	T/T	T/T
40	ROSA MARIA	MCSG-11	H/C	T/G	A/A	C/T	C/T	H/C	H/C	C/A	A/A	H/T	T/T
41	SC-1	MCSG-69	H/C	H/G	H/A	H/T	H/T	H/C	C/C	C/A	A/A	H/T	H/T
42	SJ-02	MCSG-122	C/C	H/G	A/A	C/T	C/T	C/C	H/C	C/A	A/A	T/T	T/T
43	UF-667	MCSG-95	***C	***G	***A	***T	H/T	H/C	***C	C/A	A/A	H/T	H/T
44	UF-677	MCSG-95	H/C	H/G	H/A	H/T	H/T	H/C	C/C	C/A	A/A	H/T	H/T
45	VB-1151	MCSG-150	C/C	G/G	G/A	C/T	H/T	H/C	C/C	C/A	A/A	H/T	T/T
46	VB-1156	MCSG-2	H/C	H/G	H/A	C/T	H/T	H/C	H/C	C/A	A/A	H/T	T/T
47	VB-276	MCSG-2	H/C	T/G	A/A	H/T	H/T	C/C	C/C	C/A	A/A	H/T	C/T
48	VB-515	MCSG-46	H/C	H/G	A/A	C/T	H/T	C/C	H/C	A/A	A/A	H/T	T/T
49	CCN-10	MCSG-41	H/C	G/G	H/A	C/T	C/T	H/C	C/C	C/A	A/A	H/T	H/T
50	ALMC-5	MCSG-30	H/C	H/G	A/A	C/T	H/T	T/C	C/C	H/A	A/A	H/T	T/T
51	UF-677	MCSG-134	H/C	H/G	H/A	H/T	H/T	H/C	C/C	C/A	A/A	H/T	H/T
52	NA-168	MCSG-36	H/C	G/G	A/A	C/T	C/T	C/C	C/C	A/A	A/A	T/T	C/T
53	COCA-3370/5	MCSG-139	C/C	G/G	G/A	H/T	C/T	C/C	C/C	A/A	A/A	H/T	C/T
54	IP-268	MCSG-95	H/C	H/G	H/A	C/T	H/T	H/C	H/C	C/A	A/A	H/T	T/T
55	GU-114	MCSG-174	C/C	G/G	G/A	C/T	C/T	C/C	C/C	A/A	G/A	T/T	T/T
56	ALMC-3	MCSG-35	H/C	T/G	A/A	C/T	C/T	H/C	H/C	C/A	A/A	T/T	T/T
57	LCTENN-37/G	MCSG-173	C/C	G/G	A/A	C/T	C/T	C/C	H/C	C/A	A/A	T/T	T/T
58	CTEEN-162101	MCSG-47	C/C	G/G	G/A	H/T	C/T	C/C	C/C	A/A	A/A	H/T	C/T
59	NA-45	MCSG-46	T/C	G/G	H/A	C/T	C/T	C/C	C/C	A/A	A/A	A/T	C/T
60	EET-400	MCSG-46	T/C	G/G	G/A	C/T	C/T	C/C	C/C	C/A	A/A	H/T	H/T
61	ALMC-5	MCSG-46	H/C	H/G	A/A	C/T	H/T	T/C	C/C	H/A	A/A	H/T	T/T
62	NA-168	MCSG-122	H/C	G/G	A/A	C/T	C/T	C/C	C/C	A/A	A/A	T/T	C/T
63	MOQ-4.25	MCSG-46	C/C	H/G	H/A	C/T	H/T	C/C	C/C	A/A	A/A	H/T	H/T
64	LCT-37A	MCSG-122	C/C	G/G	A/A	C/T	C/T	C/C	H/C	C/A	A/A	T/T	T/T
65	ALMC-5	MCSG-122	H/C	H/G	A/A	C/T	H/T	T/C	C/C	H/A	A/A	H/T	T/T
66	AMAZ-1515	MCSG-122	C/C	G/G	A/A	C/T	T/T	C/C	C/C	A/A	A/A	T/T	C/T
67	P-7B	MCSG-122	H/C	G/G	H/A	C/T	C/T	C/C	C/C	A/A	A/A	H/T	C/T
69	ROSA MARIA	MCSG-46	H/C	T/G	A/A	C/T	C/T	H/C	H/C	C/A	A/A	H/T	T/T
70	AMAZ-1515	MCSG-46	C/C	G/G	A/A	C/T	T/T	C/C	C/C	A/A	A/A	T/T	C/T
71	NA-45	SUBCANUM	T/C	G/G	H/A	C/NA	C/T	C/C	C/C	A/A	A/A	A/T	C/NA
72	PAIN - 9.316	MCSG-46	T/C	H/G	H/A	C/T	H/T	H/C	C/C	A/A	A/A	H/T	H/T
74	ICS 40	MCSG 46	H/C	H/G	H/A	H/T	H/T	H/C	C/C	C/A	A/A	H/T	H/T
75	EET-400	MCGS 122	T/C	G/G	G/A	C/T	C/T	C/C	C/C	C/A	A/A	H/T	H/T
76	ICS 40	MCGS 122	H/C	H/G	H/A	H/T	H/T	H/C	C/C	C/A	A/A	H/T	H/T
77	P 10B	MCGS 46	T/C	G/G	G/A	C/T	C/T	C/C	C/C	C/A	A/A	H/T	H/T
78	CCN-51	MCGS 46	H/C	G/G	G/A	C/T	H/T	C/C	C/C	A/A	A/A	H/T	H/T
79	PH-9	MCGS 46	H/C	H/G	H/A	H/T	C/T	H/C	H/C	C/A	A/A	A/T	T/T
80	CA-1.4	MCGS 46	C/C	H/G	H/A	C/T	H/T	C/C	H/C	C/A	A/A	H/T	H/T
81	S. THIAGO	MCGS 47	T/C	H/G	H/A	C/T	H/T	H/C	C/C	A/A	A/A	H/T	H/T

Fig.21B

Thực vật lai	Thực vật cha mẹ		w17s189 (T/C)	e0050s274(C/T)	CIR211s1036 (T/A)	w11_867 (T/C)	w8s204/w8s288 (T/C)	c3s595 (C/A)	w3s41 (G/T)	w8s131 (T/C) Sonda 119	w3s558 (A/G)
	Thực vật mẹ	Thực vật cha									
15	NA-45	MCSG-36	T/C	C/T	A/T	C/T	C/T	A/A	G/G	C/C	H/A
22	ICS-39	MCSG-69	H/C	H/T	H/T	H/T	H/T	C/A	H/G	H/C	H/A
23	ICS-40	MCSG-89	H/C	H/T	H/T	H/T	H/T	C/A	H/G	H/C	H/A
30	NA-168	MCSG-89	H/C	C/T	T/T	C/T	C/T	A/A	G/G	C/C	A/A
31	NA-45	MCSG-122	T/C	C/T	A/T	C/T	C/T	A/A	G/G	C/C	H/A
32	NO-34	MCSG-89	H/C	H/T	T/T	C/T	T/T	C/A	T/G	H/C	A/A
33	P-10B	MCSG-122	T/C	C/T	H/T	C/T	H/T	C/A	G/G	C/C	G/A
34	P-7B	MCSG-69	H/C	C/T	H/T	C/T	C/T	A/A	G/G	C/C	H/A
37	PH-85	MCSG-148	T/C	C/T	H/T	T/T	H/T	C/A	H/G	H/C	H/A
59	NA-45	MCSG-46	T/C	C/T	A/T	C/T	C/T	A/A	G/G	C/C	H/A
65	ALMC-5	MCSG-122	H/C	C/T	H/T	H/T	T/T	H/A	H/G	T/C	A/A
67	P-7B	MCSG-122	H/C	C/T	H/T	C/T	C/T	A/A	G/G	C/C	H/A

Fig.22

NA45 x MCCS122 - Axít palmitic

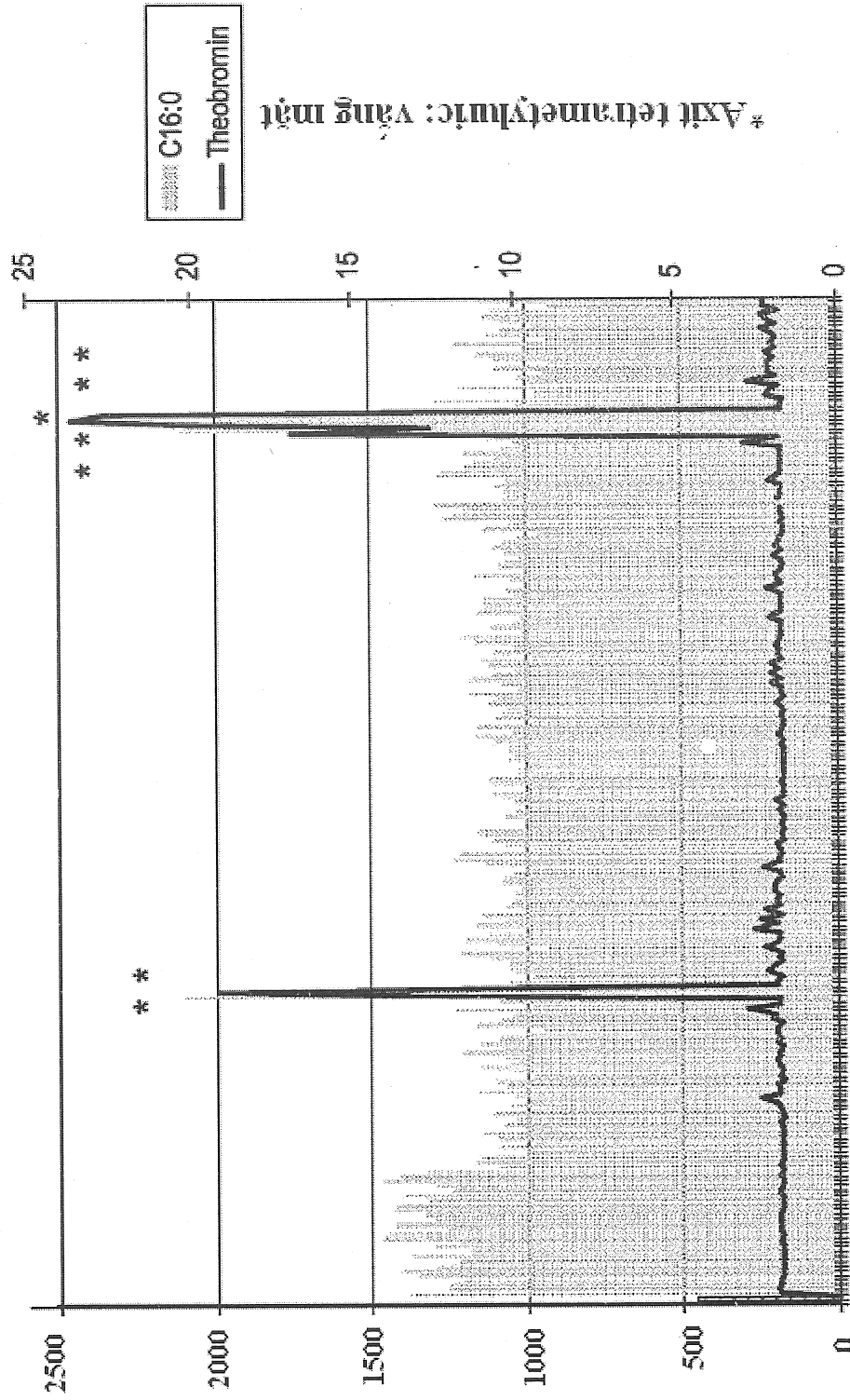


Fig.23

Hàm lượng axit palmitic và theobromin trong thực vật lai chéo Tg x Tc

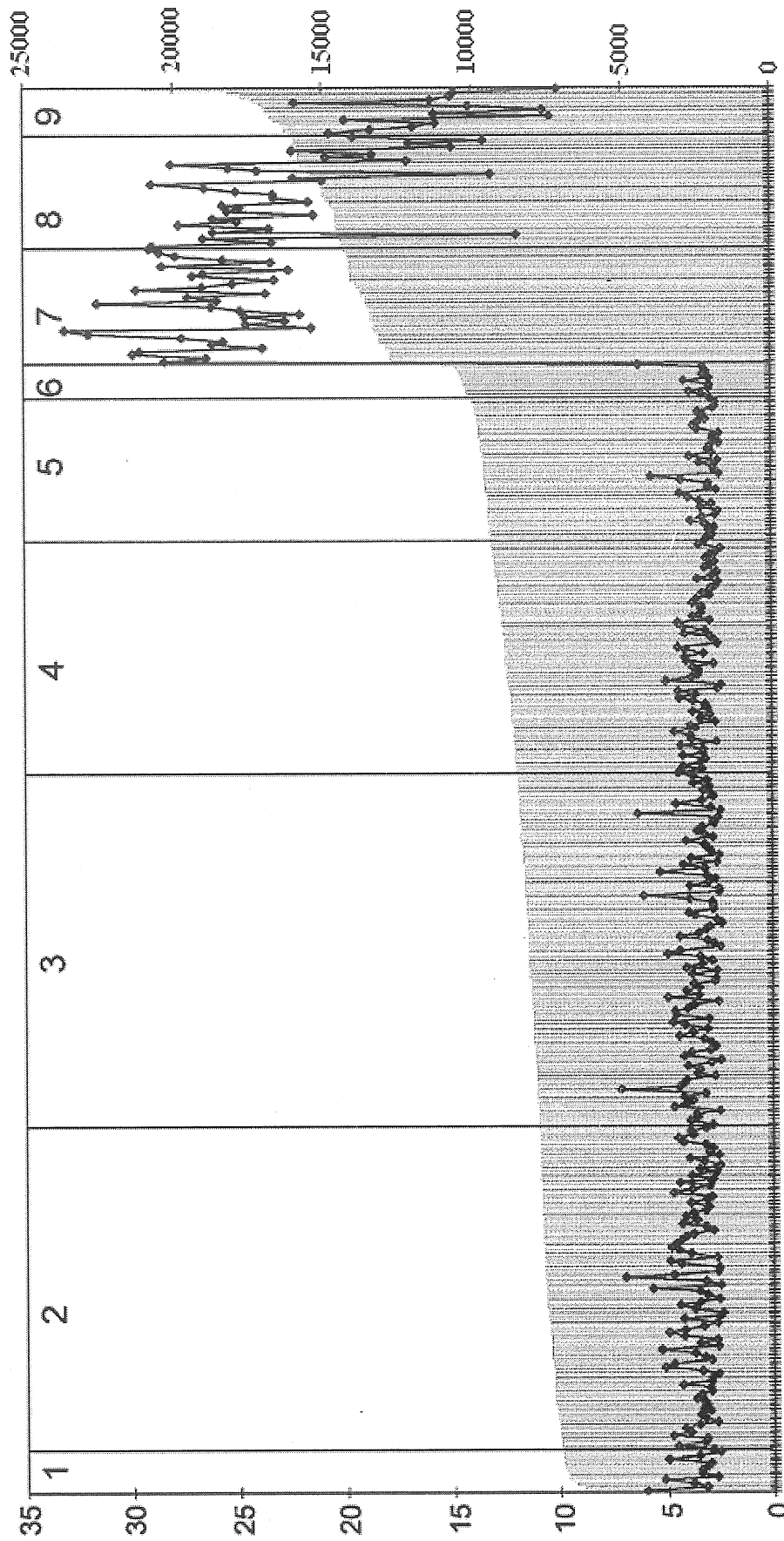


Fig.24

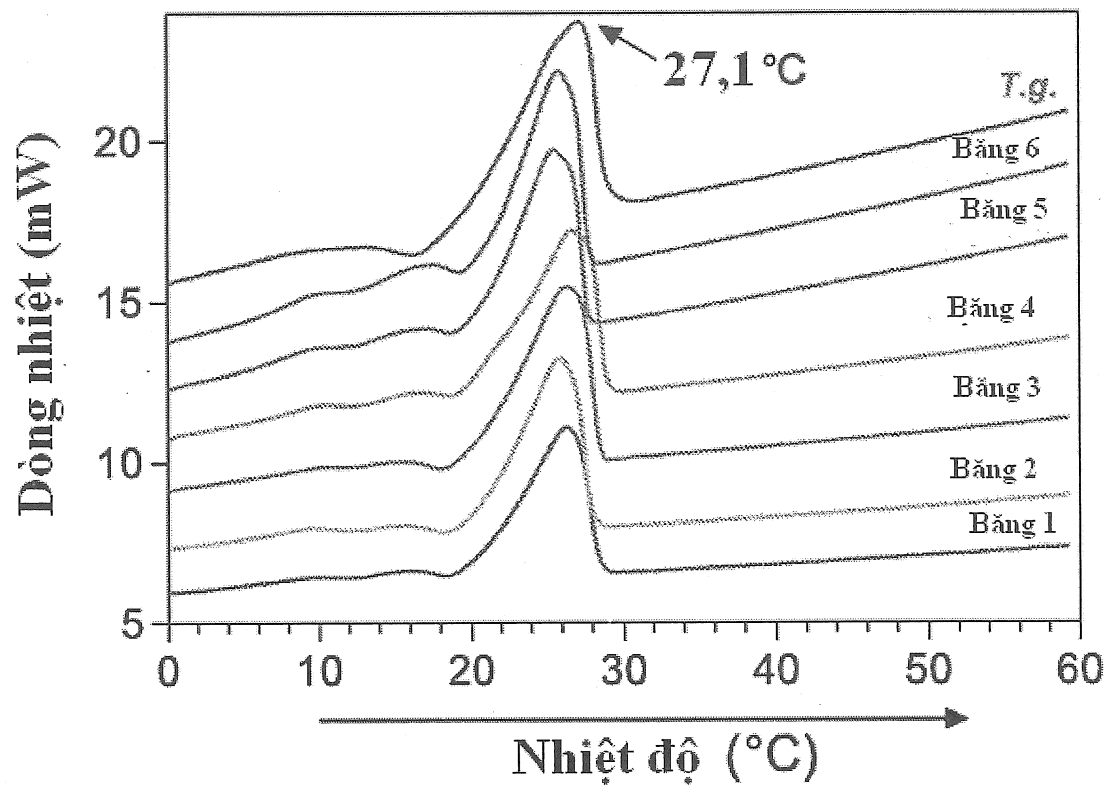


Fig.25A

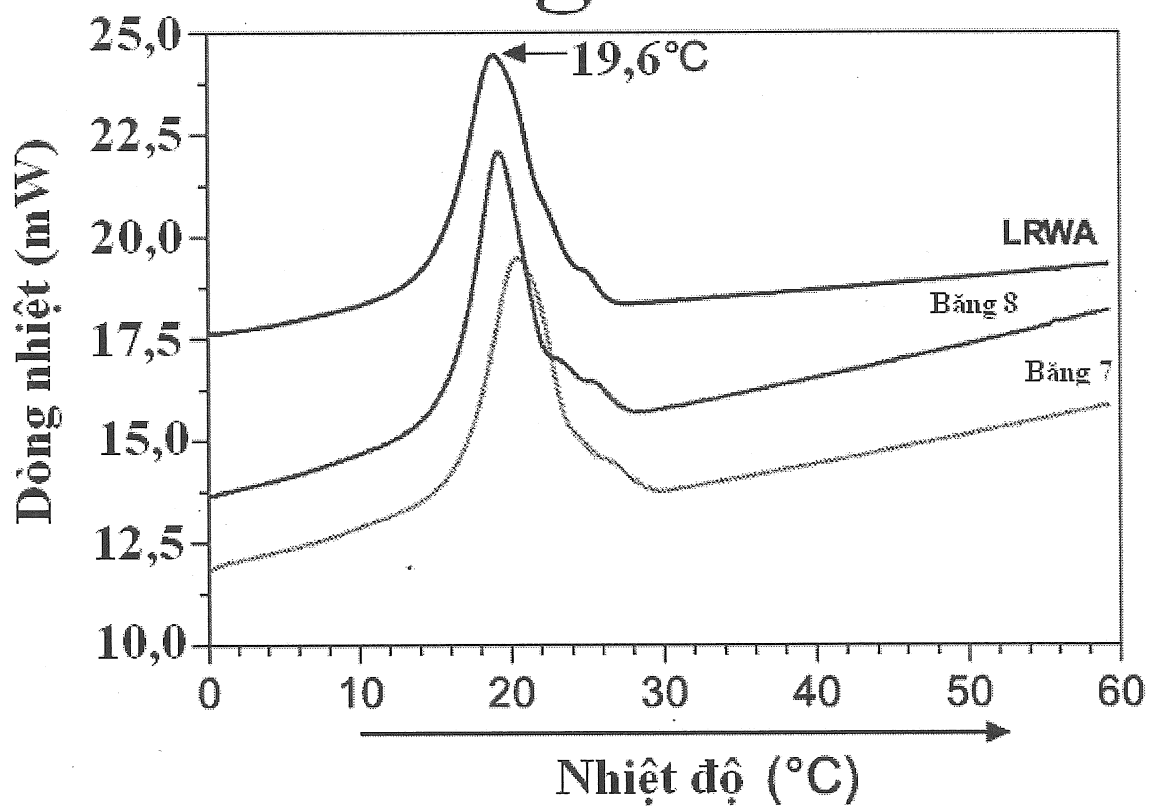
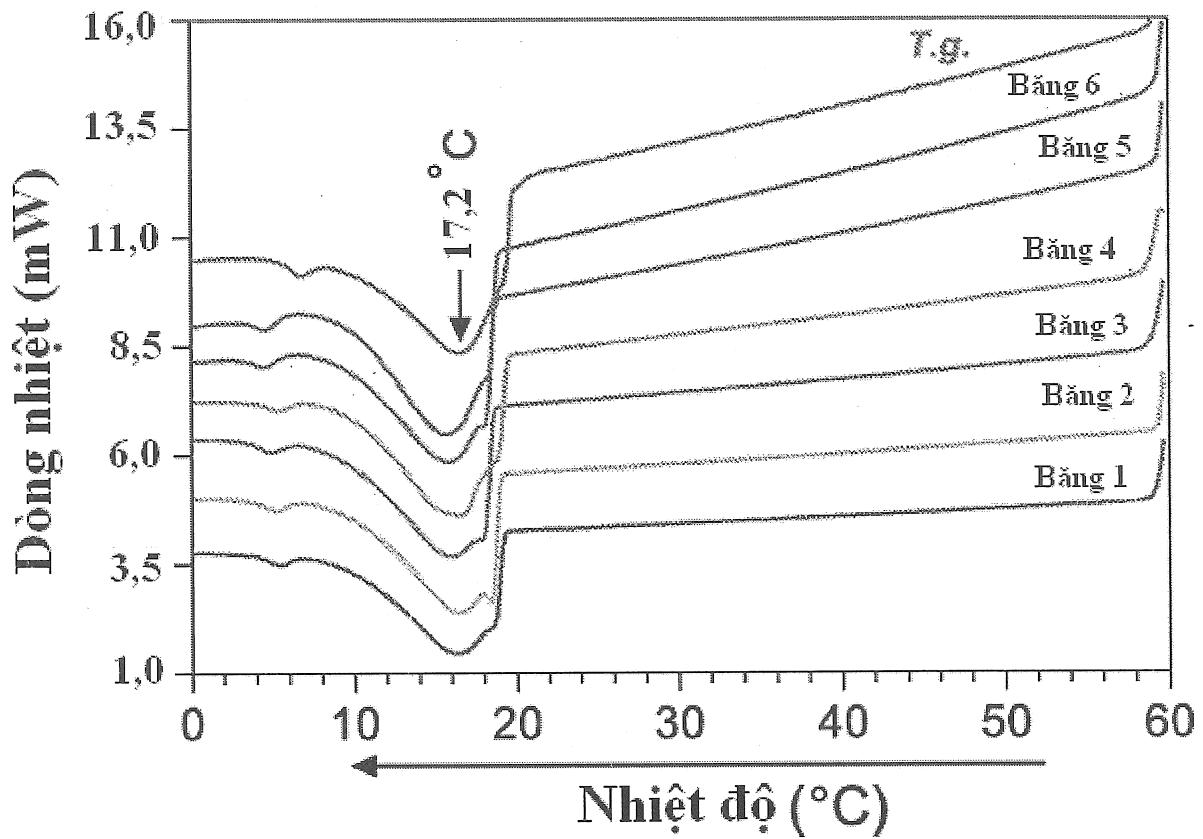
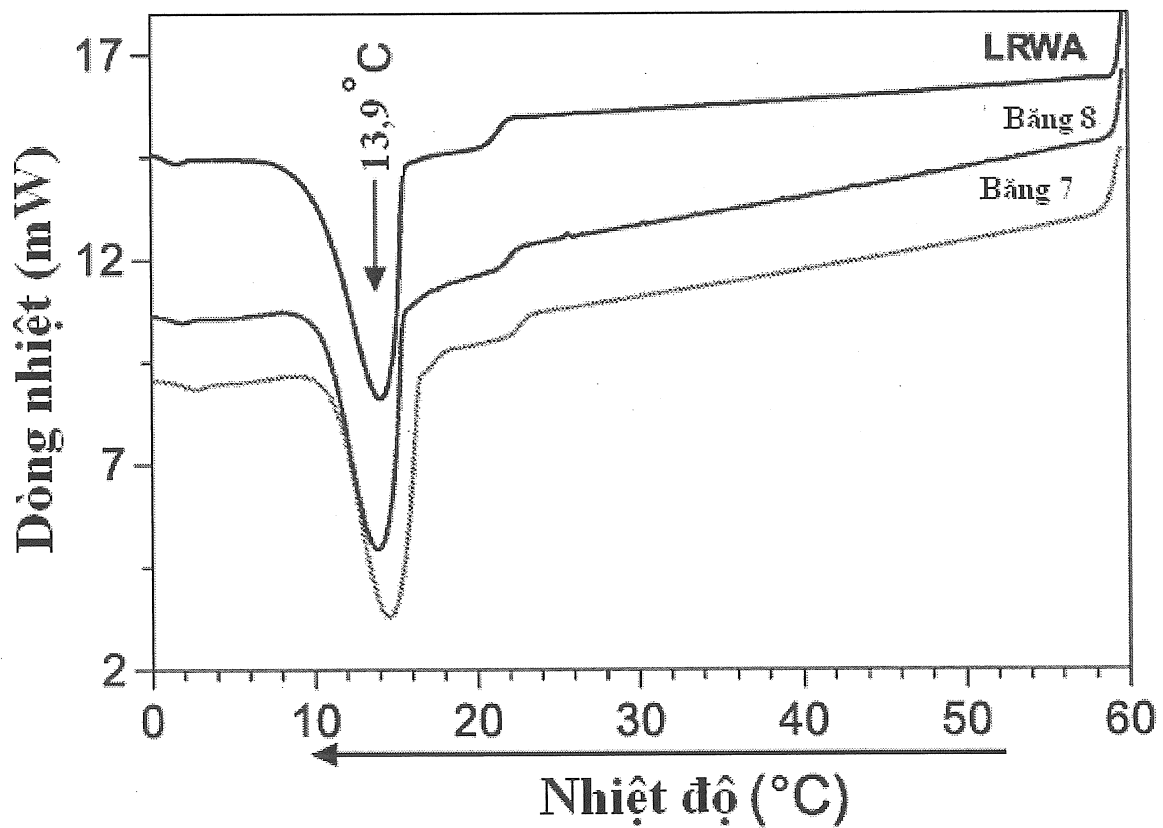
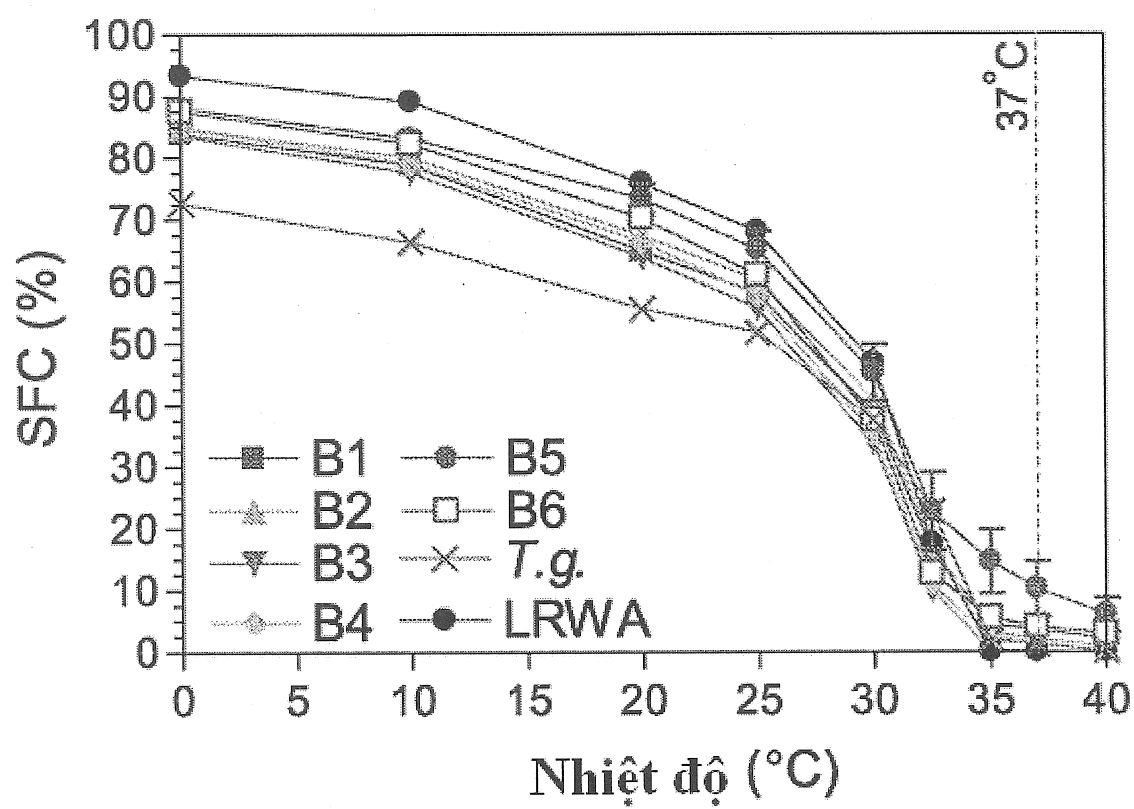


Fig.25B

**Fig.26A****Fig.26B**

**Fig.27**

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> MARS, INCORPORATED

<120> Phương pháp sản xuất thực vật lai hoặc hạt giống lai của
Theobroma cacao và Theobroma grandiflorum

<130> 029196.00040

<140>

<141>

<150> 62/101,917

<151> 2015-01-09

<160> 36

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 29

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 1

tgattacact gttacaccaa ctttagacg

29

<210> 2

<211> 26

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 2

acgtgtaaag aaaggaggaa aacttt

26

<210> 3

<211> 15

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 3

tcttgctgag atatc

15

<210> 4

<211> 16

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 4 tctcttgccg agatat	16
<210> 5 <211> 24 <212> ADN <213> Trình tự nhân tạo	
<220> <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp	
<400> 5 ctcaggttcc aaccattgat ttaa	24
<210> 6 <211> 21 <212> ADN <213> Trình tự nhân tạo	
<220> <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp	
<400> 6 ccgagatccc atggttaaca a	21
<210> 7 <211> 15 <212> ADN <213> Trình tự nhân tạo	
<220> <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp	
<400> 7 aagctgccac ggagt	15
<210> 8 <211> 15 <212> ADN <213> Trình tự nhân tạo	
<220> <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp	
<400> 8 aagctgccat ggagt	15
<210> 9 <211> 26 <212> ADN <213> Trình tự nhân tạo	
<220> <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp	

<400> 9	
aacttgctcag ctgtctctct ttcttg	26
<210> 10	
<211> 22	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp	
<400> 10	
cagaactgtg catgcttgaa gc	22
<210> 11	
<211> 20	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp	
<400> 11	
ctaaatgaat catccaaaga	20
<210> 12	
<211> 18	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp	
<400> 12	
aatgaatca cccaaaga	18
<210> 13	
<211> 22	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp	
<400> 13	
aaaggcaatc cttacccaag gt	22
<210> 14	
<211> 28	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp	
<400> 14	

aagaatgaac cactttgcag tagatagt

28

<210> 15
 <211> 14
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 15
 atgcccctgg ttgt

14

<210> 16
 <211> 14
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 16
 atgcccctgt ttgt

14

<210> 17
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 17
 gttgttggttc tgttcaattc gtatga

26

<210> 18
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 18
 atcaggaatg ctccaaaata atcaa

25

<210> 19
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 19
 tgactacctt ttatgtgatc t

21

<210> 20
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 20
 tgactgcctt ttatgtgat

19

<210> 21
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 21
 gccctgtcaa aaagaaggta ctg

23

<210> 22
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 22
 ttactgttgc tttccatttt ctaagtg

27

<210> 23
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 23
 ttctgaggta tcattccca

19

<210> 24
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 24
 ttctgaggca tcattcc

17

<210> 25
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

 <400> 25
 cacttagaaa atggaaagca acagt 25

 <210> 26
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

 <400> 26
 acctagagcc agatgatgaa ttgtatt 27

 <210> 27
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

 <400> 27
 ttcctgagac ttgtacttga 20

 <210> 28
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

 <400> 28
 ttcccagagac ttgtactt 18

 <210> 29
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

 <400> 29
 tgctggtggc aagaagtatt atattag 27

<210> 30
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 30
 cagatcctca ttcaatacct gtatcaa

27

<210> 31
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 31
 ctctgcatca ttggt

15

<210> 32
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 32
 ctctgcctca ttggt

15

<210> 33
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 33
 accttaattt tatgggaaac gaggt

25

<210> 34
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 34
 ccaaacaaaa tcttaatgca ctgtg

25

<210> 35
<211> 17
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 35
aatctgtgct gactgat

17

<210> 36
<211> 16
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 36
caatcagtgc tgactg

16