



(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) 
1-0020651

(51)⁷ **A01G 7/00, G01N 27/62**

(13) **B**

(21)	1-2012-00553	(22)	26.05.2010		
(86)	PCT/JP2010/058868	26.05.2010	(87)	WO2011/024525	03.03.2011
(30)	2009-200839	31.08.2009	JP		
(45)	25.03.2019	372	(43)	25.09.2012	294
(73)	Oji Holdings Corporation (JP) 7-5, Ginza 4-chome, Chuo-ku, Tokyo 1040061, Japan				
(72)	SASAKI Shinya (JP), SATO Shigeru (JP)				
(74)	Công ty TNHH Tâm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)				

(54) **PHƯƠNG PHÁP CHỌN LỌC CHỈ THỊ DÙNG ĐỂ CHẨN ĐOÁN TÌNH TRẠNG DINH DƯỠNG CỦA CÂY, PHƯƠNG PHÁP CHẨN ĐOÁN TÌNH TRẠNG DINH DƯỠNG VÀ PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH TÌNH TRẠNG SINH TRƯỞNG CỦA CÂY**

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp chọn lọc chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng có khả năng phản ánh tình trạng của chất dinh dưỡng cụ thể ở cây mà không bị ảnh hưởng bởi các áp lực khác trong các yếu tố môi trường, v.v., và phương pháp chẩn đoán tình trạng của chất dinh dưỡng cụ thể ở cây bằng cách sử dụng chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng được chọn lọc bằng phương pháp này. Sản phẩm chuyển hóa mà chỉ thay đổi về lượng theo lượng chất dinh dưỡng cụ thể ở cây được chọn lọc làm chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng phản ánh tình trạng của chất dinh dưỡng này ở cây.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp chọn lọc chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng của cây, phương pháp chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng của cây, phương pháp xác định tình trạng sinh trưởng, và chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng nitơ.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Trong ngành nông nghiệp và lâm nghiệp, việc cung cấp đủ chất dinh dưỡng với lượng thích hợp khi cần là rất quan trọng đối với sự sinh trưởng hiệu quả của cây đang quan tâm trong khoảng thời gian ngắn. Do đó, cần phải đánh giá chính xác tình trạng dinh dưỡng của cây và bón phân cho chúng một cách thích hợp theo các kết quả đánh giá này.

Cho đến nay, các phương pháp chủ quan vẫn được sử dụng, trong đó người trồng cây vẫn đánh giá tình trạng dinh dưỡng của cây dựa vào kinh nghiệm của họ, phán đoán và tự tiến hành bón phân dựa vào đánh giá của họ. Tuy nhiên, để làm được như vậy thì người trồng cây cần phải có kỹ năng canh tác một vài năm. Việc đánh giá cũng khác nhau một cách không thống nhất giữa những người trồng cây trong một số trường hợp. Vấn đề khác nữa của các phương pháp chủ quan là không thể đánh giá một cách khách quan là liệu cây có thực sự được cung cấp dinh dưỡng cần thiết cho chúng với lượng cần thiết hay không hoặc dinh dưỡng được cung cấp đóng góp bao nhiêu vào sự phát triển của cây.

Trong những năm gần đây, đã phát triển phương pháp bao gồm việc phân tích hàm lượng nguyên tố như hàm lượng nitơ, phospho và kali trong lá bằng phương pháp Kjeldahl hoặc phương pháp phân tích plasma liên hợp cảm ứng (inductively coupled plasma: ICP) và ước tính tình trạng dinh dưỡng của cây từ các giá trị số học để xác định loại và lượng phân bón (tài liệu phi patent 1). Phương pháp này dựa vào cách đánh giá khách quan và rất chặt chẽ về mặt lý thuyết. Tuy nhiên, trong các cây khác nhau thường có một sự khác biệt lớn về hàm lượng nguyên tố, và tùy thuộc vào, ví dụ,

sự khác biệt về vị trí hoặc môi trường sinh trưởng, tức là sự khác biệt về các áp lực của yếu tố môi trường mà cây bị ảnh hưởng, thậm chí ngay cả khi chúng được cung cấp cùng loại và cùng lượng phân bón. Do đó, phương pháp này chỉ có thể áp dụng được cho cây được canh tác trong cùng một môi trường, tức là trong cùng áp lực. Do đó, phương pháp này bị hạn chế áp dụng do không thuận lợi và ít có tính thực tiễn.

Đã biết phương pháp xác định mức phát triển của cây bằng cách sử dụng các đặc tính phản xạ quang phổ của lá cây (tài liệu patent 1). Phương pháp này bao gồm việc chuẩn bị cơ sở dữ liệu về phổ phản xạ của các cây khác nhau, và so sánh cơ sở dữ liệu này với dữ liệu chuẩn về hệ số phản xạ quang phổ của các cây thu được bằng kỹ thuật vệ tinh cảm biến từ xa có độ phân giải cao để nhờ đó xác định sức sống của cây. Tuy nhiên, phương pháp này cũng tạo ra các khác biệt về phổ phụ thuộc vào các lá khác nhau trên một cá thể hoặc sự khác biệt về ngày giờ và do đó chỉ có thể áp dụng được cho các cây được canh tác trong cùng điều kiện. Do đó, phương pháp này vẫn có nhược điểm như là ít có tính thực tiễn.

Do đó, không có phương pháp nào trong số các phương pháp đã biết trước đây cho phép đánh giá khách quan và chính xác tình trạng dinh dưỡng của cây mà không bị ảnh hưởng bởi các áp lực khác nhau.

Danh sách tài liệu trích dẫn:

Tài liệu patent

Tài liệu patent 1: Công bố đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản (Kokai) số 2007-166967 A (2007).

Tài liệu phi patent

Tài liệu phi patent 1: Soil, Water Quality, and Plant Analysis Methods for Monitoring Functions of Soil, Japan Soil Association.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật cần giải quyết

Mục đích của sáng chế là phát triển và đề xuất phương pháp chọn lọc chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng có khả năng phản ánh tình trạng của chất dinh dưỡng cụ thể ở cây mà không bị ảnh hưởng bởi các áp lực khác trong các yếu tố môi trường, v.v..

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất phương pháp chẩn đoán chính xác tình trạng của chất dinh dưỡng cụ thể ở cây mà không bị ảnh hưởng bởi các áp lực khác, bằng cách sử dụng chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng được chọn lọc bằng phương pháp nêu trên.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất phương pháp xác định tình trạng sinh trưởng của cây thử nghiệm và dự đoán sự sinh trưởng trong tương lai của nó bằng cách sử dụng chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng được chọn lọc bằng phương pháp nêu trên.

Giải pháp để giải quyết vấn đề kỹ thuật

Để đạt được các mục đích nêu trên, các tác giả sáng chế đã thực hiện các nghiên cứu nghiêm túc bằng cách tập trung vào các sản phẩm chuyển hóa mà mối quan hệ của chúng với tình trạng dinh dưỡng của cây chưa được biết đến từ trước đến nay. Kết quả là, các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng sản phẩm chuyển hóa mà chỉ thay đổi về lượng theo tình trạng của chất dinh dưỡng cụ thể ở cây đều có thể đóng vai trò làm chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng phản ánh tình trạng của chất dinh dưỡng cụ thể này ở cây mà không bị ảnh hưởng bởi các áp lực khác trong môi trường. Các tác giả sáng chế cũng bộc lộ rằng việc sử dụng chỉ thị này để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng cho phép chẩn đoán chính xác tình trạng của chất dinh dưỡng cụ thể ở cây thử nghiệm và xác định chính xác tình trạng sinh trưởng của nó.

Sáng chế dựa vào các phát hiện này và cụ thể là đề xuất các phương án sau đây:

(1) Phương pháp chọn lọc chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng của cây, trong đó phương pháp này bao gồm các bước: bước chiết bao gồm việc chiết chất chiết chứa sản phẩm chuyển hóa từ toàn bộ hoặc một phần của cây thiếu hụt chất dinh dưỡng cụ thể và cây được cung cấp chất dinh dưỡng này; và bước chọn lọc bao gồm việc so sánh giữa các cây này lượng tích lũy của mỗi sản phẩm chuyển hóa thu được ở bước chiết để chọn lọc sản phẩm chuyển hóa được xác nhận là có sự khác biệt về lượng có ý nghĩa về mặt thống kê giữa chúng làm chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng mà tình trạng của chất dinh dưỡng cụ thể được chẩn đoán bằng chỉ thị này.

(2) Phương pháp chọn lọc theo (1), trong đó tình trạng thiếu hụt chất dinh dưỡng cụ thể là tình trạng mà trong đó chất dinh dưỡng cụ thể này bị cạn kiệt.

(3) Phương pháp chọn lọc chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng của cây, trong đó phương pháp này bao gồm các bước: bước chiết thứ nhất bao gồm việc chiết chất chiết chứa sản phẩm chuyển hóa từ toàn bộ hoặc một phần của cây thiếu hụt chất dinh dưỡng cụ thể và cây được cung cấp chất dinh dưỡng này; bước chọn lọc thứ nhất bao gồm việc so sánh giữa các cây này lượng tích lũy của mỗi sản phẩm chuyển hóa thu được ở bước chiết thứ nhất để chọn lọc sản phẩm chuyển hóa được xác nhận là có sự khác biệt về lượng có ý nghĩa về mặt thống kê giữa chúng làm ứng viên chỉ thị thứ nhất; bước chiết thứ hai bao gồm việc chiết chất chiết chứa sản phẩm chuyển hóa từ toàn bộ hoặc một phần của cây được cung cấp chất dinh dưỡng cụ thể với lượng mà khác với lượng khiến cây bị thiếu hụt chất dinh dưỡng này ở bước chiết thứ nhất; bước chọn lọc thứ hai bao gồm việc so sánh lượng tích lũy của mỗi sản phẩm chuyển hóa giữa ít nhất một trong số các cây ở bước chiết thứ nhất và cây ở bước chiết thứ hai để chọn lọc sản phẩm chuyển hóa được xác nhận là có sự khác biệt về lượng có ý nghĩa về mặt thống kê giữa chúng làm ứng viên chỉ thị thứ hai; và bước chọn lọc thứ ba bao gồm việc chọn lọc sản phẩm chuyển hóa có chung trong cả nhóm ứng viên gồm các ứng viên chỉ thị thứ nhất và nhóm ứng viên gồm các ứng viên chỉ thị thứ hai làm chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng mà tình trạng của chất dinh dưỡng cụ thể được chẩn đoán bằng chỉ thị này.

(4) Phương pháp chọn lọc theo (3), trong đó tình trạng thiếu hụt chất dinh dưỡng cụ thể ở một trong số hai cây ở bước chiết thứ nhất là tình trạng mà trong đó chất dinh dưỡng cụ thể này bị cạn kiệt.

(5) Phương pháp chọn lọc theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (4), trong đó sự khác biệt về lượng có ý nghĩa về mặt thống kê là lớn hơn hoặc bằng 1,3 lần.

(6) Phương pháp chọn lọc theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (5), trong đó việc so sánh lượng tích lũy của mỗi sản phẩm chuyển hóa được thực hiện bằng cách sử dụng kỹ thuật khối phổ.

(7) Phương pháp chọn lọc theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (6), trong đó bước xử lý thống kê được thực hiện bằng cách sử dụng kiểm định so sánh nhiều nhóm.

(8) Phương pháp chọn lọc theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (7),

trong đó chất dinh dưỡng cụ thể là nitơ (N), phospho (P), kali (K), bo (B) hoặc tổ hợp của chúng.

(9) Phương pháp chọn lọc theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (8), trong đó sản phẩm chuyển hóa là protein và/hoặc hợp chất có phân tử lượng thấp.

(10) Chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng nitơ của cây, trong đó chỉ thị này là chỉ thị bất kỳ được nêu trong bảng 2.

(11) Chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng nitơ theo (10), trong đó cây là *Eucalyptus globulus*, và chỉ thị này được thể hiện bởi số khối bất kỳ trong số các số khối từ 1 đến 270 được nêu trong bảng 2.

(12) Chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng nitơ theo (10), trong đó cây là *Eucalyptus deglupta* x *camaldulensis*, và chỉ thị này được thể hiện bởi số khối bất kỳ trong số các số khối 15, 31, 41, 42, 43, 51, 57, 59, 68, 84, 91, 104, 110, 111, 148, 149, 156, 241, 263, 264 và 269 trong bảng 2.

(13) Chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng nitơ theo (10), trong đó cây là *Oryza sativa*, và chỉ thị này được thể hiện bởi số khối bất kỳ trong số các số khối 5, 170 và 173 trong bảng 2.

(14) Chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng nitơ theo (10), trong đó cây là *Zea mays*, và chỉ thị này được thể hiện bởi số khối bất kỳ trong số các số khối 7, 17, 22, 29, 30, 35, 37, 48, 60, 65, 72, 76, 77, 88, 89, 92, 106, 140, 142, 148, 153, 154, 242 và 257 trong bảng 2.

(15) Chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng nitơ theo (10), trong đó cây là *Solanum lycopersicum*, và chỉ thị này được thể hiện bởi số khối bất kỳ trong số các số khối 43, 246 và 265 trong bảng 2.

(16) Chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng nitơ theo (10), trong đó cây là *Solanum melongena*, và chỉ thị này được thể hiện bởi số khối bất kỳ trong số các số khối 104, 144, 242, 257 và 265 trong bảng 2.

(17) Phương pháp chẩn đoán tình trạng của chất dinh dưỡng cụ thể ở cây, trong đó phương pháp này bao gồm các bước: bước chiết sản phẩm chuyển hóa bao gồm việc chiết chất chiết chứa sản phẩm chuyển hóa từ toàn bộ hoặc một phần của cây thử nghiệm; và bước xác định bao gồm việc so sánh lượng tích lũy của chỉ thị dùng để

chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng chứa trong chất chiết thu được ở bước chiết sản phẩm chuyển hóa với lượng tích lũy ở cây đối chứng được cung cấp chất dinh dưỡng này để xác định tình trạng không đủ hoặc đủ của chất dinh dưỡng ở cây thử nghiệm dựa vào trạng thái và mức độ khác biệt giữa chúng, chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng này được chọn lọc bằng phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (9).

(18) Phương pháp theo (17), trong đó chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng có tính chất mà nhờ đó lượng tích lũy của nó tăng khi lượng chất dinh dưỡng cụ thể tăng, và chất dinh dưỡng ở cây thử nghiệm được xác định là có xu hướng không đủ nếu lượng tích lũy của chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng ở cây thử nghiệm nhỏ hơn lượng tích lũy ở cây đối chứng.

(19) Phương pháp theo (17), trong đó chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng có tính chất mà nhờ đó lượng tích lũy của nó giảm khi lượng chất dinh dưỡng cụ thể tăng, và chất dinh dưỡng ở cây thử nghiệm được xác định là có xu hướng không đủ nếu lượng tích lũy của chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng ở cây thử nghiệm lớn hơn lượng tích lũy ở cây đối chứng.

(20) Phương pháp chẩn đoán theo mục bất kỳ trong số các mục từ (17) đến (19), trong đó sản phẩm chuyển hóa là protein và/hoặc hợp chất có phân tử lượng thấp.

(21) Phương pháp chẩn đoán theo mục bất kỳ trong số các mục từ (17) đến (20), trong đó chất dinh dưỡng cụ thể là nitơ (N), phospho (P), kali (K), bo (B) hoặc tổ hợp của chúng.

(22) Phương pháp chẩn đoán theo (21), trong đó chất dinh dưỡng cụ thể là nitơ, và chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng của cây được nêu trong bảng 2.

(23) Phương pháp chẩn đoán theo (22), trong đó cây là *Eucalyptus globulus*, và chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng được thể hiện bởi số khối bất kỳ trong số các số khối từ 1 đến 270 được nêu trong bảng 2.

(24) Phương pháp chẩn đoán theo (22), trong đó cây là *Eucalyptus deglupta x camaldulensis*, và chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng được thể hiện bởi số khối bất kỳ trong số các số khối 15, 31, 41, 42, 43, 51, 57, 59, 68, 84, 91, 104, 110, 111, 148, 149, 156, 241, 263, 264 và 269 trong bảng 2.

(25) Phương pháp chẩn đoán theo (22), trong đó cây là *Oryza sativa*, và chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng được thể hiện bởi số khối bất kỳ trong số các số khối 5, 170 và 173 trong bảng 2.

(26) Phương pháp chẩn đoán theo (22), trong đó cây là *Zea mays*, và chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng được thể hiện bởi số khối bất kỳ trong số các số khối 7, 17, 22, 29, 30, 35, 37, 48, 60, 65, 72, 76, 77, 88, 89, 92, 106, 140, 148, 142, 153, 154, 242 và 257 trong bảng 2.

(27) Phương pháp chẩn đoán theo (22), trong đó cây là *Solanum lycopersicum*, và chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng được thể hiện bởi số khối bất kỳ trong số các số khối 43, 246 và 265 trong bảng 2.

(28) Phương pháp chẩn đoán theo (22), trong đó cây là *Solanum melongena*, và chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng được thể hiện bởi số khối bất kỳ trong số các số khối 104, 144, 242, 257 và 265 trong bảng 2.

(29) Phương pháp xác định lượng chất dinh dưỡng cụ thể được cung cấp, trong đó phương pháp này bao gồm việc xác định lượng chất dinh dưỡng cụ thể được cung cấp cho cây dựa vào kết quả chẩn đoán thu được bằng phương pháp chẩn đoán tình trạng của chất dinh dưỡng cụ thể ở cây theo mục bất kỳ trong số các mục từ (17) đến (28).

(30) Phương pháp theo (29), trong đó lượng chất dinh dưỡng cụ thể được cung cấp cho cây được tăng tới mức cao hơn lượng chất dinh dưỡng cụ thể được cung cấp ngay trước khi chẩn đoán nếu kết quả chẩn đoán thu được cho thấy rằng lượng chất dinh dưỡng cụ thể này có xu hướng là không đủ, hoặc được giữ ở mức bằng lượng chất dinh dưỡng cụ thể được cung cấp ngay trước khi chẩn đoán nếu kết quả chẩn đoán thu được cho thấy rằng lượng chất dinh dưỡng cụ thể này là đủ.

(31) Phương pháp xác định tình trạng sinh trưởng của cây, trong đó phương pháp này bao gồm việc xác định tình trạng sinh trưởng của cây dựa vào hai hoặc nhiều hơn hai kết quả chẩn đoán theo thời gian về tình trạng của chất dinh dưỡng cụ thể ở một cây thu được bằng phương pháp chẩn đoán theo mục bất kỳ trong số các mục từ (17) đến (20).

(32) Phương pháp xác định theo (31), trong đó tình trạng sinh trưởng của cây

được xác định là thuận lợi nếu hai hoặc nhiều hơn hai kết quả chẩn đoán theo thời gian về chất dinh dưỡng cụ thể cho thấy rằng tình trạng của chất dinh dưỡng cụ thể này là đủ tại tất cả các thời điểm; được xác định là có xu hướng cải thiện nếu hai hoặc nhiều hơn hai kết quả chẩn đoán theo thời gian về chất dinh dưỡng cụ thể cho thấy rằng tình trạng của chất dinh dưỡng cụ thể này thay đổi từ không đủ thành đủ; được xác định là có xu hướng giảm nếu hai hoặc nhiều hơn hai kết quả chẩn đoán theo thời gian về chất dinh dưỡng cụ thể cho thấy rằng tình trạng của chất dinh dưỡng cụ thể này thay đổi từ đủ thành không đủ; hoặc được xác định là kém nếu hai hoặc nhiều hơn hai kết quả chẩn đoán theo thời gian về chất dinh dưỡng cụ thể cho thấy rằng tình trạng của chất dinh dưỡng cụ thể này là không đủ tại tất cả các thời điểm.

(33) Phương pháp xác định lượng chất dinh dưỡng cụ thể được cung cấp, trong đó phương pháp này bao gồm việc xác định lượng chất dinh dưỡng cụ thể được cung cấp cho cây dựa vào kết quả xác định thu được bằng phương pháp xác định tình trạng sinh trưởng của cây theo (31) hoặc (32).

(34) Phương pháp theo (33), trong đó lượng chất dinh dưỡng cụ thể được cung cấp cho cây được giữ ở mức bằng lượng chất dinh dưỡng cụ thể được cung cấp ngay trước bước chẩn đoán bất kỳ được thực hiện để xác định tình trạng sinh trưởng nếu kết quả xác định thu được từ hai hoặc nhiều hơn hai kết quả chẩn đoán theo thời gian về chất dinh dưỡng cụ thể cho thấy rằng tình trạng sinh trưởng của cây là thuận lợi, được giữ ở mức bằng lượng chất dinh dưỡng cụ thể được cung cấp ngay trước bước chẩn đoán cuối cùng được thực hiện để xác định tình trạng sinh trưởng nếu kết quả xác định thu được cho thấy rằng tình trạng sinh trưởng của cây có xu hướng cải thiện, được quay trở lại hoặc được tăng tới mức bằng lượng chất dinh dưỡng cụ thể được cung cấp ngay trước bước chẩn đoán thứ nhất được thực hiện để xác định tình trạng sinh trưởng nếu kết quả xác định thu được cho thấy rằng tình trạng sinh trưởng của cây có xu hướng giảm, hoặc được tăng tới mức cao hơn lượng chất dinh dưỡng cụ thể được cung cấp ở bước chẩn đoán được thực hiện để xác định tình trạng sinh trưởng nếu kết quả xác định thu được cho thấy rằng tình trạng sinh trưởng của cây là kém.

Sáng chế bao gồm các nội dung được mô tả trong bản mô tả sáng chế và/hoặc các hình vẽ của đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản số 2009-200839, là đơn đóng vai trò làm cơ sở ưu tiên cho đơn yêu cầu cấp patent này.

Các hiệu quả có lợi của sáng chế

Theo phương pháp chọn lọc chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng theo sáng chế, chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng có khả năng phản ánh tình trạng của chất dinh dưỡng cụ thể ở cây mà không bị ảnh hưởng bởi các áp lực khác trong các yếu tố môi trường, v.v., có thể được chọn lọc.

Ngoài ra, theo phương pháp chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng của cây theo sáng chế, tình trạng của chất dinh dưỡng cụ thể ở cây thử nghiệm có thể được chẩn đoán chính xác mà không bị ảnh hưởng bởi các áp lực khác.

Ngoài ra, theo phương pháp xác định tình trạng sinh trưởng của cây theo sáng chế, tình trạng sinh trưởng của cây thử nghiệm có thể được xác định, và sự sinh trưởng trong tương lai của nó có thể được dự đoán.

Ngoài ra, theo phương pháp xác định lượng chất dinh dưỡng cụ thể được cung cấp theo sáng chế, chất dinh dưỡng cụ thể có thể được cung cấp với lượng thích hợp cho cây thử nghiệm dựa vào kết quả thu được bằng phương pháp theo sáng chế để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng hoặc để xác định tình trạng sinh trưởng.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 là biểu đồ thể hiện kết quả chẩn đoán tình trạng nitơ của *Eucalyptus* thử nghiệm bằng cách sử dụng các chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng nitơ của *Eucalyptus globulus*.

Fig. 2 là biểu đồ thể hiện lượng sinh trưởng của mỗi nhóm vào tháng trồng thứ ba.

Fig. 3a thể hiện ví dụ 1 về khối phổ của các chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng nitơ của *Eucalyptus globulus* thu được bằng phương pháp chọn lọc chỉ thị dùng để chẩn đoán dinh dưỡng theo sáng chế.

Fig. 3b thể hiện ví dụ 2 về khối phổ của các chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng nitơ của *Eucalyptus globulus* thu được bằng phương pháp chọn lọc chỉ thị dùng để chẩn đoán dinh dưỡng theo sáng chế.

Fig. 3c thể hiện ví dụ 3 về khối phổ của các chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng nitơ của *Eucalyptus globulus* thu được bằng phương pháp chọn lọc chỉ thị dùng để chẩn đoán dinh dưỡng theo sáng chế.

Fig. 4 là biểu đồ thể hiện kết quả chẩn đoán tình trạng nitơ của *Eucalyptus globulus* được trồng ngoài đồng ruộng bằng cách sử dụng các chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng nitơ của *Eucalyptus globulus*.

Fig. 5 là biểu đồ thể hiện lượng sinh trưởng của mỗi nhóm mô hình chẩn đoán của *Eucalyptus globulus* được trồng ngoài đồng ruộng vào tháng trồng thứ ba.

Fig. 6 là biểu đồ thể hiện kết quả chẩn đoán tình trạng nitơ của *Eucalyptus deglupta* x *camaldulensis* được trồng ngoài đồng ruộng bằng cách sử dụng các chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng nitơ của *Eucalyptus deglupta* x *camaldulensis*.

Fig. 7 là biểu đồ thể hiện lượng sinh trưởng của mỗi nhóm mô hình chẩn đoán của *Eucalyptus deglupta* x *camaldulensis* được trồng ngoài đồng ruộng vào tháng trồng thứ ba.

Fig. 8 là biểu đồ thể hiện kết quả chẩn đoán tình trạng nitơ của *Solanum melongena* được trồng ngoài đồng ruộng bằng cách sử dụng các chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng nitơ của *Solanum melongena*.

Fig. 9 là biểu đồ thể hiện kết quả chẩn đoán tình trạng nitơ của *Solanum lycopersicum* được trồng ngoài đồng ruộng bằng cách sử dụng các chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng nitơ của *Solanum lycopersicum*.

Fig. 10 là biểu đồ thể hiện kết quả chẩn đoán tình trạng nitơ của *Zea mays* được trồng ngoài đồng ruộng bằng cách sử dụng các chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng nitơ của *Zea mays*.

Fig. 11 là biểu đồ thể hiện kết quả chẩn đoán tình trạng nitơ của *Oryza sativa* được trồng ngoài đồng ruộng bằng cách sử dụng các chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng nitơ của *Oryza sativa*.

Fig. 12 là biểu đồ thể hiện lượng sinh trưởng của mỗi nhóm mô hình chẩn đoán của *Solanum melongena* được trồng ngoài đồng ruộng vào tháng trồng đầu tiên. Trong biểu đồ này, dấu * biểu thị rằng lượng sinh trưởng là khác đáng kể với mức 1% hoặc nhỏ hơn giữa hai dung dịch thủy canh.

Fig. 13 là biểu đồ thể hiện lượng sinh trưởng của mỗi nhóm mô hình chẩn đoán của *Solanum lycopersicum* được trồng ngoài đồng ruộng vào tháng trồng đầu tiên. Trong biểu đồ này, dấu * biểu thị rằng lượng sinh trưởng là khác đáng kể với mức 1%

hoặc nhỏ hơn giữa hai dung dịch thủy canh.

Fig. 14 là biểu đồ thể hiện lượng sinh trưởng của mỗi nhóm mô hình chẩn đoán của *Zea mays* được trồng ngoài đồng ruộng vào tháng trồng đầu tiên. Trong biểu đồ này, dấu * biểu thị rằng lượng sinh trưởng là khác đáng kể với mức 1% hoặc nhỏ hơn giữa hai dung dịch thủy canh.

Fig. 15 là biểu đồ thể hiện lượng sinh trưởng của mỗi nhóm mô hình chẩn đoán của *Oryza sativa* được trồng ngoài đồng ruộng vào tuần trồng thứ sáu. Trong biểu đồ này, dấu * biểu thị rằng lượng sinh trưởng là khác đáng kể với mức 1% hoặc nhỏ hơn giữa hai dung dịch thủy canh.

Mô tả chi tiết sáng chế

1. Phương pháp 1 để chọn lọc chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng

Một khía cạnh của sáng chế là phương pháp chọn lọc chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng, trong đó, trong số các sản phẩm chuyển hóa thu được từ mỗi trong số hai cây, một cây trong số đó thiếu hụt chất dinh dưỡng cụ thể và cây còn lại được cung cấp đủ chất dinh dưỡng cụ thể, sản phẩm chuyển hóa được xác nhận là có sự khác biệt về lượng có ý nghĩa về mặt thống kê giữa các cây được chọn lọc làm chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng liên quan đến chất dinh dưỡng cụ thể ở cây. Phương pháp chọn lọc chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng theo sáng chế bao gồm bước chiết và bước chọn lọc. Mỗi bước này sẽ được mô tả cụ thể dưới đây.

1.1. Bước chiết

"Bước chiết" là bước bao gồm việc chiết chất chiết chứa sản phẩm chuyển hóa từ toàn bộ hoặc một phần của cây thiếu hụt chất dinh dưỡng cụ thể và cây được cung cấp chất dinh dưỡng này.

Theo sáng chế, thuật ngữ "cây" dùng để chỉ rêu, cây không có hoa và cây có hạt. Tốt hơn nếu cây là cây có hạt. Cây hạt trần hoặc cây hạt kín bất kỳ hoặc cây thân thảo hoặc cây thân gỗ bất kỳ có thể được sử dụng làm cây có hạt.

Theo sáng chế, thuật ngữ "chất dinh dưỡng" dùng để chỉ nguyên tố mà tình trạng thiếu hụt nó gây ra tình trạng bất thường nào đó ở sự sinh trưởng hoặc sinh sản của cây, mà không thể phục hồi các triệu chứng này bằng cách cung cấp các nguyên tố

khác. Chất dinh dưỡng có nghĩa là nguyên tố thiết yếu ở cây như thường lệ. Các nguyên tố thiết yếu thông thường ở cây bao gồm 16 nguyên tố, là hydro (H), oxy (O), cacbon (C), nitơ (N), phospho (P), kali (K), magie (Mg), canxi (Ca), lưu huỳnh (S), sắt (Fe), mangan (Mn), kẽm (Zn), bo (B), molybden (Mo), đồng (Cu) và clo (Cl). Theo sáng chế, chất dinh dưỡng dùng để chỉ các nguyên tố này như thường lệ. Trong số các nguyên tố thiết yếu này, nitơ, phospho, kali, bo, magie, canxi và lưu huỳnh được ưu tiên làm chất dinh dưỡng cụ thể theo sáng chế, và nitơ, phospho, kali và bo được ưu tiên đặc biệt. Theo cách khác, chất dinh dưỡng theo sáng chế cũng có thể bao gồm các nguyên tố không phải là nguyên tố thiết yếu, nhưng cần thiết cho sự sinh trưởng và sinh sản của cây cụ thể. Ví dụ về các nguyên tố này bao gồm silic (Si) có ích đối với sự sinh trưởng của *Oryza sativa*. Theo sáng chế, thuật ngữ "chất dinh dưỡng cụ thể" dùng để chỉ một hoặc nhiều hơn một chất dinh dưỡng được chọn lọc từ nhóm chất dinh dưỡng nêu trên.

Theo sáng chế, "toàn bộ" cây dùng để chỉ toàn bộ phần cấu thành nên cây đang quan tâm. Ngoài ra, "phần" của cây dùng để chỉ cơ quan (ví dụ, rễ, thân, lá, hoa, hoặc bào tử hoặc hạt giống) cấu thành nên cây đang quan tâm, mô mà là tập hợp của các tế bào biệt hóa về mặt hình thái và chức năng cấu thành nên cơ quan, hoặc tế bào cấu thành nên mô.

Theo sáng chế, thuật ngữ "quá trình chuyển hóa" bao gồm quá trình bất kỳ trong số quá trình dị hóa, ví dụ là hô hấp, và quá trình đồng hóa, ví dụ là quang hợp. Cần lưu ý rằng theo sáng chế, thuật ngữ "sản phẩm chuyển hóa" dùng để chỉ chất được tạo thành hoặc sẽ được tạo thành nhờ quá trình chuyển hóa của cây mà sản phẩm chuyển hóa sơ cấp được loại bỏ ra khỏi đó.

Theo sáng chế, sản phẩm chuyển hóa có thể được nhận biết bằng cách sử dụng phương pháp phân tích hóa học (ví dụ, kỹ thuật khối phổ) và/hoặc phương pháp phân tích sinh học (ví dụ, phản ứng kháng nguyên-kháng thể), và không nhất thiết phải xác định cấu trúc hóa học của sản phẩm chuyển hóa. Ví dụ, để phân tích sản phẩm chuyển hóa bằng kỹ thuật khối phổ, chỉ cần xác định thời gian lưu và tỷ lệ khối lượng/điện tích. Ngoài ra, để sử dụng kháng thể đặc hiệu với một phân tử đơn lẻ có cấu trúc hóa học chưa biết hoặc dạng tương tự, chỉ cần xác định sự có mặt hoặc không có mặt của phản ứng kháng nguyên-kháng thể. Ví dụ về sản phẩm chuyển hóa được nêu theo sáng chế bao gồm các chất mà các sản phẩm chuyển hóa sơ cấp đã được loại bỏ ra khỏi đó

như protein (bao gồm enzym), hormon thực vật, đường, axit amin và nucleotit. Ngoài ra, sản phẩm chuyển hóa tan được trong nước hoặc tan được trong lipid.

"Chất chiết" dùng để chỉ chất chiết của cây, thường là dịch chiết của cây, chứa các sản phẩm chuyển hóa. Chất chiết có thể chứa các chất không phải là sản phẩm chuyển hóa, ví dụ, các chất như phân bón, các chất này được đưa vào trực tiếp bởi cây từ thế giới bên ngoài. Điều này là do các chất này có thể được phân biệt với các sản phẩm chuyển hóa, miễn là các chất được cung cấp hoặc được bổ sung là rõ ràng. Vì sản phẩm chuyển hóa có thể tan được trong nước hoặc tan được trong lipid, nên dung môi được sử dụng ở bước chiết chất chiết có thể là dung dịch bất kỳ trong số các dung dịch nước hoặc các dung môi hữu cơ.

"Cây thiếu hụt chất dinh dưỡng cụ thể" dùng để chỉ cây đang quan tâm mà chỉ thiếu hụt chất dinh dưỡng cụ thể theo cách nhân tạo. Theo sáng chế, thuật ngữ "thiếu hụt" dùng để chỉ việc không đủ lượng cần thiết cho sự sinh trưởng và sinh sản bình thường của cây đang quan tâm (lượng này được gọi là lượng tham chiếu cần thiết) và bao gồm giảm, hết sạch hoặc gần như hết sạch. "Gần như hết sạch" dùng để chỉ tình trạng tương đương với hết sạch vì chất dinh dưỡng cụ thể được chứa rất ít nhưng hết ngay lập tức do sự hấp thụ của cây. Ví dụ, nitơ được cung cấp với lượng là 40 μM được hấp thụ và hết ngay lập tức ở *Eucalyptus globulus*, là loài *Eucalyptus*, trong quá trình sinh trưởng của nó. Lượng nitơ được cung cấp này tương đương với gần như hết sạch.

Tình trạng thiếu hụt chất dinh dưỡng cụ thể tốt hơn là tình trạng mà trong đó chất dinh dưỡng cụ thể này bị cạn kiệt hoặc gần như bị cạn kiệt. Điều này là do trong "bước chọn lọc" tiếp theo, thu được sự khác biệt về lượng rõ ràng về lượng tích lũy của mỗi sản phẩm chuyển hóa khi so sánh nó với (nhóm) cá thể được cung cấp chất dinh dưỡng cụ thể này.

"Cây được cung cấp chất dinh dưỡng" dùng để chỉ cây thuộc cùng loài giống như cây thiếu hụt chất dinh dưỡng cụ thể và được cung cấp đủ chất dinh dưỡng cụ thể giống như vậy. Thuật ngữ "được cung cấp đủ" có nghĩa là cây đang quan tâm được cung cấp chất dinh dưỡng cụ thể với lượng bằng hoặc lớn hơn lượng tham chiếu cần thiết của nó. Lượng tham chiếu cần thiết của chất dinh dưỡng cụ thể khác nhau tùy thuộc vào loài cây và do đó có thể được xác định một cách thích hợp trong phạm vi kỹ

thuật của lĩnh vực này khi xem xét lượng tham chiếu cần thiết đã biết trong tình trạng kỹ thuật theo loài cây đang quan tâm. Ví dụ, đối với *Eucalyptus globulus*, khoảng 1000 μM thường là đủ để làm lượng tham chiếu cần thiết của nitơ.

Sự khác biệt về lượng ở lượng chất dinh dưỡng cụ thể được cung cấp giữa cây thiếu hụt chất dinh dưỡng cụ thể và cây được cung cấp chất dinh dưỡng này không bị giới hạn một cách cụ thể. Tuy nhiên, nếu sự khác biệt về lượng này nhỏ, thì sản phẩm chuyển hóa được xác nhận là có sự khác biệt về lượng có ý nghĩa về mặt thống kê giữa chúng có thể không được chọn lọc trong “bước chiết” tiếp theo do sự sinh trưởng của cả hai cây trong điều kiện gần như nhau. Do đó, tốt hơn nếu sự khác biệt về lượng này lớn. Tốt nhất nếu lượng chất dinh dưỡng cụ thể được cung cấp cho cây thiếu hụt chất dinh dưỡng cụ thể tương đương với tình trạng mà trong đó chất dinh dưỡng cụ thể này bị cạn kiệt (lượng chất dinh dưỡng cụ thể được cung cấp: 0) hoặc gần như bị cạn kiệt, như nêu trên.

Các điều kiện không phải là lượng chất dinh dưỡng cụ thể được cung cấp, ví dụ, loại (bao gồm giống và chủng) của cây, các chất dinh dưỡng khác, điều kiện thời tiết (ví dụ, nhiệt độ không khí, số giờ chiếu sáng và độ ẩm), điều kiện đất trồng, điều kiện thời gian (ví dụ, khoảng thời gian sinh trưởng và mùa sinh trưởng), và sức khỏe của cây được thiết đặt giống nhau, như thường lệ, giữa hai (nhóm) cá thể cây được sử dụng ở bước này. Do đó, để điều chỉnh lượng chất dinh dưỡng cụ thể đang quan tâm được cung cấp sao cho chỉ có lượng này là khác nhau một cách cụ thể giữa hai cây, ưu tiên nếu các cây này được nuôi bằng cách, tốt hơn là, trồng thủy canh, trong môi trường tổng hợp, ví dụ, trong môi trường nhân tạo như buồng khí hậu nhân tạo. Điều này là do hai cây khác nhau về lượng chất dinh dưỡng cụ thể đang quan tâm được cung cấp có thể được chuẩn bị dễ dàng, ví dụ, bằng cách điều chỉnh có chọn lọc lượng chất dinh dưỡng cụ thể đang quan tâm được cung cấp trong môi trường tổng hợp hoàn toàn và làm cho các điều kiện còn lại là giống nhau. Ví dụ, khi nitơ được sử dụng làm chất dinh dưỡng cụ thể như nêu trên, các cây có thể được nuôi trong môi trường tổng hợp, mỗi môi trường này chứa 40 μM nitơ (lượng khiến cây gần như bị thiếu hụt chất dinh dưỡng này) hoặc 4000 μM nitơ (bằng hoặc lớn hơn lượng tham chiếu cần thiết) để nhờ đó dễ dàng thu được các cây đang quan tâm mà khác nhau về lượng nitơ được cung cấp, một cây trong số đó thiếu hụt nitơ và cây còn lại được cung cấp đủ.

Các cây mà khác nhau về lượng chất dinh dưỡng cụ thể được cung cấp này

không chỉ bao gồm (các nhóm) cá thể cây con được nuôi từ hạt hoặc dạng tương tự trong điều kiện bao gồm lượng đã được điều chỉnh của chất dinh dưỡng cụ thể được cung cấp, mà cả (các nhóm) cá thể có mức độ sinh trưởng giống như vậy sau khi được nuôi trong điều kiện dinh dưỡng thông thường trong khoảng thời gian nhất định và sau đó được chuyển sang điều kiện nêu trên.

Môi trường tổng hợp hoàn toàn đã biết trong tình trạng kỹ thuật có thể được sử dụng. Ví dụ, môi trường tổng hợp hoàn toàn được mô tả trong tài liệu (tiêu đề: New Manual for Nutrient Culture, được chỉnh lý bởi Japan Greenhouse Horticulture Association) thường có thể được sử dụng. Theo cách khác, môi trường tổng hợp đặc hiệu được làm tối ưu hóa cho cây đang quan tâm có thể được sử dụng khi đã biết trong tình trạng kỹ thuật.

Ở bước chiết, chất chiết được chiết từ toàn bộ hoặc một phần của mỗi trong số hai (nhóm) cá thể cây. Để chiết từ một phần của mỗi trong số (các nhóm) cá thể, phần giống nhau giữa hai (nhóm) cá thể được sử dụng làm phần của cây. Ví dụ, chất chiết được chiết từ lá của một (nhóm) cá thể, trong khi đó chất chiết cũng được chiết từ lá của (nhóm) cá thể còn lại. Phương pháp chiết chất chiết không bị giới hạn một cách cụ thể, miễn là nó là phương pháp có khả năng chiết các sản phẩm chuyển hóa từ cây. Ví dụ, để thu được sản phẩm chuyển hóa tan được trong nước, mỗi cây được tán thành bột, khi cần, và sau đó được bổ sung nước, và dung dịch này có thể được nén và sau đó được lọc. Theo cách khác, để thu được sản phẩm chuyển hóa tan được trong lipid, mỗi cây có thể được tán thành bột, khi cần, sau đó được ngâm trong dung môi hữu cơ như metanol trong khoảng thời gian đã định, và sau đó được lọc. Các kỹ thuật đã biết trong tình trạng kỹ thuật có thể được sử dụng làm phương pháp chiết này, và để biết thêm chi tiết về chúng, có thể xem, ví dụ, các phương pháp được mô tả trong các tài liệu: Yoko Iijima et al., *The Plant Journal* (2008) 54, 949-962; và Hideyuki Suzuki et al., *Phytochemistry* (2008) 69, 99-111.

1.2. Bước chọn lọc

"Bước chọn lọc" là bước bao gồm việc so sánh giữa các cây lượng tích lũy của mỗi sản phẩm chuyển hóa thu được ở bước chiết để chọn lọc sản phẩm chuyển hóa được xác nhận là có sự khác biệt về lượng có ý nghĩa về mặt thống kê giữa chúng làm chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng mà tình trạng của chất dinh dưỡng cụ

thể được chẩn đoán bằng chỉ thị này.

"Lượng tích lũy" dùng để chỉ lượng của sản phẩm chuyển hóa cụ thể trong chất chiết thu được ở bước chiết. Lượng tích lũy này có thể là lượng tương đối như nồng độ hoặc có thể là lượng tuyệt đối của sản phẩm chuyển hóa khi thể tích của chất chiết bằng nhau giữa các cây cần so sánh.

Ở bước này, lượng tích lũy của cùng sản phẩm chuyển hóa chứa trong các chất chiết tương ứng được so sánh trước tiên giữa hai cây. Phương pháp phát hiện và định lượng sản phẩm chuyển hóa cụ thể trong chất chiết không bị giới hạn một cách cụ thể, miễn là nó là phương pháp có khả năng phát hiện và định lượng sản phẩm chuyển hóa cụ thể này. Sản phẩm chuyển hóa có thể được phát hiện và định lượng bằng cách sử dụng, ví dụ, kỹ thuật khối phổ, phương pháp sử dụng phản ứng kháng nguyên-kháng thể và điện di. Kỹ thuật khối phổ bao gồm kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao-khối phổ (LC-MS), sắc ký lỏng hiệu năng cao-khối phổ nối tiếp (LC-MS/MS), sắc ký khí-khối phổ (GC-MS), sắc ký khí-khối phổ nối tiếp (GC-MS/MS), điện di mao dẫn-khối phổ (CE-MS) và ICP-khối phổ (ICP-MS). Thử nghiệm hấp phụ miễn dịch liên kết enzym (ELISA), phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR) hoặc phương pháp vi cân tinh thể thạch anh (QCM) có thể được sử dụng làm phương pháp sử dụng phản ứng kháng nguyên-kháng thể. Ngoài ra, khi sản phẩm chuyển hóa cần phân tích là protein, ví dụ, kỹ thuật điện di hai chiều có thể được sử dụng làm kỹ thuật điện di. Tất cả các phương pháp phân tích này đều là các kỹ thuật đã biết trong tình trạng kỹ thuật và có thể được thực hiện theo các phương pháp này. Xem, ví dụ, các tài liệu: Yoko Iijima et al., *The Plant Journal* (2008) 54, 949-962; Masami Hirai et al., *Proc Natl Acad Sci USA* (2004) 101 (27) 10205-10210; Shigeru Sato et al., *The Plant Journal* (2004) 40 (1) 151-163; và Motoyuki Shimizu et al., *Proteomics* (2005) 5, 3919-3931.

Tiếp theo, sản phẩm chuyển hóa được xác nhận là có sự khác biệt về lượng có ý nghĩa về mặt thống kê giữa chúng theo kết quả so sánh được chọn lọc làm chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng mà tình trạng của chất dinh dưỡng cụ thể được chẩn đoán bằng chỉ thị này. Sự khác biệt về lượng có ý nghĩa về mặt thống kê là lớn hơn hoặc bằng 1,3 lần, tốt hơn là lớn hơn hoặc bằng 1,5 lần, tốt hơn nữa là lớn hơn hoặc bằng 1,7 lần, tốt hơn nữa là lớn hơn hoặc bằng 2 lần. Sự khác biệt về lượng có ý nghĩa về mặt thống kê là lớn hơn hoặc nhỏ hơn ở sản phẩm chuyển hóa bắt nguồn từ cây thiếu hụt chất dinh dưỡng cụ thể so với sản phẩm chuyển hóa bắt nguồn từ cây đối

chúng được cung cấp chất dinh dưỡng này. Điều này có nghĩa là, ví dụ, nếu sự khác biệt về lượng là lớn hơn hoặc bằng 2 lần với mức có ý nghĩa về mặt thống kê, thì sản phẩm chuyển hóa bắt nguồn từ một cây có thể có lượng tích lũy lớn hơn hoặc bằng 2 lần lượng tích lũy của sản phẩm chuyển hóa bắt nguồn từ cây còn lại hoặc có thể có lượng tích lũy nhỏ hơn hoặc bằng $1/2$ lượng tích lũy của chúng. Điều này là do sản phẩm chuyển hóa bất kỳ mà tăng hoặc giảm một cách cụ thể khi so sánh giữa (các nhóm) các cá thể cây, một cây trong số đó thiếu hụt chất dinh dưỡng cụ thể và cây còn lại được cung cấp đủ chất dinh dưỡng cụ thể này có thể là ứng viên chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng theo sáng chế. Do đó, sản phẩm chuyển hóa mà có mặt ở một cây và không có mặt ở cây còn lại cũng có thể đóng vai trò làm chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng mà tình trạng của chất dinh dưỡng cụ thể được chẩn đoán bằng chỉ thị này, miễn là sự khác biệt về lượng có ý nghĩa về mặt thống kê được xác nhận.

Thuật ngữ "có ý nghĩa về mặt thống kê" có nghĩa là sự khác biệt đáng kể thu được giữa các sản phẩm chuyển hóa bắt nguồn từ hai cây ở bước xử lý thống kê về sự khác biệt về lượng giữa chúng. Các ví dụ cụ thể của chúng bao gồm mức có ý nghĩa nhỏ hơn 5%, 1% hoặc 0,1%. Phương pháp thử nghiệm đã biết trong tình trạng kỹ thuật mà có khả năng xác định sự có mặt hoặc không có mặt của mức có ý nghĩa có thể được sử dụng một cách thích hợp mà không bị giới hạn một cách cụ thể làm phương pháp thử nghiệm ở bước xử lý thống kê. Ví dụ, có thể sử dụng kiểm định t Student hoặc kiểm định so sánh nhiều nhóm (xem tài liệu: Kanji Suzuki, Basic Statistics; và Yasushi Nagata, et al., Basic Statistical Multiple Comparison Method).

Có thể chuẩn bị cơ sở dữ liệu về lượng tích lũy của các sản phẩm chuyển hóa khác nhau thu được từ các cây thuộc mỗi loài được cung cấp đủ chất dinh dưỡng cụ thể. Cơ sở dữ liệu như vậy rất tiện lợi vì nó có thể ứng dụng được cho "phương pháp chẩn đoán tình trạng của chất dinh dưỡng cụ thể ở cây" và "phương pháp xác định tình trạng sinh trưởng của cây" (sẽ được mô tả dưới đây) mà không cần thu các giá trị đối chứng mới từ cây đối chứng để tiến hành phương pháp này.

Theo khía cạnh này của sáng chế, hai (nhóm) cá thể cây thuộc cùng một loài mà lượng tích lũy của mỗi sản phẩm chuyển hóa được so sánh giữa chúng được nuôi trong cùng điều kiện ngoại trừ lượng chất dinh dưỡng cụ thể được cung cấp, như thường lệ. Trong trường hợp này, chỉ có áp lực liên quan đến chất dinh dưỡng cụ thể được gây ra

cho cây đang quan tâm, do đó chỉ khác nhau về lượng chất dinh dưỡng cụ thể được cung cấp. Do đó, coi như là sản phẩm chuyển hóa thu được làm chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng bằng phương pháp chọn lọc theo sáng chế chỉ đáp ứng trực tiếp hoặc gián tiếp đối với áp lực chất dinh dưỡng cụ thể và không hoặc hầu như không bị ảnh hưởng bởi các áp lực khác, ví dụ, các chất dinh dưỡng khác, điều kiện đất trồng, điều kiện thời tiết và khoảng thời gian sinh trưởng. Trong thực tế, như được thể hiện trong ví dụ 4 được mô tả dưới đây, kết quả chẩn đoán tương tự cũng được đưa ra thành công từ thậm chí là các cây được trồng trong các áp lực khác nhau về mặt thời gian hoặc môi trường bằng cách sử dụng các chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng được chọn lọc bằng phương pháp chọn lọc theo sáng chế. Do đó, phương pháp chọn lọc chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng theo sáng chế có thể cung cấp chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng mà tình trạng của chất dinh dưỡng cụ thể ở cây có thể được đánh giá chính xác bằng chỉ thị này mà không bị ảnh hưởng bởi các áp lực khác. Theo hiểu biết của các tác giả sáng chế, chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng mà tình trạng dinh dưỡng của cây thử nghiệm có thể được chẩn đoán chính xác bằng chỉ thị này mà không bị ảnh hưởng bởi các áp lực khác như vậy là chưa biết cho đến nay. Về mặt này, sáng chế ưu việt hơn các kỹ thuật thông thường.

2. Phương pháp 2 để chọn lọc chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng

Một khía cạnh của sáng chế là phương pháp chọn lọc trong đó: trong số các sản phẩm chuyển hóa được chiết từ mỗi trong số hai cây, một cây trong số đó thiếu hụt chất dinh dưỡng cụ thể và cây còn lại được cung cấp đủ chất dinh dưỡng cụ thể này, sản phẩm chuyển hóa được xác nhận là có sự khác biệt về lượng có ý nghĩa về mặt thống kê giữa các cây được chọn lọc làm ứng viên chỉ thị thứ nhất; ngoài ra, sản phẩm chuyển hóa được xác nhận là có sự khác biệt về lượng có ý nghĩa về mặt thống kê giữa các sản phẩm chuyển hóa được chiết từ ít nhất một trong số hai cây này và các sản phẩm chuyển hóa được chiết từ cây được cung cấp chất dinh dưỡng cụ thể với lượng mà khác với lượng khiến cây bị thiếu hụt chất dinh dưỡng này ở bước chiết thứ nhất được chọn lọc làm ứng viên chỉ thị thứ hai; và sản phẩm chuyển hóa có chung trong cả hai nhóm ứng viên chỉ thị được chọn lọc làm chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng mà tình trạng của chất dinh dưỡng cụ thể được chẩn đoán bằng chỉ thị này. Cụ thể, phương pháp chọn lọc theo khía cạnh nêu trên được thực hiện bằng cách sử dụng 2 lượng khác nhau của chất dinh dưỡng cụ thể được cung cấp, trong khi dấu hiệu của

khía cạnh này là ít nhất 3 lượng khác nhau của chúng được sử dụng. Chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng có thể được chọn lọc một cách chính xác hơn bằng cách chọn lọc sản phẩm chuyển hóa có sự khác biệt về lượng có ý nghĩa về mặt thống kê trong số 3 hoặc nhiều hơn 3 lượng khác nhau của chất dinh dưỡng cụ thể được cung cấp so với bằng cách chọn lọc giữa 2 hoặc nhiều hơn 2 lượng khác nhau của chúng.

Phương pháp chọn lọc chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng theo sáng chế bao gồm bước chiết thứ nhất, bước chọn lọc thứ nhất, bước chiết thứ hai, bước chọn lọc thứ hai và bước chọn lọc thứ ba. Mỗi bước này sẽ được mô tả cụ thể dưới đây.

2.1. Bước chiết thứ nhất

"Bước chiết thứ nhất" là bước bao gồm việc chiết chất chiết chứa sản phẩm chuyển hóa từ toàn bộ hoặc một phần của cây thiếu hụt chất dinh dưỡng cụ thể và cây được cung cấp chất dinh dưỡng này. Bước này giống với "bước chiết" trong đoạn "Phương pháp 1 để chọn lọc chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng" xét về các yêu cầu và quy trình và có thể được thực hiện theo "bước chiết". Do đó, mô tả chi tiết về chúng được bỏ qua.

2.2. Bước chọn lọc thứ nhất

"Bước chọn lọc thứ nhất" là bước bao gồm việc so sánh giữa các cây lượng tích lũy của mỗi sản phẩm chuyển hóa thu được ở bước chiết thứ nhất để chọn lọc sản phẩm chuyển hóa được xác nhận là có sự khác biệt về lượng có ý nghĩa về mặt thống kê giữa chúng làm ứng viên chỉ thị thứ nhất. Về cơ bản, bước này cũng giống với "bước chọn lọc" trong đoạn "Phương pháp 1 để chọn lọc chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng" xét về các yêu cầu và quy trình và có thể được thực hiện theo "bước chọn lọc". Tuy nhiên, không giống như "bước chọn lọc" nêu trên, các sản phẩm chuyển hóa được chọn lọc ở bước này đóng vai trò làm ứng viên chỉ thị thứ nhất của chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng. Theo một phương án, ở bước này, một trong số hai cây ở bước chiết thứ nhất có thể được sử dụng làm cây thiếu hụt chất dinh dưỡng cụ thể.

2.3. Bước chiết thứ hai

"Bước chiết thứ hai" là bước bao gồm việc chiết chất chiết chứa sản phẩm

chuyển hóa từ toàn bộ hoặc một phần của cây được cung cấp chất dinh dưỡng cụ thể với lượng mà khác với lượng khiến cây bị thiếu hụt chất dinh dưỡng này ở bước chiết thứ nhất. Ví dụ, bước chiết thứ nhất có thể bao gồm việc chiết chất chiết từ mỗi trong số hai (nhóm) cá thể *Eucalyptus globulus* được cung cấp nitơ với lượng là 0 μM (tình trạng thiếu hụt nitơ) hoặc 4000 μM (tình trạng thỏa mãn lượng tham chiếu cần thiết), và bước chiết thứ hai có thể bao gồm việc chiết chất chiết từ (nhóm) cá thể *Eucalyptus globulus* được cung cấp nitơ với lượng là 40 μM (tình trạng thiếu hụt nitơ).

"Lượng khiến cây bị thiếu hụt chất dinh dưỡng" dùng để chỉ lượng chất dinh dưỡng cụ thể được cung cấp trong đó cây đang quan tâm bị thiếu hụt chất dinh dưỡng cụ thể này. Ví dụ, chất dinh dưỡng cụ thể được cung cấp cây không có mặt, tức là lượng chất dinh dưỡng cụ thể được cung cấp tương đương với tình trạng mà trong đó chất dinh dưỡng cụ thể này bị cạn kiệt (tức là, lượng chất dinh dưỡng cụ thể được cung cấp: 0), gần như bị cạn kiệt, hoặc giảm xuống nhỏ hơn lượng tham chiếu cần thiết.

Sự khác biệt về lượng giữa lượng khiến cây bị thiếu hụt chất dinh dưỡng cụ thể ở bước chiết thứ nhất và lượng khiến cây bị thiếu hụt chất dinh dưỡng cụ thể ở bước chiết thứ hai không bị giới hạn một cách cụ thể. Tuy nhiên, nếu sự khác biệt về lượng này nhỏ, thì sản phẩm chuyển hóa được xác nhận là có sự khác biệt về lượng có ý nghĩa về mặt thống kê giữa chúng có thể không được chọn lọc trong "bước chọn lọc thứ hai" tiếp theo do sự sinh trưởng của cả hai cây trong điều kiện gần như nhau. Do đó, tốt hơn nếu sự khác biệt về lượng này lớn.

Ở bước chiết thứ hai, hai hoặc nhiều hơn hai cây có thể được cung cấp chất dinh dưỡng cụ thể với "lượng mà khác với lượng khiến cây bị thiếu hụt chất dinh dưỡng này". Trong trường hợp này, chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng có thể được chọn lọc dựa vào tổng số là 4 hoặc nhiều hơn 4 lượng khác nhau của chất dinh dưỡng cụ thể được cung cấp. Chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng thu được liên quan đến chất dinh dưỡng cụ thể có thể có độ tin cậy cao hơn. Tuy nhiên, tổng số là 3 lượng khác nhau của chất dinh dưỡng cụ thể được cung cấp thường là đủ cho việc chọn lọc chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng dựa trên cơ sở của chúng.

Bước chiết thứ hai có thể được tiến hành đồng thời với bước chiết thứ nhất. Điều này là do đối với các bước chiết này, chỉ cần chiết chất chiết từ mỗi trong số 3

hoặc nhiều hơn 3 cây khác nhau về lượng chất dinh dưỡng cụ thể được cung cấp, bắt kể thứ tự chiết. Ví dụ, chất chiết có thể được chiết từ mỗi trong số các cây đang quan tâm mà trong đó chất dinh dưỡng cụ thể này bị cạn kiệt, cây đang quan tâm được cung cấp chất dinh dưỡng với lượng giảm, và cây đang quan tâm được cung cấp đủ chất dinh dưỡng.

2.4. Bước chọn lọc thứ hai

"Bước chọn lọc thứ hai" là bước bao gồm việc so sánh lượng tích lũy của mỗi sản phẩm chuyển hóa giữa ít nhất một trong số các cây ở bước chiết thứ nhất và cây ở bước chiết thứ hai để chọn lọc sản phẩm chuyển hóa được xác nhận là có sự khác biệt về lượng có ý nghĩa về mặt thống kê giữa chúng làm ứng viên chỉ thị thứ hai. Như ở bước chọn lọc thứ nhất, bước này có thể về cơ bản được thực hiện theo các yêu cầu và quy trình của "bước chọn lọc" trong đoạn "Phương pháp 1 để chọn lọc chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng". Bước này khác với "bước chọn lọc" ở chỗ "bước chọn lọc" bao gồm việc so sánh lượng tích lũy của mỗi sản phẩm chuyển hóa giữa cây thiếu hụt chất dinh dưỡng cụ thể và cây được cung cấp chất dinh dưỡng này, trong khi bước này bao gồm việc so sánh lượng tích lũy của mỗi sản phẩm chuyển hóa thu được từ ít nhất một trong số hai cây ở bước chiết thứ nhất với lượng tích lũy của cùng sản phẩm chuyển hóa như vậy thu được ở bước chiết thứ hai. Ví dụ, chất chiết thu được từ cây thiếu hụt chất dinh dưỡng cụ thể ở bước chiết thứ nhất được gọi là A; chất chiết thu được từ cây được cung cấp chất dinh dưỡng này được gọi là B; và chất chiết thu được ở bước chiết thứ hai được gọi là C. Ở bước này, lượng tích lũy của mỗi sản phẩm chuyển hóa được so sánh giữa A và C và/hoặc B và C. Tốt hơn là, sản phẩm chuyển hóa được so sánh giữa B và C hoặc giữa A và C và B và C.

2.5. Bước chọn lọc thứ ba

"Bước chọn lọc thứ ba" là bước bao gồm việc chọn lọc sản phẩm chuyển hóa có chung trong cả nhóm ứng viên gồm các ứng viên chỉ thị thứ nhất và nhóm ứng viên gồm các ứng viên chỉ thị thứ hai làm chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng liên quan đến chất dinh dưỡng cụ thể. Khi số lượng lớn các ứng viên chỉ thị cấu thành các nhóm ứng viên này, mỗi nhóm ứng viên có thể được đưa vào trong máy tính sao cho các ứng viên chỉ thị có chung trong cả hai nhóm ứng viên được chọn lọc nhờ các câu lệnh để nhờ đó dễ dàng thu được chỉ thị đang quan tâm dùng để chẩn đoán tình

trạng dinh dưỡng.

3. Chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng nitơ

Khía cạnh khác của sáng chế là chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng nitơ của cây. Chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng nitơ theo khía cạnh này của sáng chế được chọn lọc, như được thể hiện trong các ví dụ 1, 6 và 9 được mô tả dưới đây, bằng cách sử dụng phương pháp nêu trên trong đoạn "Phương pháp 1 để chọn lọc chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng", trong đó chất dinh dưỡng cụ thể là nitơ và cây là *Eucalyptus globulus*, *Eucalyptus deglupta* x *camaldulensis*, là thể lai của *Eucalyptus deglupta* và *Eucalyptus camaldulensis*, *Oryza sativa*, *Zea mays*, *Solanum lycopersicum* hoặc *Solanum melongena*.

Chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng nitơ theo sáng chế là chỉ thị bất kỳ trong số 312 chỉ thị được nêu trong bảng 2 (các bảng 2-1 đến 2-4). Mỗi chỉ thị được xác định bằng thời gian lưu (phút) tại vị trí giá trị khối lượng và tỷ lệ khối lượng/điện tích (m/z).

Trong số các chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng nitơ theo sáng chế được nêu trong bảng 2, các chỉ thị có số khối từ 1 đến 270 được chọn lọc, như được thể hiện trong ví dụ 1 được mô tả dưới đây, bằng cách sử dụng phương pháp nêu trên trong đoạn "Phương pháp 2 để chọn lọc chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng nitơ". Tốt hơn nếu các chỉ thị này được sử dụng làm chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng nitơ của *Eucalyptus globulus*. Các chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng nitơ được biểu thị bởi các số khối 15, 31, 41, 42, 43, 51, 57, 59, 68, 84, 91, 104, 110, 111, 148, 149, 156, 241, 263, 264 và 269 trong bảng 2 được ưu tiên đặc biệt làm chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng nitơ của *Eucalyptus deglupta* x *camaldulensis*. Ngoài ra, các chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng nitơ được biểu thị bởi các số khối 5, 170 và 173 trong bảng 2 được ưu tiên đặc biệt làm chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng nitơ của *Oryza sativa*. Ngoài ra, các chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng nitơ được biểu thị bởi các số khối 7, 17, 22, 29, 30, 35, 37, 48, 60, 65, 72, 76, 77, 88, 89, 92, 106, 140, 148, 142, 153, 154, 242 và 257 trong bảng 2 được ưu tiên đặc biệt làm chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng nitơ của *Zea mays*. Ngoài ra, các chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng nitơ được biểu thị bởi các số khối 43, 246 và 265 trong bảng 2 được ưu tiên đặc biệt làm chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng nitơ của *Solanum lycopersicum*. Ngoài ra, các chỉ thị dùng để

chẩn đoán tình trạng nitơ được biểu thị bởi các số khối 104, 144, 242, 257 và 265 trong bảng 2 được ưu tiên đặc biệt làm chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng nitơ của *Solanum melongena*.

Các chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng nitơ theo sáng chế được nêu trong bảng 2 cũng có thể được sử dụng cho các cây một lá mầm hoặc cây hai lá mầm khác hoặc các cây hạt trần hoặc cây hạt kín khác. Các chỉ thị này cũng có thể được sử dụng theo cách ưu tiên, đặc biệt là đối với các loài gần gũi về mặt phát sinh loài với các loài cây nêu trên (ví dụ, các cây *Eucalyptus* như *Eucalyptus camaldulensis*, *Eucalyptus grandis*, *Eucalyptus urophylla*, *Eucalyptus pellita*, *Eucalyptus deglupta* và *Eucalyptus tereticornis*).

Chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng nitơ theo sáng chế đóng vai trò làm chỉ thị sinh học có hiệu quả để ước tính một cách khách quan xem liệu cây thử nghiệm có hàm lượng nitơ đủ hay không. Ngoài ra, chỉ thị này cho phép xác định chính xác tình trạng nitơ của cây thử nghiệm mà không bị ảnh hưởng thậm chí bởi các áp lực dựa vào các yếu tố môi trường khác nhau.

4. Phương pháp chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng của cây

Một khía cạnh của sáng chế là phương pháp chẩn đoán tình trạng của chất dinh dưỡng cụ thể ở cây. Phương pháp chẩn đoán theo sáng chế bao gồm bước chiết sản phẩm chuyển hóa và bước xác định. Mỗi bước này sẽ được mô tả cụ thể dưới đây.

4.1. Bước chiết sản phẩm chuyển hóa

"Bước chiết sản phẩm chuyển hóa" là bước bao gồm việc chiết chất chiết chứa sản phẩm chuyển hóa từ toàn bộ hoặc một phần của cây thử nghiệm.

Theo sáng chế, thuật ngữ "cây thử nghiệm" dùng để chỉ cây được đưa vào phương pháp chẩn đoán theo sáng chế để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng của nó. Cây được nuôi trong môi trường tùy ý có thể được sử dụng.

Ở bước này, chất chiết có thể được chiết từ toàn bộ hoặc một phần của cây thử nghiệm theo cách giống như quy trình của "bước chiết" trong đoạn "Phương pháp 1 để chọn lọc chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng". Do đó, việc mô tả bước này được bỏ qua ở đây.

4.2. Bước xác định

"Bước xác định" là bước bao gồm việc so sánh lượng tích lũy của một hoặc nhiều hơn một chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng trong sản phẩm chuyển hóa thu được ở bước chiết sản phẩm chuyển hóa với lượng tích lũy ở cây đối chứng được cung cấp đủ chất dinh dưỡng để xác định tình trạng không đủ hoặc đủ của chất dinh dưỡng ở cây thử nghiệm dựa vào trạng thái và mức độ khác biệt giữa chúng, một hoặc nhiều hơn một chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng này được chọn lọc liên quan đến chất dinh dưỡng cụ thể ở cây bằng phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp chọn lọc chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng.

Ở bước này, chất dinh dưỡng cụ thể cần được chẩn đoán được xác định trước tiên. Chất dinh dưỡng này có nghĩa là nguyên tố thiết yếu ở cây như thường lệ, như được mô tả trong "bước chiết" trong đoạn "Phương pháp 1 để chọn lọc chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng". Cụ thể, chất dinh dưỡng bao gồm hydro, oxy, cacbon, nitơ, phospho, kali, magie, canxi, lưu huỳnh, sắt, mangan, kẽm, bo, molybden, đồng và clo. Trong số các nguyên tố thiết yếu này, nitơ, phospho, kali, bo, magie, canxi và lưu huỳnh được ưu tiên làm chất dinh dưỡng cụ thể theo sáng chế, và nitơ, phospho, kali và bo được ưu tiên đặc biệt. Theo cách khác, chất dinh dưỡng theo sáng chế cũng có thể bao gồm các nguyên tố không phải là nguyên tố thiết yếu, nhưng cần thiết cho sự sinh trưởng và sinh sản của cây cụ thể. Ví dụ về các nguyên tố này bao gồm silic (Si) có ích đối với sự sinh trưởng của *Oryza sativa*.

Tiếp theo, một hoặc nhiều hơn một chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng thu được bằng phương pháp chọn lọc chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng được chọn lọc dựa vào cùng một phần (ví dụ lá) giống như phần của cây thử nghiệm, như thường lệ, liên quan đến cùng một loài giống như cây thử nghiệm và cùng một chất dinh dưỡng giống như chất dinh dưỡng cụ thể được xác định. Ví dụ, khi tình trạng dinh dưỡng của nitơ ở (nhóm) cá thể cây thử nghiệm là *Eucalyptus globulus* được chẩn đoán bằng cách sử dụng sản phẩm chuyển hóa thu được từ lá của nó, thì chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng được sử dụng có thể được chọn lọc từ các chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng nitơ dựa vào các sản phẩm chuyển hóa thu được từ lá của *Eucalyptus globulus*. Khi không có chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng nào phù hợp với các điều kiện này, thì chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng thu được trong các điều kiện gần giống có thể được sử dụng.

Sau đó, lượng tích lũy của sản phẩm chuyển hóa được chọn lọc làm chỉ thị dùng

để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng trong chất chiết bắt nguồn từ cây thử nghiệm thu được ở bước chiết sản phẩm chuyển hóa được so sánh với lượng tích lũy trong chất chiết từ cây đối chứng. Theo sáng chế, "cây đối chứng" dùng để chỉ cây làm đối chứng cho cây thử nghiệm. Cây đối chứng này được cung cấp chất dinh dưỡng cụ thể xác định với lượng đủ cho sự sinh trưởng và sinh sản của cây và có cùng loài giống như cây thử nghiệm và tình trạng sinh trưởng tương đương với nó. Chất chiết từ cây đối chứng và lượng tích lũy của chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng chứa trong đó có thể được chiết hoặc được xác định đồng thời với việc chiết chất chiết từ cây thử nghiệm và việc phát hiện và định lượng chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng. Theo cách khác, dữ liệu về lượng tích lũy thu được trước đó của các chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng của cây đối chứng có thể được tích lũy trong cơ sở dữ liệu. Trong trường hợp này, lượng tích lũy mà phù hợp với các điều kiện có thể được chọn lọc từ cơ sở dữ liệu này và được sử dụng theo sáng chế.

Cụ thể, ví dụ, khi tình trạng nitơ của (nhóm) cá thể cây thử nghiệm *Eucalyptus globulus* được chẩn đoán bằng cách sử dụng sản phẩm chuyển hóa thu được từ lá của nó, thì chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng được sử dụng có thể là một hoặc nhiều hơn một chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng nitơ được mô tả trong đoạn "Chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng nitơ".

Cụ thể, lượng tích lũy của một hoặc nhiều hơn một chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng nitơ bất kỳ được mô tả trong đoạn "Chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng nitơ" có thể được so sánh giữa cây thử nghiệm và cây đối chứng để xác định tình trạng không đủ hoặc đủ của nitơ ở cây thử nghiệm dựa vào trạng thái và mức độ khác biệt giữa chúng.

Việc so sánh lượng tích lũy của chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng giữa cây thử nghiệm và cây đối chứng được thực hiện bằng cách sử dụng trạng thái và mức độ khác biệt về lượng tích lũy giữa hai mẫu này. "Trạng thái khác biệt" có nghĩa là liệu lượng tích lũy của chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng mà khác nhau giữa cây thử nghiệm và cây đối chứng có lớn hơn ở cây thử nghiệm hoặc cây đối chứng hay không. Cũng như vậy, "mức độ khác biệt" có nghĩa là sự khác biệt về lượng tích lũy của chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng giữa cây thử nghiệm và cây đối chứng lớn như thế nào.

Tình trạng không đủ hoặc dư của chất dinh dưỡng ở cây thử nghiệm được xác định dựa vào trạng thái và mức độ khác biệt về lượng tích lũy của chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng giữa cây thử nghiệm và cây đối chứng.

Ví dụ cụ thể về các phương pháp xác định bao gồm các phương pháp sau:

(1) Chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng liên quan đến chất dinh dưỡng cụ thể có tính chất mà nhờ đó lượng tích lũy của nó tăng khi lượng chất dinh dưỡng tăng, và chất dinh dưỡng ở cây thử nghiệm có thể được xác định là có xu hướng không đủ nếu lượng tích lũy của chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng ở cây thử nghiệm nhỏ hơn lượng tích lũy ở cây đối chứng, hoặc được xác định là đủ nếu lượng tích lũy của nó ở cây thử nghiệm bằng hoặc lớn hơn lượng tích lũy ở cây đối chứng. Ví dụ, chỉ thị được sử dụng là chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng nitơ có tính chất mà nhờ đó lượng tích lũy của nó tăng khi lượng nitơ tăng, và nitơ ở cây thử nghiệm có thể được xác định là có xu hướng không đủ nếu lượng tích lũy của chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng nitơ ở cây thử nghiệm nhỏ hơn lượng tích lũy ở cây đối chứng, hoặc được xác định là đủ nếu lượng tích lũy của nó ở cây thử nghiệm bằng hoặc lớn hơn lượng tích lũy ở cây đối chứng.

(2) Chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng liên quan đến chất dinh dưỡng cụ thể có tính chất mà nhờ đó lượng tích lũy của nó giảm khi lượng chất dinh dưỡng tăng, và chất dinh dưỡng ở cây thử nghiệm có thể được xác định là có xu hướng không đủ nếu lượng tích lũy của chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng ở cây thử nghiệm lớn hơn lượng tích lũy ở cây đối chứng, hoặc được xác định là đủ nếu lượng tích lũy của nó ở cây thử nghiệm bằng hoặc nhỏ hơn lượng tích lũy ở cây đối chứng. Ví dụ, chỉ thị được sử dụng là chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng nitơ có tính chất mà nhờ đó lượng tích lũy của nó giảm khi lượng nitơ tăng, và nitơ ở cây thử nghiệm có thể được xác định là có xu hướng không đủ nếu lượng tích lũy của chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng nitơ ở cây thử nghiệm lớn hơn lượng tích lũy ở cây đối chứng, hoặc được xác định là đủ nếu lượng tích lũy của nó ở cây thử nghiệm bằng hoặc nhỏ hơn lượng tích lũy ở cây đối chứng.

5. Phương pháp xác định tình trạng sinh trưởng của cây

Một khía cạnh của sáng chế là phương pháp xác định tình trạng sinh trưởng của cây. Phương pháp này bao gồm việc xác định tình trạng sinh trưởng của cây dựa vào

kết quả thu được bằng phương pháp chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng của cây, và dự đoán sự sinh trưởng trong tương lai của cây từ kết quả xác định được. Cụ thể, tình trạng sinh trưởng của cây được xác định dựa vào hai hoặc nhiều hơn hai kết quả theo thời gian về tình trạng của chất dinh dưỡng cụ thể ở một cây thu được bằng phương pháp bất kỳ nêu trên trong đoạn "Phương pháp chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng của cây".

"Tình trạng sinh trưởng của cây" bao gồm tốc độ sinh trưởng của cây, sự sinh trưởng thuận lợi hoặc kém của cây trong khoảng thời gian đã định hoặc khoảng thời gian sinh trưởng.

"Hai hoặc nhiều hơn hai kết quả theo thời gian" có nghĩa là kết quả chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng thu được về chất dinh dưỡng cụ thể trong cùng điều kiện chẩn đoán từ các mẫu được thu tại hai hoặc nhiều hơn hai thời điểm khác nhau từ một cây. Khoảng cách thời gian giữa các lần lấy mẫu có thể được xác định mà không bị giới hạn một cách cụ thể theo loại cây, môi trường sinh trưởng, v.v.. Tuy nhiên, nếu khoảng cách thời gian là quá ngắn, tình trạng sinh trưởng có thể không được xác định chính xác. Do đó, khoảng cách thời gian là khoảng thời gian thích hợp, ví dụ, 3 ngày hoặc dài hơn, tốt hơn là 1 tuần hoặc dài hơn, tốt hơn nữa là 1 tháng hoặc dài hơn hoặc 3 tháng hoặc dài hơn.

Ví dụ cụ thể về các phương pháp xác định để xác định tình trạng sinh trưởng của cây dựa vào hai hoặc nhiều hơn hai kết quả theo thời gian bao gồm các phương pháp sau:

(1) Tình trạng sinh trưởng của cây được xác định là thuận lợi nếu hai hoặc nhiều hơn hai kết quả chẩn đoán theo thời gian về chất dinh dưỡng cụ thể cho thấy rằng tình trạng của chất dinh dưỡng cụ thể này là đủ tại tất cả các thời điểm. Trong trường hợp này, có thể dự đoán rằng cây có khả năng sinh trưởng mạnh trong tương lai bằng cách duy trì tình trạng này.

(2) Tình trạng sinh trưởng của cây được xác định là có xu hướng cải thiện nếu hai hoặc nhiều hơn hai kết quả chẩn đoán theo thời gian về chất dinh dưỡng cụ thể cho thấy rằng tình trạng của chất dinh dưỡng cụ thể này thay đổi từ không đủ thành đủ. Trong trường hợp này, có thể dự đoán rằng cây có khả năng sinh trưởng mạnh trong tương lai bằng cách duy trì tình trạng cải thiện này.

(3) Tình trạng sinh trưởng của cây được xác định là có xu hướng giảm nếu hai hoặc nhiều hơn hai kết quả chẩn đoán theo thời gian về chất dinh dưỡng cụ thể cho thấy rằng tình trạng của chất dinh dưỡng cụ thể này thay đổi từ đủ thành không đủ. Trong trường hợp này, có thể dự đoán rằng cây có khả năng sinh trưởng chậm hơn trong tương lai trừ khi có hành động thích hợp, như cung cấp phân bón bổ sung giàu chất dinh dưỡng.

(4) Tình trạng sinh trưởng của cây được xác định là kém nếu hai hoặc nhiều hơn hai kết quả chẩn đoán theo thời gian về chất dinh dưỡng cụ thể cho thấy rằng tình trạng của chất dinh dưỡng cụ thể này là không đủ tại tất cả các thời điểm. Trong trường hợp này, có thể dự đoán rằng cây có sự sinh trưởng trong tương lai kém hơn rất nhiều hoặc có thể chết trong một số trường hợp trừ khi thực hiện hành động thích hợp ngay lập tức, như cung cấp phân bón bổ sung giàu chất dinh dưỡng.

6. Phương pháp xác định lượng chất dinh dưỡng cụ thể được cung cấp

Một khía cạnh của sáng chế là phương pháp xác định lượng chất dinh dưỡng cụ thể được cung cấp. Phương pháp này bao gồm việc xác định lượng chất dinh dưỡng cụ thể trong tương lai mà cần được cung cấp cho cây thử nghiệm, tức là, việc tăng hoặc giảm hoặc duy trì lượng chất dinh dưỡng cụ thể được cung cấp, dựa vào kết quả chẩn đoán thu được bằng phương pháp chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng hoặc kết quả xác định thu được bằng phương pháp xác định tình trạng sinh trưởng liên quan đến chất dinh dưỡng cụ thể này ở cây thử nghiệm.

Chất dinh dưỡng cụ thể ở cây thử nghiệm là không đủ nếu kết quả chẩn đoán cho thấy rằng lượng chất dinh dưỡng cụ thể này có xu hướng là không đủ thu được bằng phương pháp nêu trong đoạn "4. Phương pháp chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng của cây". Do đó, để đạt được sự sinh trưởng của cây thử nghiệm, tốt hơn nếu không duy trì tình trạng này. Trong trường hợp này, lượng chất dinh dưỡng cụ thể được cung cấp cần được tăng tới mức cao hơn lượng chất dinh dưỡng cụ thể được cung cấp ngay trước khi chẩn đoán. Ngược lại, lượng hiện tại của chất dinh dưỡng cụ thể ở cây thử nghiệm là thích hợp nếu kết quả chẩn đoán cho thấy rằng lượng chất dinh dưỡng cụ thể này là đủ thu được bằng phương pháp chẩn đoán. Do đó, để đạt được sự sinh trưởng của cây thử nghiệm, tốt hơn nếu duy trì tình trạng này. Trong trường hợp này, lượng chất dinh dưỡng cụ thể được cung cấp cho bước bón phân tiếp theo có thể được

giữ ở mức bằng lượng chất dinh dưỡng cụ thể được cung cấp ngay trước khi chẩn đoán.

Theo cách khác, phương pháp nêu trong đoạn "5. Phương pháp xác định tình trạng sinh trưởng của cây" bao gồm việc xác định xu hướng của tình trạng dinh dưỡng hiện tại dựa vào sự thay đổi về tình trạng dinh dưỡng của chất dinh dưỡng cụ thể ở cây thử nghiệm từ quá khứ đến hiện tại có xem xét đến yếu tố phụ thuộc thời gian. Do đó, lượng chất dinh dưỡng cụ thể được cung cấp có thể được xác định chính xác hơn bằng phương pháp xác định lượng chất dinh dưỡng cụ thể được cung cấp dựa vào kết quả xác định của phương pháp này so với bằng phương pháp nêu trên để xác định lượng chất dinh dưỡng cụ thể được cung cấp dựa vào kết quả chẩn đoán của phương pháp chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng.

Cụ thể, ví dụ, kết quả chẩn đoán thu được bằng phương pháp chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng của cây theo sáng chế có thể cho thấy tình trạng đủ là tình trạng dinh dưỡng hiện tại liên quan đến chất dinh dưỡng cụ thể ở cây thử nghiệm. Ngay cả trong trường hợp này, nếu tình trạng của chất dinh dưỡng cụ thể thay đổi thành không đủ so với kết quả chẩn đoán trong quá khứ từ cây thử nghiệm, thì sự sinh trưởng của cây thử nghiệm giảm bởi việc tiếp tục tình trạng này trong tương lai. Trong trường hợp này, lượng chất dinh dưỡng cụ thể được cung cấp được quay trở lại mức bằng lượng chất dinh dưỡng cụ thể được cung cấp ngay trước lần chẩn đoán mà đưa ra kết quả chẩn đoán cho thấy tình trạng đủ cao nhất. Theo cách khác, lượng chất dinh dưỡng cụ thể được cung cấp được tăng tới mức cao hơn lượng chất dinh dưỡng cụ thể được cung cấp mà ổn định giữa các lần chẩn đoán. Ngoài ra, tất cả kết quả chẩn đoán trong quá khứ và hiện tại về chất dinh dưỡng cụ thể đều có thể cho thấy rằng lượng chất dinh dưỡng cụ thể này có xu hướng là không đủ. Ngay cả trong trường hợp này, miễn là tình trạng của chất dinh dưỡng cụ thể thay đổi thành đủ trong kết quả chẩn đoán hiện tại so với kết quả chẩn đoán trong quá khứ, thì tình trạng sinh trưởng của cây thử nghiệm có xu hướng cải thiện. Do đó, lượng chất dinh dưỡng cụ thể được cung cấp ngay trước lần chẩn đoán gần nhất có thể được duy trì, chứ không phải lượng chất dinh dưỡng cụ thể được cung cấp được tăng ngay lập tức. Ngoài ra, lượng chất dinh dưỡng cụ thể ở cây thử nghiệm là thích hợp từ quá khứ đến hiện tại nếu hai hoặc nhiều hơn hai kết quả chẩn đoán theo thời gian về chất dinh dưỡng cụ thể cho thấy rằng tình trạng của chất dinh dưỡng cụ thể này là đủ với cùng một mức tại tất cả các thời điểm.

Do đó, để đạt được sự sinh trưởng của cây thử nghiệm, tốt hơn nếu duy trì được lượng chất dinh dưỡng cụ thể được cung cấp này. Ngược lại, lượng chất dinh dưỡng cụ thể ở cây thử nghiệm là không đủ nếu hai hoặc nhiều hơn hai kết quả chẩn đoán theo thời gian về chất dinh dưỡng cụ thể cho thấy rằng lượng chất dinh dưỡng cụ thể này có xu hướng là không đủ từ quá khứ đến hiện tại mà không có sự cải thiện hoặc có xu hướng là không đủ mạnh hơn. Sự sinh trưởng của cây thử nghiệm giảm bởi việc tiếp tục tình trạng này trong tương lai. Do đó, để đạt được sự sinh trưởng của cây thử nghiệm, tốt hơn nếu thực hiện việc bón phân với lượng chất dinh dưỡng cụ thể được cung cấp lớn hơn nhiều so với lượng chất dinh dưỡng cụ thể được cung cấp ngay trước lần chẩn đoán mà đưa ra kết quả chẩn đoán gần với tình trạng đủ cao nhất.

Để thực hiện phương án này, cần lưu ý rằng người thực hiện ghi lại, thực hiện trước cho từng lần chẩn đoán, lượng chất dinh dưỡng cụ thể được cung cấp cho cây thử nghiệm ngay trước mỗi lần chẩn đoán, trước khi chẩn đoán cây thử nghiệm bằng phương pháp chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng theo sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Chọn lọc chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng

Các chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng của *Eucalyptus globulus* (được gọi đơn giản dưới đây là "*Eucalyptus*" trong tất cả các ví dụ nhằm mục đích thuận tiện) được chọn lọc với nitơ là chất dinh dưỡng cụ thể bằng phương pháp chọn lọc chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng theo sáng chế.

1. Chuẩn bị *Eucalyptus* thiếu hụt nitơ

16 cá thể *Eucalyptus* có chiều cao khoảng 30 đến 50 cm được trồng thủy canh trong 1 tháng trong mỗi hệ thống thử nghiệm trong số 3 hệ thống thử nghiệm được nêu trong bảng 1, tức là trong mỗi điều kiện dinh dưỡng trong số 3 điều kiện dinh dưỡng khác nhau về nồng độ nitơ (dung dịch thủy canh I: dung dịch thủy canh NO_3 4000 μM , dung dịch thủy canh II: dung dịch thủy canh NO_3 40 μM , và dung dịch thủy canh III: dung dịch thủy canh NO_3 0 μM). Điều kiện trồng thủy canh bao gồm: thể tích dung dịch: khoảng 50 L, nhiệt độ dung dịch thủy canh: khoảng 22 đến 24°C, độ pH dung dịch thủy canh: 4,0 đến 6,0, độ dẫn điện: 0,5 đến 0,7 mS/cm được duy trì tại tất cả các thời điểm bằng cách sử dụng thiết bị trồng thủy canh dùng cho nghiên cứu (được sản xuất bởi M Hydroponic Research Co., Ltd.) làm thiết bị trồng thủy canh. Các chất

phản ứng trong dung dịch thủy canh không gây ra gradien nồng độ vì dung dịch thủy canh được lưu thông tuần hoàn bằng bơm. Môi trường hiếu khí cũng được duy trì ổn định vì không khí được đưa vào dung dịch thủy canh trong quá trình lưu thông tuần hoàn.

Bảng 1. Thành phần của dung dịch thủy canh

Tên dung dịch thủy canh	Dung dịch thủy canh I	Dung dịch thủy canh II	Dung dịch thủy canh III
Chất phản ứng			
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	400	4	0
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	4000	40	0
KCl	2000	2000	2000
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2000	2000	2000
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0	3960	4000
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2000	2000	2000
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,16	0,16	0,16
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$	0,011	0,011	0,011
Fe(III)-EDTA	26,8	26,8	26,8
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,16	0,16	0,16
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$	0,011	0,011	0,011
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	4,5	4,5	4,5
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,4	0,4	0,4
H_3BO_4	18	18	18

(Đơn vị: μM)

2. Lấy mẫu lá

Bảy cá thể trong mỗi hệ thử nghiệm được chọn lọc ngẫu nhiên từ các cá thể *Eucalyptus* được trồng trong mỗi hệ thống thử nghiệm trong số 3 hệ thử nghiệm nêu trên. Các lá khỏe mạnh được chọn lọc từ mỗi cá thể và được cắt tại phần cuống lá bằng kéo. Các mạch chính được lấy ra khỏi các lá được chọn lọc, và mỗi phần còn lại được cho ngay lập tức vào nitơ lỏng để làm dừng phản ứng sống. Mẫu lá được đặt trong ống chất dẻo loại 2,0 mL và được bảo quản trong tủ lạnh sâu ở -80°C cho đến ngay trước khi sử dụng.

3. Chiết chất chiết

Khoảng 50 mg (trọng lượng tươi) mẫu lá *Eucalyptus* đông lạnh được cân vào trong ống có khóa an toàn. Các viên bi zircon oxit có đường kính 5 mm (Tosoh Corp.)

được bổ sung vào ống, và mẫu lá được tán thành bột (25 Hz, 30 giây) bằng cách sử dụng TissueLyser II (Qiagen).

Sau đó, 300 μ L metanol 80% (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) chứa formononetin 10 μ g/mL (Funakoshi Co., Ltd.) được bổ sung vào ống, ống này sau đó được lắc ở 25 Hz trong 120 giây bằng cách sử dụng TissueLyser II để chiết các sản phẩm chuyển hóa. Dung dịch chiết được ly tâm ở 12000 x g trong 10 phút. Sau đó, khoảng 1 mL dịch nổi bề mặt được đặt trong ống tiêm Terumo loại 1 mL (Terumo Corp.). Sau khi lọc qua Millex-LG (Millipore Corp.), dung dịch chiết được chuyển sang ống thủy tinh (Dionex Japan).

4. Phân tích LC-MS và phân tích LC-MS/MS

2 μ L lượng nhỏ của dung dịch chiết thu được được phân tích bằng LC-MS và LC-MS/MS trong các điều kiện phân tích được nêu dưới đây. Các phương pháp phân tích cụ thể tuân theo sách hướng dẫn kèm theo.

Điều kiện sắc ký lỏng

Thiết bị được sử dụng: UFLC (Shimadzu Corp.)

Dung môi rửa giải A: Nước dùng cho sắc ký LiChrosolv (Merck Chemicals) chứa 0,1% axit formic (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)

Dung môi rửa giải B: Axetonitril siêu tinh khiết dùng cho LC-MS LiChrosolv (Merck Chemicals) chứa 0,1% axit formic (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)

Cột: TSKgel ODS-100V 4,6 x 250 mm, hạt: 5 μ m (Tosoh Corp.)

Cột bảo vệ: TSKguardgel ODS-100V, hạt: 5 μ m (Tosoh Corp.)

Nhiệt độ cột: 40°C

Lưu lượng: 0,5 mL/phút

Gradient B% được lập lịch trình theo thời gian

0 phút: 3%, 45 phút: 97%, 50 phút: 97%, 50,1: 3%, 57 phút: 3%

Điều kiện MS

Thiết bị được sử dụng: 3200QTRAP (Applied Biosystems)

Khoảng giá trị khối lượng: 100-1000

Chế độ quét: quét khối lượng tăng cường (Enhanced Mass Scan)

Tốc độ quét: 4000 amu/giây

Phần mềm phân tích: Analyst 1.4.2 (Applied Biosystems)

Điều kiện MSMS

Thiết bị được sử dụng: 3200QTRAP (Applied Biosystems)

Khoảng giá trị khối lượng: 50-1000

Chế độ quét: quét ion sản phẩm tăng cường (Enhanced Product Ion Scan)

Tốc độ quét: 4000 amu/giây

Phần mềm phân tích: Analyst 1.4.2 (Applied Biosystems)

So sánh dữ liệu sản phẩm chuyển hóa: phần mềm Marker View(TM) 1.1 (Applied Biosystems)

Điều kiện so sánh

Dung sai của thời gian rửa giải: 1 phút.

Dung sai của khối lượng: 25 ppm

Ngưỡng cường độ: 10000

5. Chọn lọc chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng

Các sản phẩm chuyển hóa (chỉ thị sinh học) được xác nhận là có thay đổi về lượng để đáp ứng với lượng nitơ trong môi trường thủy canh được chọn lọc như sau bằng cách sử dụng GeneSpring MS (Agilent Technologies, Inc.).

(1) So sánh hai nhóm (đồ thị volcano) được thực hiện giữa 7 cá thể *Eucalyptus* được trồng trong dung dịch thủy canh III (0 μM NO_3) và 7 cá thể *Eucalyptus* được trồng trong dung dịch thủy canh I (4000 μM NO_3) để chọn lọc, làm ứng viên chỉ thị thứ nhất, các sản phẩm chuyển hóa mà thể hiện lượng tích lũy khác nhau bởi hai hoặc lớn hơn hai lần hoặc bởi 1/2 hoặc nhỏ hơn 1/2 giữa hai khu vực thử nghiệm với sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ($P < 0,05$).

(2) So sánh hai nhóm (đồ thị volcano) được thực hiện giữa 7 cá thể *Eucalyptus* được trồng trong dung dịch thủy canh II (40 μM NO_3) và 7 cá thể *Eucalyptus* được

trồng trong dung dịch thủy canh I (4000 μM NO_3) để chọn lọc, làm ứng viên chỉ thị thứ hai, các sản phẩm chuyển hóa với sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê giữa hai nhóm này.

(3) Các sản phẩm chuyển hóa có chung trong cả các ứng viên chỉ thị thứ nhất thuộc (1) và các ứng viên chỉ thị thứ hai thuộc (2) được chọn lọc làm chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng của *Eucalyptus* về nitơ.

6. Kết quả

Theo phương pháp 1 để chọn lọc chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng theo sáng chế, cả các ứng viên chỉ thị thứ nhất và các ứng viên chỉ thị thứ hai đều có thể đóng vai trò làm chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng. Theo đó, 312 sản phẩm chuyển hóa được nêu trong bảng 2 được chọn lọc làm chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng nitơ của *Eucalyptus*. Trong số đó, các chỉ thị có số khối từ 271 đến 273 được thu nhận làm chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng nitơ chỉ thuộc các ứng viên chỉ thị thứ hai. Các chỉ thị có số khối từ 274 đến 312 cũng được thu nhận làm chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng nitơ chỉ thuộc các ứng viên chỉ thị thứ nhất. Theo phương pháp 2 để chọn lọc chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng nitơ theo sáng chế, các chỉ thị có số khối từ 1 đến 270 là các chỉ thị có chung dùng để chẩn đoán tình trạng nitơ trong các ứng viên chỉ thị thứ nhất và các ứng viên chỉ thị thứ hai. Trong bảng 2, từng chỉ thị được thể hiện bằng giá trị đo được (thời gian lưu và tỷ lệ khối lượng/điện tích) của LC-MS. Ngoài ra, khối phổ của một số chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng nitơ (các số khối 29, 46, 63, 69, 110 và 140) thu được trong ví dụ này được thể hiện trong các Fig. 3a đến Fig. 3c làm ví dụ.

Bảng 2-1

Số khối	Thời gian lưu (phút)	Khối lượng (m/z)
1	25,36	789,6
2	25,29	788,5
3	25,29	789,0
4	25,24	790,0
5	25,22	801,5
6	21,20	441,4
7	25,21	802,4
8	25,35	532,3
9	25,23	802,0
10	25,25	802,9
11	44,70	481,3
12	25,36	790,6
13	28,39	574,2
14	21,81	611,4
15	26,72	609,4
16	15,84	804,7
17	25,29	532,7
18	25,29	803,4
19	21,79	549,2
20	25,27	780,6
21	25,33	781,6
22	28,11	573,2
23	26,15	542,4
24	25,32	524,6
25	28,17	574,3
26	28,32	833,4
27	28,41	573,4
28	25,30	525,4
29	27,71	523,3
30	27,42	585,4
31	25,69	639,2
32	26,07	541,3
33	25,28	536,4
34	25,36	537,4
35	25,28	535,3
36	27,18	603,4
37	27,25	563,4
38	16,88	888,6
39	25,28	536,5
40	17,17	880,2
41	15,84	805,2
42	26,44	835,6
43	15,76	797,3
44	27,25	586,3
45	21,79	550,2
46	26,63	537,4
47	15,83	796,6
48	28,16	517,2
49	28,14	565,2
50	28,15	566,4
51	23,26	627,4

Số khối	Thời gian lưu (phút)	Khối lượng (m/z)
52	24,34	574,9
53	24,46	577,3
54	23,55	541,4
55	25,27	814,6
56	24,38	546,5
57	16,72	804,4
58	28,14	557,3
59	23,62	461,3
60	28,36	575,4
61	25,24	538,4
62	28,39	551,4
63	22,52	549,2
64	27,73	545,4
65	25,28	551,3
66	16,52	881,2
67	25,28	532,4
68	23,23	627,4
69	26,30	543,4
70	15,81	805,1
71	28,12	558,2
72	27,23	545,4
73	26,61	544,4
74	26,09	586,4
75	21,17	442,2
76	27,75	673,4
77	28,02	473,4
78	16,78	880,1
79	27,70	524,3
80	27,63	545,4
81	21,78	612,2
82	16,60	872,2
83	27,20	546,2
84	23,93	629,3
85	23,97	541,4
86	26,92	551,3
87	27,02	536,3
88	28,22	559,3
89	27,31	564,5
90	16,50	873,1
91	19,49	623,5
92	28,19	518,3
93	25,08	629,4
94	15,83	796,4
95	25,32	629,4
96	24,34	575,9
97	24,38	546,7
98	26,80	597,4
99	17,35	881,3
100	21,28	442,3

Bảng 2-2

Số khối	Thời gian lưu (phút)	Khối lượng (m/z)
101	17,48	880,6
102	15,88	838,6
103	25,32	553,3
104	23,20	628,3
105	28,68	494,8
106	27,81	674,6
107	26,00	539,2
108	28,83	545,3
109	20,61	427,3
110	26,11	609,4
111	23,92	629,4
112	26,61	543,4
113	34,37	519,4
114	21,83	628,2
115	24,35	759,5
116	28,04	623,4
117	28,50	543,1
118	27,00	543,2
119	24,05	541,4
120	28,82	563,2
121	22,98	545,2
122	21,14	768,5
123	26,57	544,3
124	19,48	624,4
125	21,83	551,3
126	19,25	805,3
127	19,89	808,3
128	26,06	603,2
129	25,30	630,4
130	24,35	546,8
131	21,77	441,2
132	27,69	763,6
133	21,85	532,3
134	25,43	571,3
135	27,46	549,4
136	37,64	515,2
137	24,34	521,3
138	28,21	503,3
139	26,40	572,6
140	26,95	535,3
141	27,48	523,2
142	19,71	605,3
143	15,83	865,7
144	23,30	545,3
145	27,04	547,3
146	27,76	689,5
147	21,89	627,5
148	28,69	607,3
149	15,63	806,4
150	26,61	553,3
151	27,86	667,3

Số khối	Thời gian lưu (phút)	Khối lượng (m/z)
152	28,01	519,2
153	26,15	587,3
154	27,26	601,3
155	43,38	483,4
156	22,93	658,4
157	28,61	589,3
158	26,05	443,4
159	24,36	522,4
160	15,87	729,2
161	10,02	423,1
162	33,14	455,3
163	16,64	409,2
164	37,63	763,6
165	44,97	679,7
166	26,38	433,3
167	15,33	433,0
168	25,00	433,2
169	27,36	432,2
170	24,77	472,3
171	42,75	991,4
172	22,12	379,2
173	24,74	471,5
174	37,53	764,5
175	15,84	367,4
176	11,14	434,3
177	22,06	397,9
178	43,03	759,6
179	15,74	433,2
180	26,17	319,3
181	6,24	448,1
182	32,03	455,5
183	27,58	433,3
184	25,98	624,2
185	35,71	531,4
186	24,28	432,7
187	28,55	714,5
188	24,99	344,2
189	7,92	433,1
190	26,03	624,8
191	29,92	731,5
192	6,59	434,2
193	27,58	432,4
194	3,49	432,8
195	6,08	414,1
196	32,74	693,5
197	26,02	433,3
198	42,87	763,6
199	26,40	328,2
200	38,13	693,5

Bảng 2-3

Số khối	Thời gian lưu (phút)	Khối lượng (m/z)
201	3,59	432,8
202	44,42	431,3
203	14,08	417,1
204	22,06	398,2
205	44,10	764,5
206	37,90	599,5
207	28,54	433,0
208	31,95	682,4
209	37,86	600,5
210	38,44	811,6
211	22,10	397,2
212	22,38	387,2
213	13,96	417,1
214	6,06	462,1
215	26,74	434,0
216	44,06	763,6
217	32,03	681,5
218	44,09	431,3
219	39,61	527,4
220	41,24	513,2
221	37,95	797,6
222	38,30	863,8
223	28,15	433,3
224	24,99	343,3
225	35,43	795,5
226	37,42	666,5
227	33,01	679,4
228	10,02	615,1
229	40,68	942,6
230	39,61	584,5
231	44,35	846,7
232	44,39	845,5
233	42,78	511,3
234	39,92	761,6
235	39,82	763,6
236	6,58	433,1
237	39,65	526,9
238	5,67	433,2
239	28,62	713,4
240	6,35	433,8
241	37,36	665,5
242	39,54	583,6
243	32,73	827,5
244	6,15	433,9
245	43,19	775,6
246	40,15	463,3
247	39,65	538,4
248	39,65	600,4
249	40,57	471,4
250	44,71	862,6
251	43,14	776,5

Số khối	Thời gian lưu (phút)	Khối lượng (m/z)
252	39,72	599,4
253	32,04	553,3
254	14,02	541,1
255	45,00	749,6
256	40,14	910,6
257	35,04	699,5
258	40,14	909,6
259	40,85	941,5
260	44,42	861,7
261	38,25	779,5
262	39,65	554,4
263	44,99	748,6
264	44,97	747,6
265	39,68	537,4
266	39,62	553,4
267	32,96	698,5
268	37,95	796,6
269	32,98	697,6
270	38,00	795,6
271	32,66	569,5
272	39,68	534,4
273	39,61	791,6
274	23,62	461,3
275	21,17	442,2
276	26,92	551,3
277	19,49	623,5
278	28,19	518,3
279	21,28	442,3
280	24,35	759,5
281	24,05	541,4
282	22,98	545,2
283	19,48	624,4
284	21,77	441,2
285	25,43	571,3
286	27,46	549,4
287	37,64	515,2
288	28,21	503,3
289	19,71	605,3
290	23,30	545,3
291	27,76	689,5
292	21,89	627,5
293	28,69	607,3
294	27,86	667,3
295	28,01	519,2
296	43,38	483,4
297	22,93	658,4
298	28,61	589,3
299	10,02	423,1
300	33,14	455,3

Bảng 2-4

Số khối	Thời gian lưu (phút)	Khối lượng (m/z)
301	26,38	433,3
302	15,33	433,0
303	25,00	433,2
304	27,36	432,2
305	24,77	472,3
306	22,12	379,2
307	24,74	471,5
308	11,14	434,3
309	22,06	397,9
310	15,74	433,2
311	26,17	319,3
312	27,58	433,3

Ví dụ 2: Chẩn đoán tình trạng nitơ bằng cách sử dụng chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng nitơ

Các chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng nitơ của *Eucalyptus* thu được trong ví dụ 1 được sử dụng để chẩn đoán tình trạng nitơ của *Eucalyptus* thử nghiệm để chẩn đoán tình trạng nitơ.

1. Trồng *Eucalyptus* thử nghiệm

21 cá thể chồi *Eucalyptus* có chiều cao trung bình khoảng 45 cm được trồng với mật độ 1 cá thể/chậu trong các chậu, mỗi chậu chứa 10 L đất trồng gồm 4 L đất đồi núi, 3 L rêu than bùn (FIBROSOIL), 2 L vermiculit (Hattori Co., Ltd.) và 1 L Venuslit (Fuyo Perlite Co., Ltd.) và được trồng trong môi trường ngoài đồng ruộng trong 3 tháng. Trong khoảng thời gian này, chồi được tưới hai lần mỗi ngày (sáng và tối) bằng khoảng 500 mL nước mỗi chậu. 21 cá thể này được chia thành 3 nhóm, mỗi nhóm gồm 7 cá thể. 50 g (5 g/L đất trồng) phân bón High Control (Chisso Asahi Fertilizer Co., Ltd.) được bổ sung vào nhóm A. 50 g (5 g/L đất trồng) phân bón Long Max (Kuki Fertilizer Ind. Co., Ltd.) được bổ sung vào nhóm B. Nhóm C không được bón phân.

2. Lấy mẫu lá, chiết sản phẩm chuyển hóa và phân tích LC-MS

Vào tháng trồng đầu tiên và tháng trồng thứ hai, mỗi *Eucalyptus* thử nghiệm được lấy mẫu lá, chiết sản phẩm chuyển hóa và phân tích LC-MS theo cách giống như

trong ví dụ 1.

3. Chẩn đoán tình trạng nitơ bằng cách sử dụng chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng nitơ

Sau khi so sánh dữ liệu của các sản phẩm chuyển hóa giữa các mẫu bằng cách sử dụng phần mềm Marker View(TM) 1.1, tình trạng nitơ của *Eucalyptus* thử nghiệm được phân tích dựa vào thông tin về các chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng nitơ bằng cách sử dụng GeneSpring MS. Cụ thể, theo Class Prediction của GeneSpring MS, thông tin về các chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng nitơ của *Eucalyptus* được trồng ngoài đồng ruộng được so sánh với thông tin về các chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng nitơ của *Eucalyptus* được trồng thủy canh trong từng điều kiện nitơ trong số 3 điều kiện nitơ nêu trong ví dụ 1, để xác định rằng thông tin về các chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng nitơ của *Eucalyptus* thử nghiệm là gần nhất với thông tin về các chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng nitơ từ môi trường thủy canh bất kỳ trong số 3 môi trường thủy canh. Các chỉ thị có số khối 1-270 được nêu trong bảng 2 được sử dụng làm chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng nitơ. Các điều kiện phân tích là như sau:

Thuật toán tính toán: Support Vector Machines.

Hàm hạch: Polynomial Dot Product (Order I).

Tập hợp chỉ thị: các chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng nitơ của *Eucalyptus globulus*.

Mẫu thử nghiệm: 21 cá thể *Eucalyptus globulus* thử nghiệm

Mẫu hướng dẫn: *Eucalyptus globulus* được trồng thủy canh trong mỗi điều kiện dinh dưỡng trong số 3 điều kiện dinh dưỡng nêu trong ví dụ 1 (*Eucalyptus* được trồng trong môi trường thủy canh I, *Eucalyptus* được trồng trong môi trường thủy canh II và *Eucalyptus* được trồng trong môi trường thủy canh III).

4. Kết quả

Kết quả chẩn đoán được thể hiện trong Fig. 1. Các mô hình chẩn đoán được phân loại thành 3 nhóm sau đây:

Nhóm 1: Vào cả tháng trồng đầu tiên và tháng trồng thứ hai, 6 cá thể được xác định là có tình trạng nitơ giống như tình trạng nitơ ở dung dịch thủy canh I được mô tả trong ví dụ 1. Tất cả các cá thể này đều từ nhóm A, cho thấy rằng hầu hết các cá thể

trong nhóm A đều duy trì được tình trạng nitơ thuận lợi vào cả tháng trồng đầu tiên và tháng trồng thứ hai.

Nhóm 2: 8 cá thể được xác định là có tình trạng nitơ giống như tình trạng nitơ ở dung dịch thủy canh I được mô tả trong ví dụ 1 vào tháng trồng đầu tiên, nhưng có tình trạng nitơ giống như tình trạng nitơ ở dung dịch thủy canh II được mô tả trong ví dụ 1 vào tháng trồng thứ hai. Một trong số đó là từ nhóm A, và tất cả các cá thể còn lại đều từ nhóm B, cho thấy rằng tình trạng nitơ của nhóm này là thuận lợi tại thời điểm bắt đầu trồng, nhưng bị giảm từ khoảng 1 tháng trồng. Kết quả này chứng tỏ rằng lượng nitơ trong 50 g phân bón Long Max là không đủ để nuôi *Eucalyptus* trong 2 tháng hoặc dài hơn ở tình trạng sinh trưởng ưu tiên.

Nhóm 3: 7 cá thể tương ứng với nhóm này, được xác định là có tình trạng nitơ giống như tình trạng nitơ ở dung dịch thủy canh II được mô tả trong ví dụ 1 vào cả tháng trồng đầu tiên và tháng trồng thứ hai. Tất cả các cá thể trong nhóm này đều có tình trạng nghèo nitơ từ thời điểm bắt đầu trồng và đều từ nhóm C. Nhóm C thiếu hụt nitơ nhưng không được bón phân và do đó được chứng tỏ là phù hợp với kết quả chẩn đoán.

Ví dụ 3: Mối quan hệ giữa tình trạng sinh trưởng và kết quả chẩn đoán tình trạng nitơ thu được bằng cách sử dụng chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng nitơ

Mỗi nhóm được phân loại bằng cách sử dụng các chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng nitơ nêu trong ví dụ 2 được thử nghiệm để kiểm chứng xem liệu kết quả chẩn đoán của chúng có tương quan với tình trạng sinh trưởng trong tương lai dựa vào kết quả chẩn đoán này hay không.

Lượng sinh trưởng trung bình vào tháng trồng thứ ba (trung bình của các giá trị được xác định bằng cách trừ chiều cao tại thời điểm trồng ra khỏi chiều cao vào tháng thứ ba) được đo cho mỗi nhóm trong số các nhóm từ 1 đến 3 được phân loại trong ví dụ 2. Kết quả là, lượng sinh trưởng trung bình được xác nhận là từ cao nhất đến thấp nhất ở các nhóm 1, 2 và 3 theo thứ tự này (Fig. 2). Cụ thể, nhóm 1 được chẩn đoán trong ví dụ 2 là có tình trạng nitơ thuận lợi đã sinh trưởng thêm 60 cm xét về lượng sinh trưởng trung bình và do đó thể hiện sự sinh trưởng trong tương lai thuận lợi nhất. Ngoài ra, nhóm 2 được chẩn đoán trong ví dụ 2 là có tình trạng nitơ giảm từ khoảng 1 tháng trồng đã sinh trưởng thêm 40 cm xét về lượng sinh trưởng trung bình và do đó

kém hơn đôi chút về sự sinh trưởng trong tương lai so với nhóm 1. Mặt khác, nhóm 3 được chẩn đoán trong ví dụ 2 là có tình trạng nghèo nitơ đã sinh trưởng thêm 20 cm xét về lượng sinh trưởng trung bình và do đó được chứng tỏ là có sự sinh trưởng trong tương lai kém nhất.

Kết quả này chứng tỏ rằng tình trạng sinh trưởng trong tương lai của cây có thể được dự đoán từ kết quả chẩn đoán tình trạng nitơ thu được bằng cách sử dụng chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng nitơ theo sáng chế, khi tình trạng nitơ được duy trì. Do đó, tình trạng sinh trưởng trong tương lai của cây được chẩn đoán là có tình trạng dinh dưỡng nghèo chất dinh dưỡng cụ thể bằng phương pháp chẩn đoán theo sáng chế có thể được cải thiện bằng cách cung cấp phân bón bổ sung cho nó dựa vào kết quả chẩn đoán. Do đó, cây đang quan tâm có thể được cung cấp các chất dinh dưỡng cần thiết với lượng thích hợp khi cần bằng cách thực hiện một cách đều đặn phương pháp theo sáng chế để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng của chất dinh dưỡng cụ thể.

Ví dụ 4: Chẩn đoán tình trạng nitơ của *Eucalyptus* được trồng trong các điều kiện môi trường khác nhau bằng cách sử dụng chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng nitơ

Để kiểm chứng rằng tình trạng của chất dinh dưỡng cụ thể ở cây có thể được chẩn đoán, mà không bị ảnh hưởng bởi các áp lực khác, bằng cách sử dụng chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng thu được bằng phương pháp chọn lọc chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng theo sáng chế, các chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng nitơ của *Eucalyptus* thu được trong ví dụ 1 được sử dụng để chẩn đoán tình trạng nitơ của *Eucalyptus* thử nghiệm được trồng trong điều kiện môi trường khác với điều kiện môi trường trong ví dụ 2.

1. Trồng *Eucalyptus* thử nghiệm

6 cá thể chồi *Eucalyptus* có chiều cao trung bình khoảng 50 cm được trồng với mật độ 1 cá thể/chậu vào ngày 07/05/2009 trong các chậu, mỗi chậu chứa 10 L cát đồi núi và được trồng trong môi trường ngoài đồng ruộng trong 3 tháng. 6 cá thể này được chia thành 2 nhóm, mỗi nhóm gồm 3 cá thể. 200 g (20 g/L đất trồng) phân bón High Control (Chisso Asahi Fertilizer Co., Ltd.) được bổ sung vào nhóm A'. Đây là điều kiện dinh dưỡng giống với điều kiện dinh dưỡng dùng cho nhóm A trong ví dụ 2. Nhóm B' không được bón phân. Đây là điều kiện dinh dưỡng giống với điều kiện dinh dưỡng dùng cho nhóm C trong ví dụ 2.

2. Lấy mẫu lá, chiết sản phẩm chuyển hóa, phân tích LC-MS và chẩn đoán tình trạng nitơ

Vào tháng trồng đầu tiên và tháng trồng thứ hai, mỗi *Eucalyptus* thử nghiệm được lấy mẫu lá, chiết sản phẩm chuyển hóa, phân tích LC-MS và chẩn đoán tình trạng nitơ bằng cách sử dụng các chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng nitơ theo cách giống như trong ví dụ 2. Các chỉ thị giống như các chỉ thị trong ví dụ 2 được sử dụng làm chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng nitơ.

Sự khác biệt về điều kiện thời tiết và điều kiện đất trồng giữa ví dụ 2 và ví dụ này được thể hiện trong các bảng 3 và 4, một cách tương ứng. Ví dụ 2 và ví dụ này khác nhau về năm thực hiện thử nghiệm (2008 và 2009, một cách tương ứng). Theo dữ liệu về thời tiết ở vị trí thử nghiệm trồng *Eucalyptus* và vùng lân cận của nó, lượng mưa rất khác nhau giữa 2008 và 2009 (bảng 3). Ngoài ra, đất trồng được sử dụng trong thử nghiệm trồng trong chậu trong ví dụ 2 là đất trồng thông thường (bảng 4) và do đó có khả năng giữ nước, trong khi đất trồng được sử dụng trong thử nghiệm trồng trong chậu trong ví dụ này là cát đồi núi 100% và do đó hầu như không có khả năng giữ nước. Do đó, đất trồng được sử dụng trong ví dụ này khác ở chỗ: phần lớn bề mặt đất trồng này là khô ngay cả khi được tưới nước; và đất trồng này chứa ít chất dinh dưỡng. Theo cách này, ví dụ này và ví dụ 2 khác nhau về điều kiện thời gian, điều kiện đất trồng, điều kiện thời tiết, v.v.. Do đó, các cá thể trong cả hai ví dụ này được đặt trong các áp lực môi trường khác nhau.

Bảng 3. Lượng mưa và nhiệt độ không khí trung bình vào năm 2008 và 2009 ở thành phố Kameyama

Năm	Tháng	Lượng mưa (mm)	Nhiệt độ không khí trung bình (C)
2008	5	298	17,9
	6	359	20,9
	7	115	26,5
2009	5	153	18,6
	6	221	21,7
	7	237	25,0

(Theo Cơ quan Khí tượng Nhật Bản)

Bảng 4. Sự khác biệt về thành phần của đất trồng và lượng phân bón được bổ sung giữa ví dụ 2 và ví dụ 4

	Ví dụ 2		Ví dụ 4	
Năm thực hiện thử nghiệm	2008		2009	
Thành phần của đất trồng	Đất đồi núi	4 L	Cát đồi núi	10 L
	Rêu than bùn	3 L		
	Vermiculit	2 L		
	Venuslit	1 L		
Lượng phân bón được bổ sung	High Control	50 g	High Control	200 g

3. Kết quả

Kết quả chẩn đoán của mỗi *Eucalyptus* được trồng trong các điều kiện nêu trên được thể hiện trong Fig. 4. Các cá thể được phân loại thành 2 nhóm sau đây, là kết quả của việc phân loại dựa vào các mô hình chẩn đoán (các nhóm 1 đến 3) nêu trong ví dụ 2.

Nhóm 1 (vào cả tháng trồng đầu tiên và tháng trồng thứ hai, được xác định là có tình trạng dinh dưỡng giống với tình trạng dinh dưỡng ở dung dịch thủy canh I): 3 cá thể tương ứng với nhóm này. Tất cả các cá thể này đều từ nhóm A'. Điều kiện dinh dưỡng dùng cho nhóm A' là giống với điều kiện dinh dưỡng dùng cho nhóm A (6 trong số 7 cá thể thuộc nhóm 1) nêu trong ví dụ 2.

Nhóm 3 (vào cả tháng trồng đầu tiên và tháng trồng thứ hai, được xác định là có tình trạng dinh dưỡng giống với tình trạng dinh dưỡng ở dung dịch thủy canh II): 3 cá thể tương ứng với nhóm này. Tất cả các cá thể này đều từ nhóm B'. Điều kiện dinh dưỡng dùng cho nhóm B' là giống với điều kiện dinh dưỡng dùng cho nhóm C (tất cả 7 cá thể thuộc nhóm 3) nêu trong ví dụ 2.

Như nêu trên, tình trạng dinh dưỡng tương ứng của các cá thể *Eucalyptus* nêu trong ví dụ 2 và ví dụ này được trồng trong các điều kiện khác nhau được chẩn đoán bằng cách sử dụng cùng chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng được chọn lọc trong ví dụ 1. Khi so sánh kết quả chẩn đoán giữa chúng, cả hai nhóm cá thể này đều tạo ra kết quả chẩn đoán gần như giống nhau về tình trạng nitơ, mặc dù được trồng trong các điều kiện khác nhau, tức là được đặt trong các áp lực khác nhau. Kết quả này chứng tỏ rằng bằng cách sử dụng chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng theo sáng chế, tình trạng của chất dinh dưỡng chỉ liên quan duy nhất đến chỉ thị ở cây thử nghiệm có thể được chẩn đoán chính xác mà không bị ảnh hưởng bởi các áp lực khác

dựa vào sự khác biệt về môi trường trồng.

Ví dụ 5: Mối quan hệ giữa tình trạng sinh trưởng và kết quả chẩn đoán tình trạng nitơ thu được bằng cách sử dụng chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng nitơ của *Eucalyptus* được trồng trong các điều kiện môi trường khác nhau

Mỗi nhóm được phân loại bằng cách sử dụng các chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng nitơ về nitơ trong ví dụ 4 được thử nghiệm để kiểm chứng xem liệu mối tương quan của kết quả chẩn đoán của chúng với tình trạng sinh trưởng trong tương lai dựa vào kết quả chẩn đoán có khớp với mối tương quan đó trong ví dụ 2 và ví dụ 3 hay không.

Nhóm 1 và nhóm 3 được phân loại trong ví dụ 4 được thử nghiệm về tình trạng sinh trưởng của chúng. Kết quả được thể hiện trong Fig. 5. Cụ thể, lượng sinh trưởng trung bình vào tháng trồng thứ ba (trung bình của các giá trị được xác định bằng cách trừ chiều cao tại thời điểm trồng ra khỏi chiều cao vào tháng thứ ba) được đo cho mỗi nhóm. Kết quả là, nhóm 1 được chẩn đoán là có tình trạng nitơ thuận lợi đã sinh trưởng thêm 76 cm xét về lượng sinh trưởng trung bình và do đó thể hiện sự sinh trưởng thuận lợi trong tương lai. Mặt khác, nhóm 3 được chẩn đoán là có tình trạng nghèo nitơ vào tháng trồng đầu tiên và tháng trồng thứ hai đã sinh trưởng thêm 18 cm xét về lượng sinh trưởng trung bình và do đó được chứng tỏ là có sự sinh trưởng kém trong tương lai.

Kết quả này khớp với mối tương quan thu được của kết quả chẩn đoán cho tình trạng sinh trưởng trong tương lai dựa vào kết quả chẩn đoán trong ví dụ 2 và ví dụ 3. Cụ thể, đã chứng tỏ được rằng theo phương pháp chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng theo sáng chế, tình trạng sinh trưởng trong tương lai của các cá thể *Eucalyptus* có thể được dự đoán chính xác mà không bị ảnh hưởng bởi các áp lực, mặc dù các cây đang quan tâm được trồng trong các điều kiện môi trường khác nhau và được đặt trong các áp lực khác nhau.

Ví dụ 6: Chọn lọc chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng của *Eucalyptus* thuộc loài khác

Các chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng của *Eucalyptus deglupta* x *camaldulensis* (được gọi đơn giản dưới đây là "*Eucalyptus* thuộc loài khác" trong các ví dụ nêu dưới đây nhằm mục đích thuận tiện), là thể lai của *Eucalyptus deglupta* và

Eucalyptus camaldulensis, được chọn lọc với nitor là chất dinh dưỡng cụ thể bằng phương pháp chọn lọc chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng theo sáng chế.

1. Chuẩn bị *Eucalyptus* thuộc loài khác thiếu hụt nitor

10 cá thể *Eucalyptus* thuộc loài khác có chiều cao khoảng 30 đến 50 cm được trồng với mật độ 1 cá thể/chậu trong các chậu, mỗi chậu chứa 10 L đất trồng gồm 4 L đất đồi núi, 3 L rêu than bùn (FIBROSOIL), 2 L vermiculit (Hattori Co., Ltd.) và 1 L Venuslit (Fuyo Perlite Co., Ltd.) và được trồng trong môi trường ngoài đồng ruộng trong 1 tháng. Trong khoảng thời gian này, các cá thể được tưới hai lần mỗi ngày (sáng và tối) bằng khoảng 500 mL nước mỗi chậu. 10 cá thể này được chia thành 2 nhóm, mỗi nhóm gồm 5 cá thể. 50 g (5 g/L đất trồng) phân bón High Control (Chisso Asahi Fertilizer Co., Ltd.) được cung cấp cho nhóm A. Nhóm B không được bón phân.

2. Lấy mẫu lá, chiết sản phẩm chuyển hóa và phân tích LC-MS

Vào tháng trồng đầu tiên, mỗi *Eucalyptus* thuộc loài khác được lấy mẫu lá, chiết sản phẩm chuyển hóa và phân tích LC-MS theo cách giống như trong ví dụ 1.

3. Chọn lọc chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng của *Eucalyptus* thuộc loài khác

Các chỉ thị sinh học dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng của *Eucalyptus* thuộc loài khác được chọn lọc như sau bằng cách sử dụng GeneSpring MS (Agilent Technologies, Inc.).

(1) So sánh hai nhóm (đồ thị volcano) được thực hiện giữa 5 cá thể *Eucalyptus* thuộc loài khác được trồng trong các điều kiện dùng cho nhóm A và 5 cá thể *Eucalyptus* thuộc loài khác được trồng trong các điều kiện dùng cho nhóm B để chọn lọc, làm ứng viên chỉ thị, các sản phẩm chuyển hóa mà thể hiện lượng tích lũy khác nhau bởi hai hoặc lớn hơn hai lần hoặc bởi 1/2 hoặc nhỏ hơn 1/2 giữa hai khu vực thử nghiệm với sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ($P < 0,05$).

(2) Các sản phẩm chuyển hóa có chung trong cả nhóm chỉ thị dùng để chẩn đoán dinh dưỡng được chọn lọc trong ví dụ 1 (bảng 2: các số khối từ 1 đến 270) và các sản phẩm chuyển hóa là ứng viên chỉ thị được chọn lọc ở bước (1) nêu trên được chọn lọc làm chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng của *Eucalyptus* thuộc loài khác về nitor.

4. Kết quả

Theo phương pháp chọn lọc chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng theo sáng chế, đã phát hiện ra rằng có thể chọn lọc được 21 chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng của *Eucalyptus* thuộc loài khác từ các chỉ thị dùng để chẩn đoán dinh dưỡng được chọn lọc trong ví dụ 1 (bảng 2; các số khối 15, 31, 41, 42, 43, 51, 57, 59, 68, 84, 91, 104, 110, 111, 148, 149, 156, 241, 263, 264 và 269) thông qua quy trình chọn lọc chỉ thị như nêu trên.

Ví dụ 7: Chẩn đoán tình trạng nitơ của *Eucalyptus* thuộc loài khác bằng cách sử dụng chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng nitơ của *Eucalyptus* thuộc loài khác

Tình trạng nitơ của *Eucalyptus* thử nghiệm thuộc loài khác được chẩn đoán bằng cách sử dụng các chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng nitơ của *Eucalyptus* thuộc loài khác thu được trong ví dụ 6.

1. Trồng *Eucalyptus* thuộc loài khác

15 cá thể chồi *Eucalyptus* thuộc loài khác có chiều cao trung bình khoảng 40 cm được trồng với mật độ 1 cá thể/chậu trong các chậu, mỗi chậu chứa 10 L đất trồng gồm 4 L đất đồi núi, 3 L rêu than bùn (FIBROSOIL), 2 L vermiculit (Hattori Co., Ltd.) và 1 L Venuslit (Fuyo Perlite Co., Ltd.) và được trồng trong môi trường ngoài đồng ruộng trong 3 tháng. Trong khoảng thời gian này, chồi được tưới hai lần mỗi ngày (sáng và tối) bằng khoảng 500 mL nước mỗi chậu. 15 cá thể này được chia thành 3 nhóm, mỗi nhóm gồm 5 cá thể. 50 g (5 g/L đất trồng) phân bón High Control (Chisso Asahi Fertilizer Co., Ltd.) được bổ sung vào nhóm A. 50 g (5 g/L đất trồng) phân bón Long Max (Kuki Fertilizer Ind. Co., Ltd.) được bổ sung vào nhóm B. Nhóm C không được bón phân.

2. Lấy mẫu lá, chiết sản phẩm chuyển hóa và phân tích LC-MS

Vào tháng trồng đầu tiên và tháng trồng thứ hai, mỗi *Eucalyptus* thuộc loài khác được lấy mẫu lá, chiết sản phẩm chuyển hóa và phân tích LC-MS theo cách giống như trong ví dụ 1.

3. Chẩn đoán tình trạng nitơ bằng cách sử dụng chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng nitơ

Vào tháng trồng đầu tiên và tháng trồng thứ hai, mỗi *Eucalyptus* thuộc loài khác

được so sánh dữ liệu của các sản phẩm chuyển hóa và phân tích tình trạng nitơ của *Eucalyptus* thuộc loài khác bằng cách sử dụng GeneSpring MS theo cách giống như trong ví dụ 1. Các điều kiện phân tích là như sau:

Thuật toán tính toán: Support Vector Machines.

Hàm hạch: Polynomial Dot Product (Order I).

Mẫu thử nghiệm: 21 chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng nitơ của *Eucalyptus deglupta* x *camaldulensis* (bảng 2; các số khối 15, 31, 41, 42, 43, 51, 57, 59, 68, 84, 91, 104, 110, 111, 148, 149, 156, 241, 263, 264 và 269).

Mẫu thử nghiệm: 15 cá thể *Eucalyptus deglupta* x *camaldulensis* thử nghiệm

Mẫu hướng dẫn: *Eucalyptus globulus* được trồng thủy canh trong mỗi điều kiện dinh dưỡng trong số 3 điều kiện dinh dưỡng nêu trong ví dụ 1 (*Eucalyptus* được trồng trong môi trường thủy canh I, *Eucalyptus* được trồng trong môi trường thủy canh II và *Eucalyptus* được trồng trong môi trường thủy canh III).

4. Kết quả

Kết quả chẩn đoán được thể hiện trong Fig. 6. Các mô hình chẩn đoán được phân loại thành 3 nhóm sau đây:

Nhóm 1: Vào cả tháng trồng đầu tiên và tháng trồng thứ hai, 5 cá thể được xác định là có tình trạng nitơ giống như tình trạng nitơ ở dung dịch thủy canh I được mô tả trong ví dụ 1. Tất cả các cá thể này đều từ nhóm A, cho thấy rằng hầu hết các cá thể trong nhóm A đều duy trì được tình trạng nitơ thuận lợi vào cả tháng trồng đầu tiên và tháng trồng thứ hai.

Nhóm 2: 5 cá thể được xác định là có tình trạng nitơ giống như tình trạng nitơ ở dung dịch thủy canh I được mô tả trong ví dụ 1 vào tháng trồng đầu tiên, nhưng có tình trạng nitơ giống như tình trạng nitơ ở dung dịch thủy canh III được mô tả trong ví dụ 1 vào tháng trồng thứ hai. Tất cả các cá thể này đều từ nhóm B, cho thấy rằng tình trạng nitơ của nhóm này là thuận lợi tại thời điểm bắt đầu trồng, nhưng bị giảm từ khoảng 1 tháng trồng. Kết quả này chứng tỏ rằng lượng nitơ trong 50 g phân bón Long Max cũng không đủ để nuôi *Eucalyptus* thuộc loài khác trong 2 tháng hoặc dài hơn ở tình trạng sinh trưởng ưu tiên.

Nhóm 3: 5 cá thể tương ứng với nhóm này, được xác định là có tình trạng nitơ

giống như tình trạng nitơ ở dung dịch thủy canh III được mô tả trong ví dụ 1 vào cả tháng trồng đầu tiên và tháng trồng thứ hai. Tất cả các cá thể trong nhóm này đều có tình trạng nghèo nitơ từ thời điểm bắt đầu trồng và đều từ nhóm C. Nhóm C thiếu hụt nitơ nhưng không được bón phân và do đó được chứng tỏ là phù hợp với kết quả chẩn đoán.

Ví dụ này tạo ra kết quả tương tự với kết quả chẩn đoán của *Eucalyptus globulus* trong ví dụ 2. Kết quả này chứng tỏ rằng các chỉ thị chẩn đoán dinh dưỡng được chọn lọc trong ví dụ 1 cho phép chẩn đoán tình trạng nitơ của không chỉ *Eucalyptus globulus* mà cả *Eucalyptus* thuộc loài khác bằng các chọn lọc các chỉ thị có chung ở *Eucalyptus* thuộc loài khác và sử dụng các chỉ thị được chọn lọc trong việc chẩn đoán.

Ví dụ 8: Mối quan hệ giữa tình trạng sinh trưởng và kết quả chẩn đoán tình trạng nitơ thu được bằng cách sử dụng chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng nitơ của *Eucalyptus* thuộc loài khác

Mỗi nhóm được phân loại bằng cách sử dụng các chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng nitơ của *Eucalyptus* thuộc loài khác trong ví dụ 7 được thử nghiệm để kiểm chứng xem liệu kết quả chẩn đoán của chúng có tương quan với tình trạng sinh trưởng trong tương lai dựa vào kết quả chẩn đoán này hay không.

Kết quả được thể hiện trong Fig. 7. Cụ thể, lượng sinh trưởng trung bình vào tháng trồng thứ ba (trung bình của các giá trị được xác định bằng cách trừ chiều cao tại thời điểm trồng ra khỏi chiều cao vào tháng thứ ba) được đo cho mỗi nhóm trong số các nhóm từ 1 đến 3 được phân loại trong ví dụ 7. Kết quả là, lượng sinh trưởng trung bình được xác nhận là từ cao nhất đến thấp nhất ở các nhóm 1, 2 và 3 theo thứ tự này. Cụ thể, nhóm 1 được chẩn đoán trong ví dụ 7 là có tình trạng nitơ thuận lợi đã sinh trưởng thêm 50 cm xét về lượng sinh trưởng trung bình và do đó thể hiện sự sinh trưởng trong tương lai thuận lợi nhất. Ngoài ra, nhóm 2 được chẩn đoán trong ví dụ 7 là có tình trạng nitơ giảm từ khoảng 1 tháng trồng đã sinh trưởng thêm 40 cm xét về lượng sinh trưởng trung bình và do đó kém hơn đôi chút về sự sinh trưởng trong tương lai so với nhóm 1. Mặt khác, nhóm 3 được chẩn đoán trong ví dụ 7 là có tình trạng nghèo nitơ đã sinh trưởng thêm 20 cm xét về lượng sinh trưởng trung bình và do đó được chứng tỏ là có sự sinh trưởng trong tương lai kém nhất.

Kết quả này cho thấy rằng kết quả chẩn đoán thu được bằng cách sử dụng các chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng nitơ được chọn lọc cho *Eucalyptus* thuộc loài khác trong ví dụ 6 tương quan với sự sinh trưởng trong tương lai, và chúng tỏ rằng tình trạng sinh trưởng trong tương lai của cây có thể được dự đoán bằng cách sử dụng các chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng nitơ được chọn lọc cho *Eucalyptus* thuộc loài khác.

Ví dụ 9: Chọn lọc chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng cho các loài cây khác

Các chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng cho các loài cây không phải là chi *Eucalyptus* được chọn lọc với nitơ là chất dinh dưỡng cụ thể bằng phương pháp chọn lọc theo sáng chế.

1. Chuẩn bị cây thiếu hụt nitơ

Zea mays, *Solanum melongena*, *Solanum lycopersicum* và *Oryza sativa* được sử dụng làm loài cây không phải là *Eucalyptus*.

10 cá thể cây *Zea mays*, *Solanum melongena* hoặc *Solanum lycopersicum* có chiều cao khoảng 15 cm được trồng với mật độ 1 cá thể của mỗi loài cây/chậu trong các chậu, mỗi chậu chứa 10 L đất trồng gồm 4 L đất đồi núi, 3 L rêu than bùn (FIBROSOIL), 2 L vermiculit (Hattori Co., Ltd.) và 1 L Venuslit (Fuyo Perlite Co., Ltd.) và được trồng trong môi trường ngoài đồng ruộng. Trong khoảng thời gian này, các cá thể được tưới hai lần mỗi ngày (sáng và tối) bằng khoảng 500 mL nước mỗi chậu. 10 cá thể này được chia thành 2 nhóm, mỗi nhóm gồm 5 cá thể. 50 g (5 g/L đất trồng) phân bón High Control (Chisso Asahi Fertilizer Co., Ltd.) được cung cấp cho nhóm A. Nhóm B không được bón phân.

Theo cách khác, 10 cá thể chồi *Oryza sativa* có chiều cao khoảng 10 cm được trồng với mật độ 1 cá thể/chậu trong các chậu, mỗi chậu chứa 10 L đất trồng gồm 8 L andosol (Hattori Co., Ltd.), 2 L đất trồng Akadama (Hattori Co., Ltd.) và 5 g phân bón High Control và được trồng trong môi trường ngoài đồng ruộng trong 1 tháng. 10 cá thể này được chia thành 2 nhóm, mỗi nhóm gồm 5 cá thể. 200 g (20,5 g/L đất trồng) phân bón High Control được cung cấp cho nhóm A. Nhóm B chỉ được bón phân bằng phân bón đã chứa từ đầu trong đất trồng (phân bón ban đầu: 0,5 g/L đất trồng).

2. Lấy mẫu lá, chiết sản phẩm chuyển hóa và phân tích LC-MS

Mỗi cá thể cây *Solanum melongena*, *Solanum lycopersicum* hoặc *Zea mays* vào tuần trồng thứ hai và mỗi cá thể cây *Oryza sativa* vào tuần trồng thứ tư được lấy mẫu lá, chiết sản phẩm chuyển hóa và phân tích LC-MS theo cách giống như trong ví dụ 1.

3. Chọn lọc chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng cho các loài cây khác

Các chỉ thị sinh học dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng được chọn lọc cho mỗi loài cây (*Zea mays*, *Solanum melongena*, *Solanum lycopersicum* và *Oryza sativa*) bằng cách sử dụng GeneSpring MS (Agilent Technologies, Inc.).

(1) So sánh hai nhóm (đồ thị volcano) được thực hiện giữa 5 cá thể cây mỗi loài được trồng trong các điều kiện dùng cho nhóm A và 5 cá thể cây mỗi loài được trồng trong các điều kiện dùng cho nhóm B để chọn lọc, làm ứng viên chỉ thị, các sản phẩm chuyển hóa mà thể hiện lượng tích lũy khác nhau bởi hai hoặc lớn hơn hai lần hoặc bởi 1/2 hoặc nhỏ hơn 1/2 giữa hai khu vực thử nghiệm với sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ($P < 0,05$).

(2) Các sản phẩm chuyển hóa có chung trong cả nhóm chỉ thị dùng để chẩn đoán dinh dưỡng được chọn lọc trong ví dụ 1 (bảng 2: các số khối từ 1 đến 270) và các sản phẩm chuyển hóa là ứng viên chỉ thị được chọn lọc ở bước (1) nêu trên được chọn lọc làm chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng cho mỗi loài cây về nitơ.

4. Kết quả

Các chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng thu được bằng phương pháp chọn lọc chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng theo sáng chế được thể hiện dưới đây đối với mỗi loài cây về nitơ:

5 chỉ thị đối với *Solanum melongena* (bảng 2; các số khối 104, 144, 242, 257 và 265)

3 chỉ thị đối với *Solanum lycopersicum* (bảng 2; các số khối 43, 246 và 265)

24 chỉ thị đối với *Zea mays* (bảng 2; các số khối 7, 17, 22, 29, 30, 35, 37, 48, 60, 65, 72, 76, 77, 88, 89, 92, 106, 140, 142, 148, 153, 154, 242 và 257)

3 chỉ thị đối với *Oryza sativa* (các số khối 5, 170 và 173)

Theo phương pháp chọn lọc chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng

theo sáng chế, đã phát hiện ra rằng có thể chọn lọc được các chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng cho nhiều loài cây khác nhau từ các chỉ thị dùng để chẩn đoán dinh dưỡng được chọn lọc trong ví dụ 1, bất kể chi hoặc họ và bất kể là cây một lá mầm hay cây hai lá mầm, như ở chi *Eucalyptus* (họ *Myrtaceae*) cũng như họ *Poaceae* (*Zea mays* và *Oryza sativa*) và *Solanaceae* (*Solanum melongena* và *Solanum lycopersicum*).

Ví dụ 10: Chẩn đoán tình trạng nitơ của các loài cây khác nhau bằng cách sử dụng chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng nitơ cho các loài cây khác nhau

Các chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng nitơ của mỗi loài cây thu được trong ví dụ 9 được sử dụng để chẩn đoán tình trạng nitơ của các cá thể làm mẫu thử nghiệm.

1. Trồng cây thử nghiệm

15 cá thể chồi của mỗi loài cây (*Solanum melongena*, *Solanum lycopersicum* hoặc *Zea mays*) có chiều cao trung bình khoảng 15 cm được trồng với mật độ 1 cá thể/chậu trong các chậu, mỗi chậu chứa 10 L đất trồng gồm 4 L đất đồi núi, 3 L rêu than bùn (FIBROSOIL), 2 L vermiculit (Hattori Co., Ltd.) và 1 L Venuslit (Fuyo Perlite Co., Ltd.) và được trồng trong môi trường ngoài đồng ruộng trong 1 tháng. Trong khoảng thời gian này, các cá thể được tưới hai lần mỗi ngày (sáng và tối) bằng khoảng 500 mL nước mỗi chậu. 15 cá thể này được chia thành 3 nhóm, mỗi nhóm gồm 5 cá thể. 50 g (5 g/L đất trồng) phân bón High Control (Chisso Asahi Fertilizer Co., Ltd.) được bổ sung vào nhóm A. 50 g (5 g/L đất trồng) phân bón Long Max (Kuki Fertilizer Ind. Co., Ltd.) được bổ sung vào nhóm B. Nhóm C không được bón phân.

Theo cách khác, 10 cá thể chồi *Oryza sativa* có chiều cao khoảng 10 cm được trồng với mật độ 1 cá thể/chậu trong các chậu, mỗi chậu chứa 10 L đất trồng gồm 8 L andosol (Hattori Co., Ltd.), 2 L đất trồng Akadama (Hattori Co., Ltd.) và 5 g phân bón High Control và được trồng trong môi trường ngoài đồng ruộng trong 1 tháng. 10 cá thể này được chia thành 2 nhóm, mỗi nhóm gồm 5 cá thể. 200 g (20,5 g/L đất trồng) phân bón High Control được cung cấp cho nhóm A. Nhóm B chỉ được bón phân bằng phân bón đã chứa từ đầu trong đất trồng (phân bón ban đầu: 0,5 g/L đất trồng).

2. Lấy mẫu lá, chiết sản phẩm chuyển hóa và phân tích LC-MS

Vào tuần trồng thứ hai, mỗi cá thể cây được lấy mẫu lá, chiết sản phẩm chuyển

hóa và phân tích LC-MS theo cách giống như trong ví dụ 1.

3. Chẩn đoán tình trạng nitơ bằng cách sử dụng chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng nitơ

Vào tuần trồng thứ hai, mỗi cá thể cây thử nghiệm được so sánh dữ liệu của các sản phẩm chuyển hóa và phân tích *Eucalyptus* thử nghiệm bằng cách sử dụng GeneSpring MS theo cách giống như trong ví dụ 1. Tuy nhiên, chỉ có *Oryza sativa* được phân tích vào tuần trồng thứ hai và tuần trồng thứ tư.

Các điều kiện phân tích là như sau:

Thuật toán tính toán: Support Vector Machines.

Hàm hạch: Polynomial Dot Product (Order I).

Tập hợp chỉ thị: các chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng nitơ cho mỗi loài cây.

Các chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng nitơ của *Solanum melongena*: các số khối 104, 144, 242, 257 và 265 trong bảng 2.

Các chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng nitơ của *Solanum lycopersicum*: các số khối 43, 246 và 265 trong bảng 2.

Các chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng nitơ của *Zea mays*: các số khối 7, 17, 22, 29, 30, 35, 37, 48, 60, 65, 72, 76, 77, 88, 89, 92, 106, 140, 142, 148, 153, 154, 242 và 257 trong bảng 2.

Các chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng nitơ của *Oryza sativa*: các số khối 5, 170 và 173 trong bảng 2.

Mẫu thử nghiệm: 15 cá thể cây thử nghiệm đối với mỗi loài (*Solanum melongena*, *Solanum lycopersicum*, *Zea mays* và *Oryza sativa*).

Kiểu bón phân

Solanum melongena, *Solanum lycopersicum* và *Zea mays*:

A. Phân bón High Control (5 g/L đất trồng)

B. Phân bón Long Max (5 g/L đất trồng)

C. Không được bón phân

Oryza sativa:

A. Phân bón High Control (20 g/L đất trồng)

B. Phân bón High Control (5 g/L đất trồng)

C. Phân bón ban đầu (0,5 g/L)

Mẫu hướng dẫn: *Eucalyptus globulus* được trồng thủy canh trong mỗi điều kiện dinh dưỡng trong số 3 điều kiện dinh dưỡng nêu trong ví dụ 1 (*Eucalyptus* được trồng trong môi trường thủy canh I, *Eucalyptus* được trồng trong môi trường thủy canh II và *Eucalyptus* được trồng trong môi trường thủy canh III).

4. Kết quả

Cho mỗi loài cây, việc chẩn đoán dinh dưỡng được thực hiện vào tuần trồng thứ hai. Chỉ đối với *Oryza sativa*, việc chẩn đoán dinh dưỡng được thực hiện vào tuần trồng thứ hai và tuần trồng thứ tư.

Solanum melongena

Kết quả được thể hiện trong Fig. 8.

Kiểu bón phân A và B: Vào tuần trồng thứ hai, 10 trong số tổng 10 cá thể được xác định là có tình trạng dinh dưỡng giống với tình trạng nitơ ở dung dịch thủy canh I. Điều này cho thấy rằng các cá thể trong các phương pháp bón phân này đều duy trì được tình trạng nitơ thuận lợi vào tuần trồng thứ hai.

Kiểu bón phân C: 5 trong số tổng 5 cá thể được xác định là có tình trạng dinh dưỡng giống với tình trạng nitơ ở dung dịch thủy canh III. Điều này cho thấy rằng 5 cá thể này có tình trạng nitơ không đủ. Điều này phù hợp với kết quả từ nhóm không được bón phân.

Solanum lycopersicum

Kết quả được thể hiện trong Fig. 9.

Kiểu bón phân A và B: Vào tuần trồng thứ hai, 8 trong số tổng 10 cá thể được xác định là có tình trạng dinh dưỡng giống với tình trạng nitơ ở dung dịch thủy canh I. Điều này cho thấy rằng hầu hết các cá thể được sử dụng trong các phương pháp bón phân này đều duy trì được tình trạng nitơ thuận lợi vào tuần trồng thứ hai.

Kiểu bón phân C: 5 trong số tổng 5 cá thể được xác định là có tình trạng dinh dưỡng giống với tình trạng nitơ ở dung dịch thủy canh III. Điều này cho thấy rằng 5 cá

thể này có tình trạng nitơ không đủ. Điều này phù hợp với kết quả từ nhóm không được bón phân.

Zeamays

Kết quả được thể hiện trong Fig. 10.

Kiểu bón phân A và B: Vào tuần trồng thứ hai, 9 trong số tổng 10 cá thể được xác định là có tình trạng dinh dưỡng giống với tình trạng nitơ ở dung dịch thủy canh I. Điều này cho thấy rằng hầu hết các cá thể được sử dụng trong các phương pháp bón phân này đều duy trì được tình trạng nitơ thuận lợi vào tuần trồng thứ hai.

Kiểu bón phân C: 5 trong số tổng 5 cá thể được xác định là có tình trạng dinh dưỡng giống với tình trạng nitơ ở dung dịch thủy canh III. Điều này cho thấy rằng 5 cá thể này có tình trạng nitơ không đủ. Điều này phù hợp với kết quả từ nhóm không được bón phân.

Oryza sativa

Kết quả được thể hiện trong Fig. 11.

Kiểu bón phân A và B: Vào cả tuần trồng thứ hai và tuần trồng thứ tư, 10 trong số tổng 10 cá thể được xác định là có tình trạng dinh dưỡng giống với tình trạng nitơ ở dung dịch thủy canh I. Điều này cho thấy rằng 10 cá thể này đều duy trì được tình trạng nitơ thuận lợi vào cả tuần trồng thứ hai và tuần trồng thứ tư.

Kiểu bón phân C: Vào tuần trồng thứ hai, 4 trong số tổng 5 cá thể được xác định là có tình trạng dinh dưỡng giống với tình trạng nitơ ở dung dịch thủy canh I. Do đó, hầu hết các cá thể được xác định là duy trì được tình trạng dinh dưỡng thuận lợi vào tuần trồng thứ hai. Vào tuần trồng thứ tư, 4 trong số tổng 5 cá thể được xác định là có tình trạng dinh dưỡng giống với tình trạng nitơ ở dung dịch thủy canh III. Điều này cho thấy rằng tình trạng nitơ của kiểu bón phân 3 được xác định là thuận lợi vào tuần trồng thứ hai nhờ phân bón ban đầu (0,5 g/L đất trồng) đã chứa từ đầu trong đất trồng, nhưng giảm vào tuần trồng thứ tư. Kết quả này chứng tỏ rằng phân bón ban đầu (0,5 g/L đất trồng) không được ưu tiên để nuôi *Oryza sativa* một cách thuận lợi trong 4 tuần.

Kết quả của ví dụ này chứng tỏ rằng các chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng nitơ theo sáng chế được chọn lọc trong ví dụ 1 có thể ứng dụng được không chỉ cho

chi *Eucalyptus* mà còn cho các loài cây khác, và tình trạng dinh dưỡng có thể được chẩn đoán bằng cách sử dụng các chỉ thị này.

Ví dụ 11: Mối quan hệ giữa tình trạng sinh trưởng và kết quả chẩn đoán tình trạng nitơ thu được bằng cách sử dụng chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng nitơ cho các loài cây khác nhau

Mỗi nhóm được chẩn đoán bằng cách sử dụng các chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng nitơ cho các loài cây khác nhau trong ví dụ 10 được thử nghiệm để kiểm chứng xem liệu kết quả chẩn đoán của chúng có tương quan với tình trạng sinh trưởng trong tương lai dựa vào kết quả chẩn đoán này hay không.

Solanum melongena

Kết quả được thể hiện trong Fig. 12. Vào tháng trồng đầu tiên, 10 cá thể được chẩn đoán là có tình trạng nitơ giống như tình trạng nitơ ở dung dịch thủy canh I được xác nhận là sinh trưởng thêm 26,4 cm xét về lượng sinh trưởng trung bình. Mặt khác, 5 cá thể được chẩn đoán là có tình trạng nitơ giống như tình trạng nitơ ở dung dịch thủy canh III đã sinh trưởng thêm 16,6 cm xét về lượng sinh trưởng trung bình. Sự khác biệt đáng kể được xác nhận với mức 1% hoặc nhỏ hơn giữa chúng.

Solanum lycopersicum

Kết quả được thể hiện trong Fig. 13. Vào tháng trồng đầu tiên, 8 cá thể được chẩn đoán là có tình trạng nitơ giống như tình trạng nitơ ở dung dịch thủy canh I được xác nhận là sinh trưởng thêm 40,5 cm xét về lượng sinh trưởng trung bình. Mặt khác, 7 cá thể được chẩn đoán là có tình trạng nitơ giống như tình trạng nitơ ở dung dịch thủy canh III đã sinh trưởng thêm 26,4 cm xét về lượng sinh trưởng trung bình. Sự khác biệt đáng kể được xác nhận với mức 1% hoặc nhỏ hơn giữa chúng.

Zeamays

Kết quả được thể hiện trong Fig. 14. Vào tháng trồng đầu tiên, 9 cá thể được chẩn đoán là có tình trạng nitơ giống như tình trạng nitơ ở dung dịch thủy canh I được xác nhận là sinh trưởng thêm 30,7 cm xét về lượng sinh trưởng trung bình. Mặt khác, 6 cá thể được chẩn đoán là có tình trạng nitơ giống như tình trạng nitơ ở dung dịch thủy canh III đã sinh trưởng thêm 11,3 cm xét về lượng sinh trưởng trung bình. Sự khác biệt đáng kể được xác nhận với mức 1% hoặc nhỏ hơn giữa chúng.

Oryza sativa

Kết quả được thể hiện trong Fig. 15. Vào tuần trồng thứ sáu, 10 cá thể được chẩn đoán là có tình trạng nitơ giống như tình trạng nitơ ở dung dịch thủy canh I vào cả tuần trồng thứ hai và tuần trồng thứ tư được xác nhận là sinh trưởng thêm 48,9 cm xét về lượng sinh trưởng trung bình. Mặt khác, 4 cá thể được chẩn đoán là có tình trạng nitơ giống như tình trạng nitơ ở dung dịch thủy canh I vào tuần trồng thứ hai và giống như tình trạng nitơ ở dung dịch thủy canh III vào tuần trồng thứ tư đã sinh trưởng thêm 22 cm xét về lượng sinh trưởng trung bình. Sự khác biệt đáng kể được xác nhận với mức 1% hoặc nhỏ hơn giữa chúng.

Kết quả của ví dụ này chứng tỏ rằng tình trạng sinh trưởng trong tương lai của nhiều cây khác nhau có thể được dự đoán, bất kể loài và bất kể là cây một lá mầm hay cây hai lá mầm, bằng cách sử dụng chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng nitơ cho các loài cây khác được chọn lọc trong ví dụ 9.

Tất cả các công bố đơn yêu cầu cấp patent, các patent và các đơn yêu cầu cấp patent được trích dẫn theo sáng chế được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn đến toàn bộ nội dung của các tài liệu này.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp chọn lọc chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng của cây, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

bước chiết bao gồm việc chiết chất chiết chứa sản phẩm chuyển hóa từ toàn bộ hoặc một phần của cây thiếu hụt chất dinh dưỡng cụ thể và cây được cung cấp chất dinh dưỡng này; và

bước chọn lọc bao gồm việc so sánh giữa các cây này lượng tích lũy của mỗi sản phẩm chuyển hóa thu được bằng cách loại bỏ sản phẩm chuyển hóa sơ cấp ra khỏi sản phẩm chuyển hóa thu được ở bước chiết để chọn lọc sản phẩm chuyển hóa được xác nhận là có sự khác biệt về lượng có ý nghĩa về mặt thống kê giữa chúng làm chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng mà tình trạng của chất dinh dưỡng cụ thể được chẩn đoán bằng chỉ thị này.

2. Phương pháp chọn lọc theo điểm 1, trong đó tình trạng thiếu hụt chất dinh dưỡng cụ thể là tình trạng mà trong đó chất dinh dưỡng cụ thể này bị cạn kiệt.

3. Phương pháp chọn lọc chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng của cây, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

bước chiết thứ nhất bao gồm việc chiết chất chiết chứa sản phẩm chuyển hóa từ toàn bộ hoặc một phần của cây thiếu hụt chất dinh dưỡng cụ thể và cây được cung cấp chất dinh dưỡng này;

bước chọn lọc thứ nhất bao gồm việc so sánh giữa các cây này lượng tích lũy của mỗi sản phẩm chuyển hóa thu được bằng cách loại bỏ sản phẩm chuyển hóa sơ cấp ra khỏi sản phẩm chuyển hóa ở bước chiết thứ nhất để chọn lọc sản phẩm chuyển hóa được xác nhận là có sự khác biệt về lượng có ý nghĩa về mặt thống kê giữa chúng làm ứng viên chỉ thị thứ nhất;

bước chiết thứ hai bao gồm việc chiết chất chiết chứa sản phẩm chuyển hóa từ toàn bộ hoặc một phần của cây được cung cấp chất dinh dưỡng cụ thể với lượng mà khác với lượng khiến cây bị thiếu hụt chất dinh dưỡng này ở bước chiết thứ nhất;

bước chọn lọc thứ hai bao gồm việc so sánh lượng tích lũy của sản phẩm chuyển hóa thu được bằng cách loại bỏ ít nhất một sản phẩm chuyển hóa sơ cấp ra khỏi sản phẩm chuyển hóa thu được ở bước chiết thứ nhất và lượng tích lũy của sản

phẩm chuyển hóa thu được bằng cách loại bỏ sản phẩm chuyển hóa sơ cấp ra khỏi sản phẩm chuyển hóa thu được ở bước chiết thứ hai để chọn lọc sản phẩm chuyển hóa được xác nhận là có sự khác biệt về lượng có ý nghĩa về mặt thống kê giữa chúng làm ứng viên chỉ thị thứ hai; và

bước chọn lọc thứ ba bao gồm việc chọn lọc sản phẩm chuyển hóa có chung trong cả nhóm ứng viên gồm các ứng viên chỉ thị thứ nhất và nhóm ứng viên gồm các ứng viên chỉ thị thứ hai làm chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng mà tình trạng của chất dinh dưỡng cụ thể được chẩn đoán bằng chỉ thị này.

4. Phương pháp chọn lọc theo điểm 3, trong đó tình trạng thiếu hụt chất dinh dưỡng cụ thể ở bước chiết thứ nhất là tình trạng mà trong đó chất dinh dưỡng cụ thể này bị cạn kiệt.

5. Phương pháp chọn lọc theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó sự khác biệt về lượng có ý nghĩa về mặt thống kê là lớn hơn hoặc bằng 1,3 lần.

6. Phương pháp chọn lọc theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó việc so sánh lượng tích lũy của mỗi sản phẩm chuyển hóa được thực hiện bằng cách sử dụng kỹ thuật khối phổ.

7. Phương pháp chọn lọc theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó bước xử lý thống kê được thực hiện bằng cách sử dụng kiểm định so sánh nhiều nhóm.

8. Phương pháp chọn lọc theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, trong đó chất dinh dưỡng cụ thể là nitơ (N), phospho (P), kali (K), bo (B) hoặc tổ hợp của chúng.

9. Phương pháp chọn lọc theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8, trong đó sản phẩm chuyển hóa là protein và/hoặc hợp chất có phân tử lượng thấp.

10. Chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng nitơ của cây, trong đó chỉ thị này là chỉ thị bất kỳ được nêu trong bảng 2, trong kỹ thuật phân tích LC-MS sử dụng cột có kích thước là 4,6 x 250 mm và đường kính hạt là 5µm.

11. Chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng nitơ theo điểm 10, trong đó cây là *Eucalyptus globulus*, và chỉ thị này được thể hiện bởi số khối bất kỳ trong số các số khối từ 1 đến 270 được nêu trong bảng 2.

12. Chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng nitơ theo điểm 10, trong đó cây là *Eucalyptus deglupta* × *camaldulensis*, và chỉ thị này được thể hiện bởi số khối bất kỳ trong số các

số khối 15, 31, 41, 42, 43, 51, 57, 59, 68, 84, 91, 104, 110, 111, 148, 149, 156, 241, 263, 264 và 269 trong bảng 2.

13. Chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng nitơ theo điểm 10, trong đó cây là *Oryza sativa*, và chỉ thị này được thể hiện bởi số khối bất kỳ trong số các số khối 5, 170 và 173 trong bảng 2.

14. Chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng nitơ theo điểm 10, trong đó cây là *Zea mays*, và chỉ thị này được thể hiện bởi số khối bất kỳ trong số các số khối 7, 17, 22, 29, 30, 35, 37, 48, 60, 65, 72, 76, 77, 88, 89, 92, 106, 140, 142, 148, 153, 154, 242 và 257 trong bảng 2.

15. Chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng nitơ theo điểm 10, trong đó cây là *Solanum lycopersicum*, và chỉ thị này được thể hiện bởi số khối bất kỳ trong số các số khối 43, 246 và 265 trong bảng 2.

16. Chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng nitơ theo điểm 10, trong đó cây là *Solanum melongena*, và chỉ thị này được thể hiện bởi số khối bất kỳ trong số các số khối 104, 144, 242, 257 và 265 trong bảng 2.

17. Phương pháp chẩn đoán tình trạng của chất dinh dưỡng cụ thể ở cây, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

bước chiết sản phẩm chuyển hóa bao gồm việc chiết chất chiết chứa sản phẩm chuyển hóa từ toàn bộ hoặc một phần của cây thử nghiệm; và

bước xác định bao gồm việc so sánh lượng tích lũy của chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng chứa trong chất chiết thu được ở bước chiết sản phẩm chuyển hóa với lượng tích lũy ở cây đối chứng được cung cấp chất dinh dưỡng này để xác định tình trạng không đủ hoặc đủ của chất dinh dưỡng ở cây thử nghiệm dựa vào trạng thái và mức độ khác biệt giữa chúng, chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng này được chọn lọc liên quan đến chất dinh dưỡng cụ thể bằng phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9.

18. Phương pháp theo điểm 17, trong đó chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng có tính chất mà nhờ đó lượng tích lũy của nó tăng khi lượng chất dinh dưỡng cụ thể tăng, và chất dinh dưỡng ở cây thử nghiệm được xác định là có xu hướng không đủ nếu lượng tích lũy của chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng ở cây thử

nghiệm nhỏ hơn lượng tích lũy ở cây đối chứng.

19. Phương pháp theo điểm 17, trong đó chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng có tính chất mà nhờ đó lượng tích lũy của nó giảm khi lượng chất dinh dưỡng cụ thể tăng, và chất dinh dưỡng ở cây thử nghiệm được xác định là có xu hướng không đủ nếu lượng tích lũy của chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng ở cây thử nghiệm lớn hơn lượng tích lũy ở cây đối chứng.

20. Phương pháp chẩn đoán theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 17 đến 19, trong đó sản phẩm chuyển hóa là protein và/hoặc hợp chất có phân tử lượng thấp.

21. Phương pháp chẩn đoán theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 17 đến 20, trong đó chất dinh dưỡng cụ thể là nitơ (N), phospho (P), kali (K), bo (B) hoặc tổ hợp của chúng.

22. Phương pháp chẩn đoán theo điểm 21, trong đó chất dinh dưỡng cụ thể là nitơ, và chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng của cây được nêu trong bảng 2, trong kỹ thuật phân tích LC-MS sử dụng cột có kích thước là 4,6 x 250 mm và đường kính hạt là 5µm.

23. Phương pháp chẩn đoán theo điểm 22, trong đó cây là *Eucalyptus globulus*, và chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng được thể hiện bởi số khối bất kỳ trong số các số khối từ 1 đến 270 được nêu trong bảng 2.

24. Phương pháp chẩn đoán theo điểm 22, trong đó cây là *Eucalyptus deglupta* × *camaldulensis*, và chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng được thể hiện bởi số khối bất kỳ trong số các số khối 15, 31, 41, 42, 43, 51, 57, 59, 68, 84, 91, 104, 110, 111, 148, 149, 156, 241, 263, 264 và 269 trong bảng 2.

25. Phương pháp chẩn đoán theo điểm 22, trong đó cây là *Oryza sativa*, và chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng được thể hiện bởi số khối bất kỳ trong số các số khối 5, 170 và 173 trong bảng 2.

26. Phương pháp chẩn đoán theo điểm 22, trong đó cây là *Zea mays*, và chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng được thể hiện bởi số khối bất kỳ trong số các số khối 7, 17, 22, 29, 30, 35, 37, 48, 60, 65, 72, 76, 77, 88, 89, 92, 106, 140, 148, 142, 153, 154, 242 và 257 trong bảng 2.

27. Phương pháp chẩn đoán theo điểm 22, trong đó cây là *Solanum lycopersicum*, và

chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng được thể hiện bởi số khối bất kỳ trong số các số khối 43, 246 và 265 trong bảng 2.

28. Phương pháp chẩn đoán theo điểm 22, trong đó cây là *Solanum melongena*, và chỉ thị dùng để chẩn đoán tình trạng dinh dưỡng được thể hiện bởi số khối bất kỳ trong số các số khối 104, 144, 242, 257 và 265 trong bảng 2.

29. Phương pháp xác định lượng chất dinh dưỡng cụ thể được cung cấp, trong đó phương pháp này bao gồm việc xác định lượng chất dinh dưỡng cụ thể được cung cấp cho cây dựa vào kết quả chẩn đoán thu được bằng phương pháp chẩn đoán tình trạng của chất dinh dưỡng cụ thể ở cây theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 17 đến 28.

30. Phương pháp theo điểm 29, trong đó lượng chất dinh dưỡng cụ thể được cung cấp cho cây:

được tăng tới mức cao hơn lượng chất dinh dưỡng cụ thể được cung cấp ngay trước khi chẩn đoán nếu kết quả chẩn đoán thu được cho thấy rằng lượng chất dinh dưỡng cụ thể này có xu hướng là không đủ, hoặc

được giữ ở mức bằng lượng chất dinh dưỡng cụ thể được cung cấp ngay trước khi chẩn đoán nếu kết quả chẩn đoán thu được cho thấy rằng lượng chất dinh dưỡng cụ thể này là đủ.

31. Phương pháp xác định tình trạng sinh trưởng của cây, trong đó phương pháp này bao gồm việc xác định tình trạng sinh trưởng của cây dựa vào hai hoặc nhiều hơn hai kết quả chẩn đoán theo thời gian về tình trạng của chất dinh dưỡng cụ thể ở một cây thu được bằng phương pháp chẩn đoán theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 17 đến 20.

32. Phương pháp xác định theo điểm 31, trong đó tình trạng sinh trưởng của cây:

được xác định là thuận lợi nếu hai hoặc nhiều hơn hai kết quả chẩn đoán theo thời gian về chất dinh dưỡng cụ thể cho thấy rằng tình trạng của chất dinh dưỡng cụ thể này là đủ tại tất cả các thời điểm;

được xác định là có xu hướng cải thiện nếu hai hoặc nhiều hơn hai kết quả chẩn đoán theo thời gian về chất dinh dưỡng cụ thể cho thấy rằng tình trạng của chất dinh dưỡng cụ thể này thay đổi từ không đủ thành đủ;

được xác định là có xu hướng giảm nếu hai hoặc nhiều hơn hai kết quả chẩn

đoán theo thời gian về chất dinh dưỡng cụ thể cho thấy rằng tình trạng của chất dinh dưỡng cụ thể này thay đổi từ đủ thành không đủ; hoặc

được xác định là kém nếu hai hoặc nhiều hơn hai kết quả chẩn đoán theo thời gian về chất dinh dưỡng cụ thể cho thấy rằng tình trạng của chất dinh dưỡng cụ thể này là không đủ tại tất cả các thời điểm.

33. Phương pháp xác định lượng chất dinh dưỡng cụ thể được cung cấp, trong đó phương pháp này bao gồm việc xác định lượng chất dinh dưỡng cụ thể được cung cấp cho cây dựa vào kết quả xác định thu được bằng phương pháp xác định tình trạng sinh trưởng của cây theo điểm 31 hoặc 32.

34. Phương pháp theo điểm 33, trong đó lượng chất dinh dưỡng cụ thể được cung cấp cho cây:

được giữ ở mức bằng lượng chất dinh dưỡng cụ thể được cung cấp ngay trước bước chẩn đoán bất kỳ được thực hiện để xác định tình trạng sinh trưởng nếu kết quả xác định thu được từ hai hoặc nhiều hơn hai kết quả chẩn đoán theo thời gian về chất dinh dưỡng cụ thể cho thấy rằng tình trạng sinh trưởng của cây là thuận lợi,

được giữ ở mức bằng lượng chất dinh dưỡng cụ thể được cung cấp ngay trước bước chẩn đoán cuối cùng được thực hiện để xác định tình trạng sinh trưởng nếu kết quả xác định thu được cho thấy rằng tình trạng sinh trưởng của cây có xu hướng cải thiện,

được quay trở lại hoặc được tăng tới mức bằng lượng chất dinh dưỡng cụ thể được cung cấp ngay trước bước chẩn đoán thứ nhất được thực hiện để xác định tình trạng sinh trưởng nếu kết quả xác định thu được cho thấy rằng tình trạng sinh trưởng của cây có xu hướng giảm, hoặc

được tăng tới mức cao hơn lượng chất dinh dưỡng cụ thể được cung cấp ở bước chẩn đoán được thực hiện để xác định tình trạng sinh trưởng nếu kết quả xác định thu được cho thấy rằng tình trạng sinh trưởng của cây là kém.

Fig. 1

Nhóm mô hình chăn đốn	1	2	3
Chăn đốn (vào tháng thứ 1)	Dung dịch thủy canh I	Dung dịch thủy canh I	Dung dịch thủy canh II
Chăn đốn (vào tháng thứ 2)	Dung dịch thủy canh I	Dung dịch thủy canh II	Dung dịch thủy canh II
Số lượng cá thể có thể sử dụng	6	8	7
Nhóm mà các cá thể bắt nguồn từ đó	tất cả đều từ A	A:B=1:7	tất cả đều từ C

Fig. 2

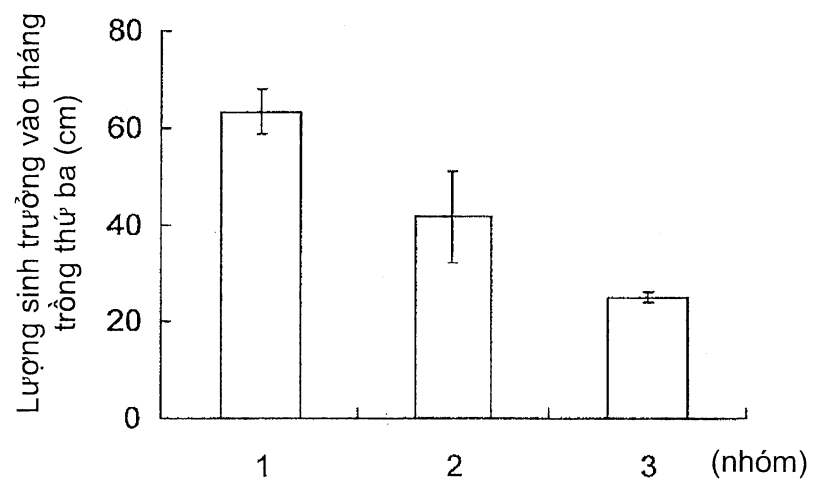
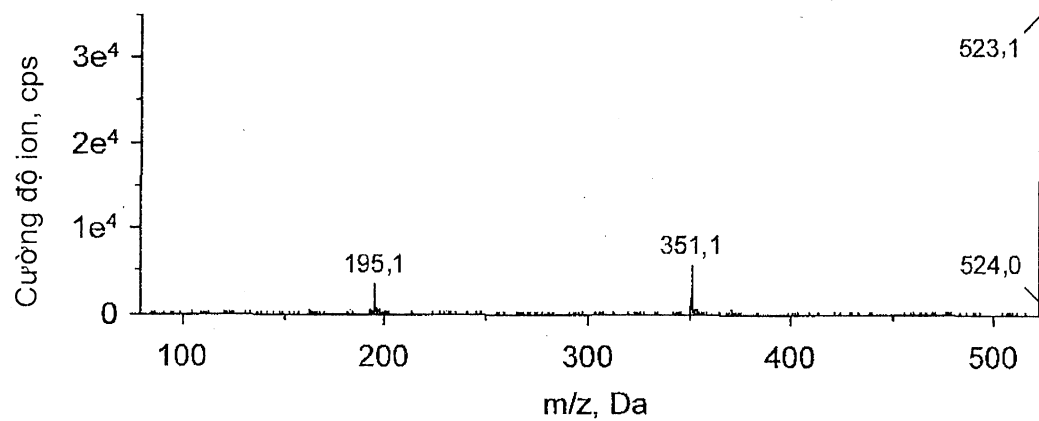


Fig. 3a

Số khối 29

+MSMS là 523,4 (thu được 422,4)



Số khối 46

+MSMS là 537,4 (thu được 436,4)

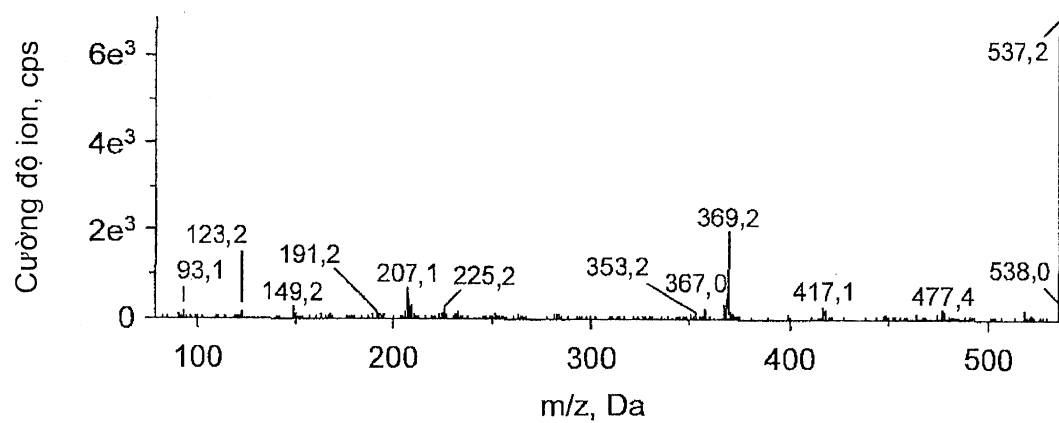
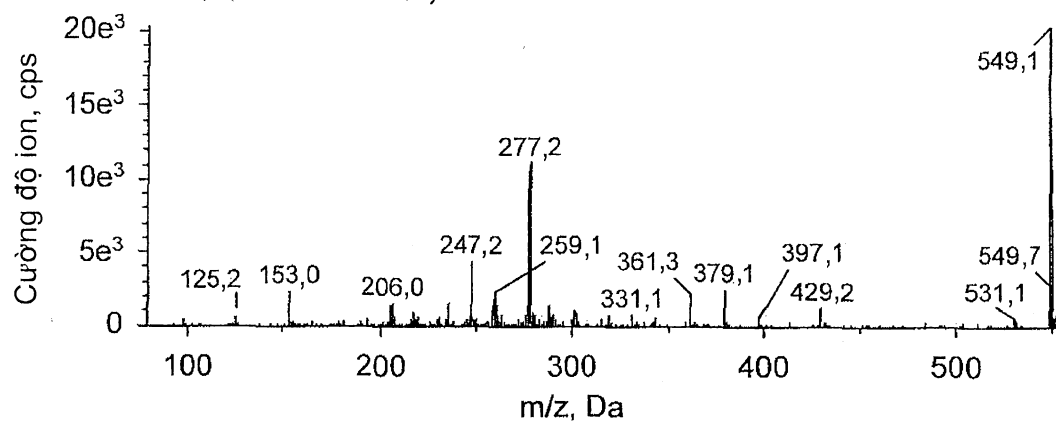


Fig. 3b

Số khối 63

+MSMS là 549,2(thu được 448,2)



Số khối 69

+MSMS là 543,4(thu được 442,4)

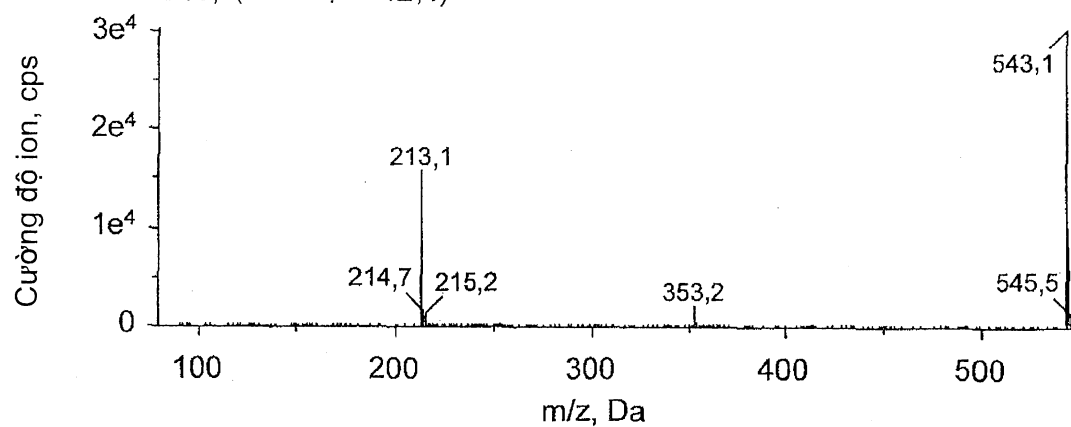
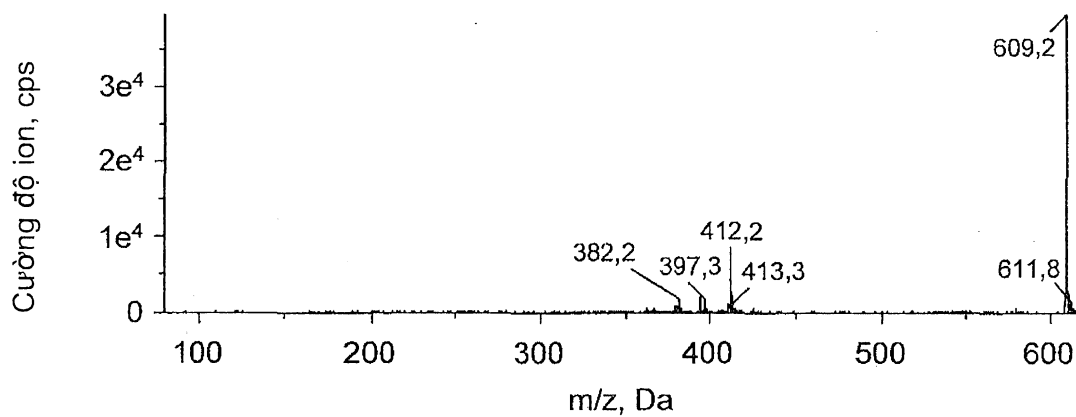


Fig. 3c

Số khối 110

+MSMS là 609,4(thu được 508,4)



Số khối 140

+MSMS là 535,3(thu được 434,3)

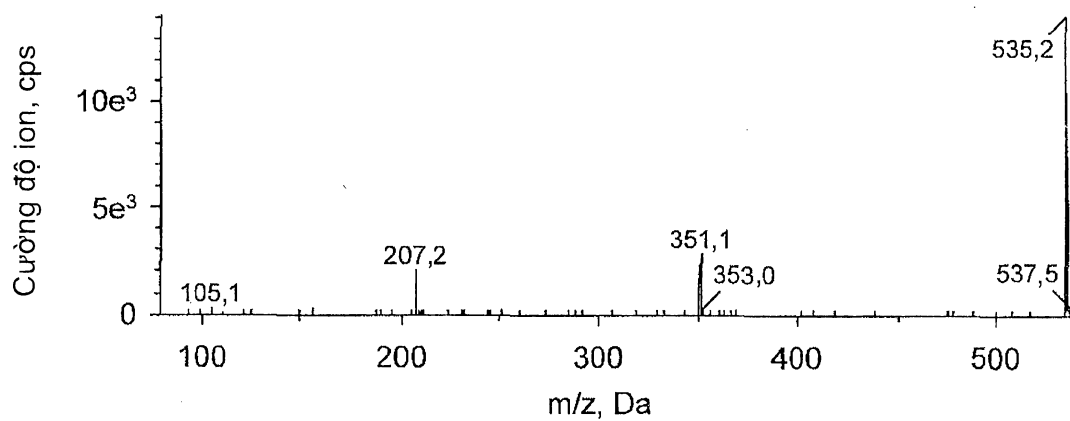


Fig. 4

Nhóm mô hình chẩn đoán	1	3
Chẩn đoán (vào tháng thứ 1)	Dung dịch thủy canh I	Dung dịch thủy canh II
Chẩn đoán (vào tháng thứ 2)	Dung dịch thủy canh I	Dung dịch thủy canh II
Số lượng cá thể có thể sử dụng	3	3
Nhóm mà các cá thể bắt nguồn từ đó	tất cả đều từ A'	tất cả đều từ B'

Fig. 5

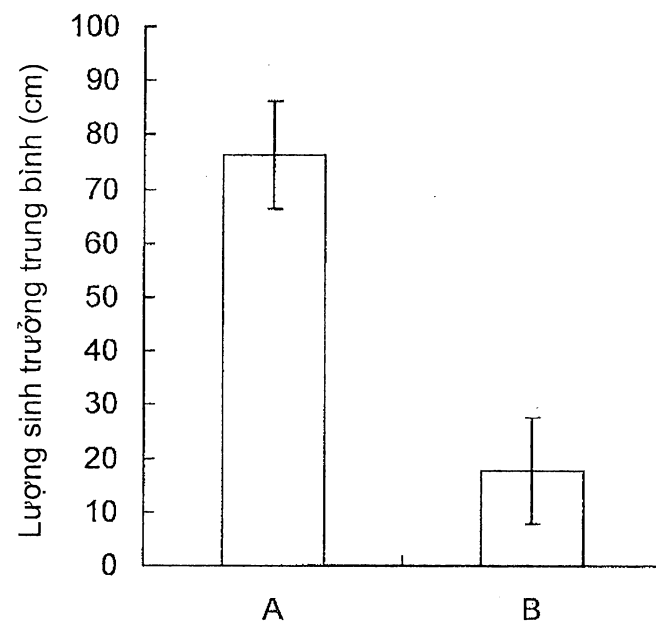


Fig. 6

Nhóm mô hình chẩn đoán	1	2	3
Chẩn đoán (vào tháng thứ 1)	Dung dịch thủy canh I	Dung dịch thủy canh I	Dung dịch thủy canh III
Chẩn đoán (vào tháng thứ 2)	Dung dịch thủy canh I	Dung dịch thủy canh III	Dung dịch thủy canh III
Số lượng cá thể có thể sử dụng	5	5	5
Nhóm mà các cá thể bắt nguồn từ đó	tất cả đều từ A	tất cả đều từ B	tất cả đều từ C

Fig. 7

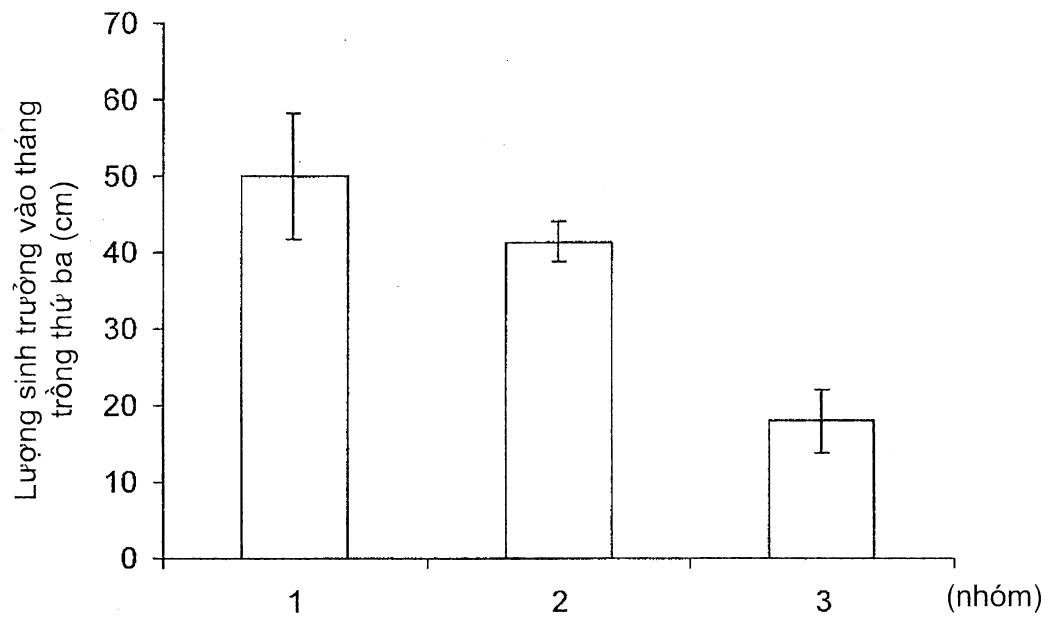


Fig. 8

Kiểu bón phân		A	B	C
Chẩn đoán (vào tuần thứ 2)	Dung dịch thủy canh I	5	5	0
	Dung dịch thủy canh III	0	0	5

Fig. 9

Kiểu bón phân		A	B	C
Chẩn đoán (vào tuần thứ 2)	Dung dịch thủy canh I	4	4	0
	Dung dịch thủy canh III	1	1	5

Fig. 10

Kiểu bón phân		A	B	C
Chẩn đoán (vào tuần thứ 2)	Dung dịch thủy canh I	4	5	0
	Dung dịch thủy canh III	1	0	5

Fig. 11

Kiểu bón phân		A	B	C
Chẩn đoán (vào tuần thứ 2)	Dung dịch thủy canh I	5	5	4
	Dung dịch thủy canh III	0	0	1
Chẩn đoán (vào tuần thứ 4)	Dung dịch thủy canh I	5	5	1
	Dung dịch thủy canh III	0	0	4

Fig. 12

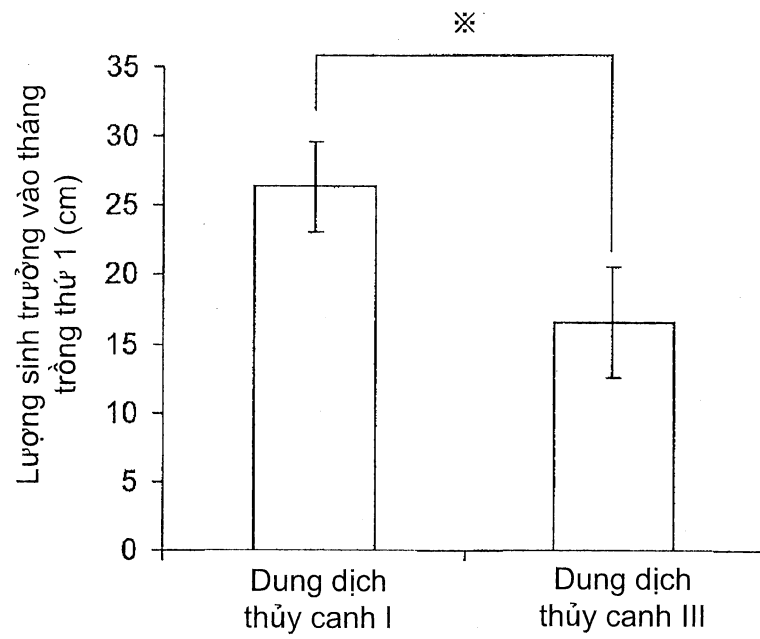


Fig. 13

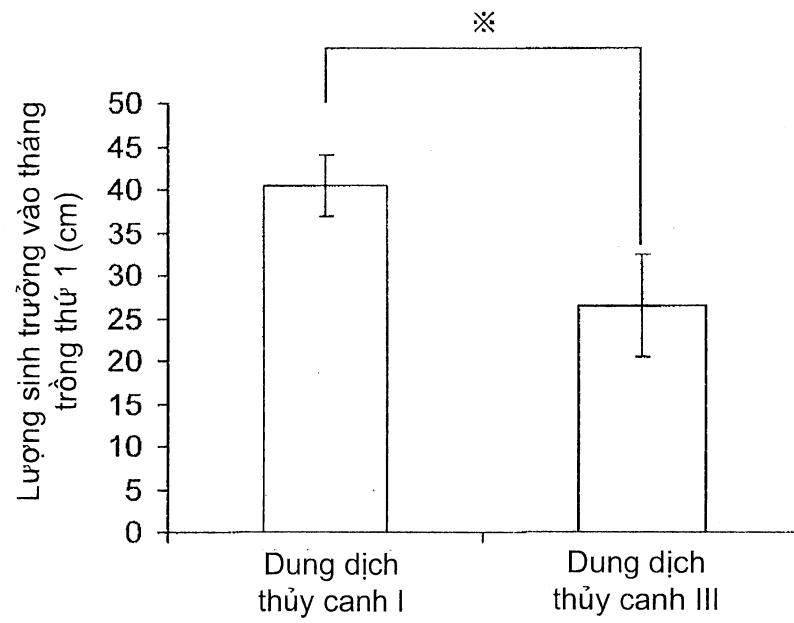


Fig. 14

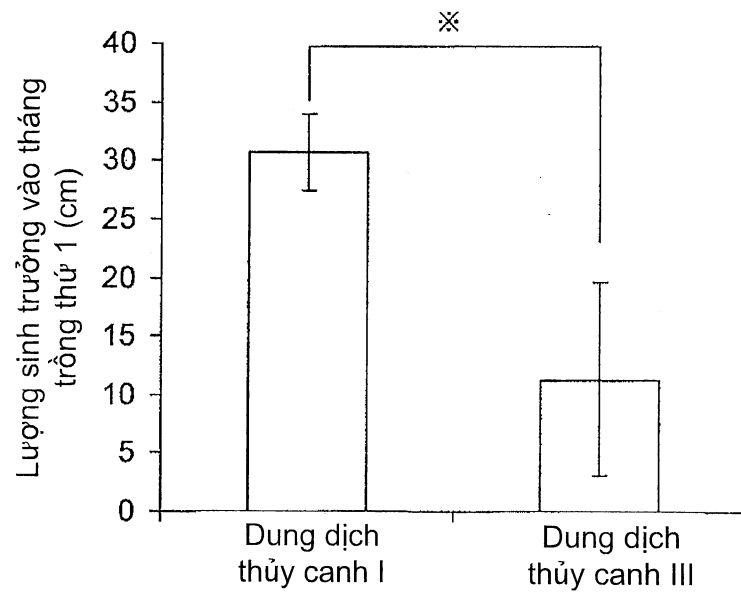


Fig. 15

