



(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)



1-0028305

(51)⁷ A01H 1/02; C12N 1/14; A01G 1/04

(13) B

(21) 1-2015-00005

(22) 10/12/2012

(86) PCT/JP2012/007868 10/12/2012

(87) WO2014/020653 06/02/2014

(30) 2012-169032 31/07/2012 JP

(45) 25/05/2021 398

(43) 25/03/2015 324A

(73) HOKUTO CORPORATION (JP)

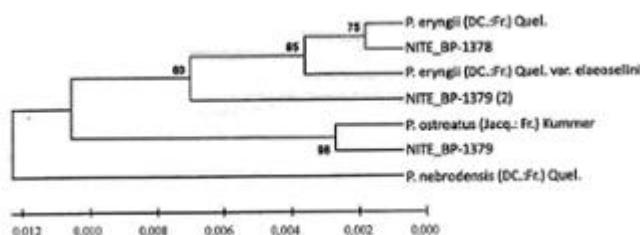
138-1, Minamibori, Nagano-shi, Nagano 381-8533, Japan

(72) ISHIKAWA, Mariko (JP); INATOMI, Satoshi (JP); OUCHI, Kenji (JP); OKU, Takeshi (JP).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) THỂ LAI KHÁC LOÀI CỦA PLEUROTUS SPP., PHƯƠNG PHÁP PHÁT TRIỂN VÀ PHƯƠNG PHÁP NUÔI CẤY THỂ LAI KHÁC LOÀI CỦA PLEUROTUS SPP.

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp phát triển các loài mới bằng cách lai chéo khác loài từ nhóm gồm có *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel., *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. var. *elaeoselini*, *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. var. *tuoliensis* C.J. Mou và *P. nebrodensis* (DC.:Fr.) Quel., không có nguồn gốc Nhật Bản, và *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer, có nguồn gốc Nhật Bản và các loài mới thu được bằng phương pháp này và sáng chế cũng đề cập đến các loài mới của *Pleurotus* spp. mang gen *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. và gen *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer bằng cách lai chéo *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer với *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. var. *tuoliensis* C.J. Mou, *P. nebrodensis* (DC.:Fr.) Quel. hoặc *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. var. *ferulae* Lanzi, nhờ đó thu được chủng có khả năng lai chéo tiếp với *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel., *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. var. *elaeoselini* hoặc tương tự.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các loài mới và phương pháp phát triển các loài mới bằng cách sử dụng nhiều *Pleurotus* spp.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

P. ostreatus (Jacq.: Fr.) Kummer, *P. salmoneostramineus* L. Vass., *P. cornucopiae* (Paulet) Rolland var. *citrinopileatus* (Sing.) Ohira, *P. abalonus* Y.H. Han, K.M. Chen & S. Cheng và *P. pulmonarius* (Fr.) Quel., v.v. thường được biết đến dưới dạng *Pleurotus* spp. có nguồn gốc Nhật Bản (sau đây được gọi là các giống quốc nội). Trong số các giống này, *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer đã được thương thức dưới dạng lâm sản phụ, nhưng có bất lợi ở chỗ mũ của nó có thể bị phá vỡ trong quá trình phân phối và nấu nướng, và do đó lượng sản lượng quốc nội đã và đang bị giảm từ khoảng năm 1989.

Mặt khác, *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel., *P. nebrodensis* (DC.:Fr.) Quel., *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. var. *ferulae* Lanzi, *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. var. *elaeoselini*, *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. var. *tuoliensis* C.J. Mou, v.v. đã được biết đến (Tài liệu phi sáng chế 1, Tài liệu phi sáng chế 2), và *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. đã được tạo ra và được bán ở Nhật bản từ khoảng năm 1995, và *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. var. *tuoliensis* C.J. Mou, v.v. cũng đã được bán vài năm sau đó dưới dạng *Pleurotus* spp. không có nguồn gốc Nhật bản (sau đây được gọi là các giống ngoại). Trong số chúng, *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. là mặt hàng có nhu cầu cao và lượng sản lượng quốc nội đã và đang gia tăng. *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. var. *tuoliensis* C.J. Mou, v.v. mà đã được kinh doanh sau đó không được mở rộng thành thị trường mới do, trong số các yếu tố khác, chúng tương tự với *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel., và do đó có nhu cầu mạnh mẽ để phát triển các giống mới.

Bất ngờ là, ở *Pleurotus* spp., việc lai chéo trong số các giống ngoại gần đây đã được xác nhận (Tài liệu phi sáng chế 2). Tuy nhiên, không có ví dụ nào về việc lai chéo giống quốc nội với giống ngoại và liên quan đến cây phả hệ, các tác giả sáng chế

đã tin rằng các loài này có thể không lai chéo được do chúng có thể được phân loại thành các nhóm khác nhau (Tài liệu phi sáng chế 2, Tài liệu phi sáng chế 3). Do đó, không có loài mới nào có các đặc điểm của giống quốc nội và giống ngoại đã được phát triển (các tài liệu sáng chế từ 1 đến 6).

Danh mục tài liệu trích dẫn

Tài liệu sáng chế

Tài liệu sáng chế 1: công bố đơn yêu cầu cấp patent Nhật bản số JP 2011-109941 A

Tài liệu sáng chế 2: công bố đơn yêu cầu cấp patent Nhật bản số JP 2011-110046 A

Tài liệu sáng chế 3: công bố đơn yêu cầu cấp patent Nhật bản số JP 2009-22218 A

Tài liệu sáng chế 4: công bố đơn yêu cầu cấp patent Nhật bản số JP 2008-104380 A

Tài liệu sáng chế 5: công bố đơn yêu cầu cấp patent Nhật bản số JP 2007-37455 A

Tài liệu sáng chế 6: công bố đơn yêu cầu cấp patent Nhật bản số JP 2006-67930 A

Tài liệu phi sáng chế

Tài liệu phi sáng chế 1: G. Venturella et al. *Pleurotus eryngii* var. *elaeoselini* var. nov. from Sicily Mycotaxon, 76, 419-427 (2000).

Tài liệu phi sáng chế 2: G. Kawai et al. Taxonomic position of a Chinese *Pleurotus* “Bai-Ling-Gu”: nó thuộc *Pleurotus eryngii* (DC.:Fr.) Quel. và được phát triển một cách độc lập ở Trung quốc, Mycoscience, 49, 75-87 (2008).

Tài liệu phi sáng chế 3: D. Bao et al. The biological species of oyster mushroom (*Pleurotus* spp.) từ Châu Á dựa trên các thử nghiệm về khả năng ghép, J Wood Sci, 50, 162-168 (2004).

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề mà sáng chế sẽ giải quyết là để phát hiện ra tổ hợp mà có thể được lai chéo giữa giống quốc nội và giống ngoại và tạo ra các loài mới có cả hai đặc điểm của giống quốc nội và giống ngoại (thể lai khác loài) và kỹ thuật liên quan đến phương pháp để phát triển thể lai khác loài.

Là kết quả của các nghiên cứu chuyên sâu để giải quyết vấn đề được kể đến trên đây, các tác giả sáng chế đã thành công trong việc lai chéo *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.)

Kummer với giống ngoại như *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. var. *tuoliensis* C.J. Mou, *P. nebrodensis* (DC.:Fr.) Quel. hoặc *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. var. *ferulae* Lanzi và đề xuất phương pháp có khả năng phát triển sự đa dạng của thể lai kha c loài bằng cách lai chéo thể lai với *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel., *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. var. *elaeoselini* hoặc tương tự và các giống mới (thể lai khác loài) thu được bằng phương pháp này.

Nói cách khác, sáng chế theo điểm 1 yêu cầu bảo hộ là phương pháp để phát triển thể lai khác loài, bao gồm bước lai chéo *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer, giống quốc nội, với giống ngoại *P. nebrodensis* (DC.:Fr.) Quel., *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. var. *tuoliensis* C.J. Mou hoặc *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. var. *ferulae* Lanzi.

Sáng chế theo điểm 2 yêu cầu bảo hộ là thể lai khác loài thu được bằng phương pháp theo điểm 1 yêu cầu bảo hộ.

Sáng chế theo điểm 3 yêu cầu bảo hộ là phương pháp phát triển thể lai kha c loài của *Pleurotus* spp., bao gồm bước lai chéo thể lai khác loài theo điểm 2 yêu cầu bảo hộ với *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. hoặc *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. var. *elaeoselini*.

Sáng chế theo điểm 4 yêu cầu bảo hộ là thể lai khác loài của *Pleurotus* spp. thu được bằng phương pháp theo điểm 3 yêu cầu bảo hộ.

Sáng chế theo điểm 5 yêu cầu bảo hộ là phương pháp phát triển thể lai khác loài của *Pleurotus* spp. giữa *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer, loài quốc nội và thể lai khác loài của giống ngoại, bao gồm bước thu được thể lai của hai giống bất kỳ trong số *P. nebrodensis* (DC.:Fr.) Quel., *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. var. *tuoliensis* C.J. Mou, *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. var. *ferulae* Lanzi, *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. và *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. var. *elaeoselini* theo cách mà một bên bố mẹ là *P. nebrodensis* (DC.:Fr.) Quel., *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. var. *tuoliensis* C.J. Mou hoặc *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. var. *ferulae* Lanzi, và lai chéo thể lai với *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer.

Sáng chế theo điểm 6 yêu cầu bảo hộ là thể lai khác loài của *Pleurotus* spp. thu được bằng phương pháp theo điểm 5 yêu cầu bảo hộ.

Sáng chế theo điểm 7 yêu cầu bảo hộ là phương pháp phát triển thể lai khác loài của *Pleurotus* spp. theo điểm 1, 3 hoặc 5, trong đó thể lai thu được bằng cách lai

chéo hai giống từ nhóm gồm có *P. nebrodensis* (DC.:Fr.) Quel., *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. var. *tuoliensis* C.J. Mou và *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. var. *ferulae* Lanzi được sử dụng thay cho *P. nebrodensis* (DC.:Fr.) Quel., *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. var. *tuoliensis* C.J. Mou hoặc *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. var. *ferulae* Lanzi.

Sáng chế theo điểm 8 yêu cầu bảo hộ là phương pháp phát triển thể lai khác loài của *Pleurotus* spp. theo điểm 3, 5 hoặc 7, trong đó thể lai thu được bằng cách lai chéo *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. với *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. var. *elaeoselini* được sử dụng thay cho *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. hoặc *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. var. *elaeoselini*.

Sáng chế theo điểm 9 yêu cầu bảo hộ là thể lai khác loài thu được bằng phương pháp theo điểm 7 hoặc 8 yêu cầu bảo hộ giữa *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer, giống quốc nội và giống ngoại.

Sáng chế theo điểm 10 yêu cầu bảo hộ là phương pháp nuôi cấy để tạo ra nấm bằng cách cấy thể lai khác loài của *Pleurotus* spp. giữa *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer, giống quốc nội và giống ngoại vào môi trường nuôi cấy nấm.

Sáng chế theo điểm 11 yêu cầu bảo hộ là chủng có số lưu trữ NITE BP-1378 hoặc NITE BP-1379, mà là loài mới của *Pleurotus* spp., thu được bằng cách lai chéo khác loài giữa *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer, giống quốc nội, và giống ngoại.

Sáng chế theo điểm 12 yêu cầu bảo hộ là phương pháp nuôi cấy chủng có số lưu trữ NITE BP-1378 hoặc NITE BP-1379, mà là giống mới của *Pleurotus* spp., thu được bằng cách lai chéo khác loài giữa *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer, giống quốc nội, và giống ngoại trong môi trường nuôi cấy nấm.

Hiệu quả của sáng chế

Theo sáng chế, có thể tạo ra thể lai khác loài giữa *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer, giống quốc nội, và giống ngoại. Do đó, sáng chế có thể tạo ra các loài mới mang cả hai gen *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer và gen *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel., mà chưa từng được biết đến cho đến nay. Cụ thể là, phần mô tả sau đây mô tả mỗi hiệu quả của sáng chế.

Sáng chế theo các điểm 1 và 2 yêu cầu bảo hộ cho phép lai chéo *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer, giống quốc nội, với *P. nebrodensis* (DC.:Fr.) Quel., *P. eryngii*

(DC.:Fr.) Quel. var. *tuoliensis* C.J. Mou hoặc *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. var. *ferulae* Lanzi, mà là giống ngoại, sao cho có thể thu được thể lai khác loài giữa giống quốc nội và giống ngoại và hơn nữa còn cho phép lai chéo giống ngoại, mà có thể không được lai chéo với *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer, với giống mang gen *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer. Các loài mới mà không tồn tại một cách thông thường có thể góp phần vào việc khai phá thị trường mới.

Sáng chế theo các điểm 3 và 4 yêu cầu bảo hộ cho phép lai chéo *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. hoặc *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. var. *elaeoselini*, mà là giống ngoại và có thể không được lai chéo với *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer, giống quốc nội, và do đó, cho phép đưa các tính trạng của *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. phổ biến vào *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer hoặc phối hợp các tính trạng đặc trưng của *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer vào *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. Cụ thể hơn là, hiệu quả của sáng chế là ở chỗ có thể phát triển nấm mà về bề ngoài của nó tương tự với *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer nhưng lại có vị của *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. hoặc nấm mà màu sắc mũ của nó tương tự với *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer nhưng lại có thân dày như *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. xét về hình dạng.

Sáng chế theo các điểm từ 5 đến 9 yêu cầu bảo hộ cho phép, khi lai chéo *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer, giống quốc nội, với giống ngoại, tạo ra thể lai khác loài của các giống ngoại theo cách có thể lai chéo giữa các giống ngoại và cho phép lai chéo thể lai khác loài được tạo ra của giống ngoại với *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer, giống quốc nội, để nhờ đó phát triển thể lai khác loài có nhiều biến thể. Để làm ví dụ, hiệu quả của sáng chế là ở chỗ có thể chứa các thành phần dinh dưỡng đơn nhất đối với mỗi giống được sử dụng làm bố mẹ lai và cũng có thể phát triển các giống có màu sắc mà có thể không phát triển được bởi *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer hoặc không được phát triển được bằng cách lai chéo giữa các giống ngoại khác nhau.

Sáng chế theo điểm 10 yêu cầu bảo hộ cho phép tạo ra lượng lớn các loài mới thu được bằng cách lai chéo *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer, giống quốc nội, với giống ngoại bằng cách cấy chúng vào môi trường nuôi cấy nấm. Do có thể sản xuất trên quy mô lớn, nên thị trường mới có thể được phát triển nhờ đó sự phát triển kinh tế cũng có thể được kỳ vọng.

Sáng chế theo các điểm 11 và 12 yêu cầu bảo hộ tạo ra các loài mới thu được bằng cách lai chéo giống quốc nội với giống ngoại. Thể lai khác loài có thể được tạo ra mà không cần lai chéo.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Fig.1 là hình vẽ thể hiện mối quan hệ phá hệ giữa giống quốc nội, giống ngoại và các loài có số lưu trữ NITE BP-1378 và NITE BP-1379 thu được nhờ sáng chế theo phương pháp UPGMA.

Mô tả chi tiết sáng chế

Đối với các giống ngoại cần thiết để thực hiện sáng chế, *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel., *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. var. *tuoliensis* C.J. Mou và *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. var. *ferulae* Lanzi là có bán trên thị trường và do đó, là có sẵn một cách dễ dàng. Mặt khác, *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. var. *elaeoselini* và *P. nebrodensis* (DC.:Fr.) Quel. là không sẵn có ở Nhật Bản nhưng có thể thu được từ viện sưu tập chủng hoặc được nhập khẩu từ thị trường châu Âu (ví dụ, Italy). Hơn nữa, sự thận trọng là cần thiết đối với *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. var. *tuoliensis* C.J. Mou tại thời điểm thu nhận do nó thường bị nhầm lẫn với *P. nebrodensis* (DC.:Fr.) Quel.

Theo sáng chế, thể lai khác loài có thể thu được bằng cách lai chéo *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer, giống quốc nội, từ nhóm gồm có *Pleurotus* spp. với giống ngoại như *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. var. *tuoliensis* C.J. Mou, *P. nebrodensis* (DC.:Fr.) Quel. hoặc *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. var. *ferulae* Lanzi. Sau đó, bằng cách sử dụng và lai chéo tiếp thể lai khác loài được kể đến trên đây với giống ngoại khác, có thể thu được thể lai khác loài với giống ngoại như *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. mà có thể không được lai chéo với *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer.

Hơn nữa, sáng chế có thể đạt được mục đích tạo ra các loài mới của *Pleurotus* spp. có các tính trạng được đa dạng hoá bằng cách tạo ra các loài mới mang gen của *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer, giống quốc nội, và gen giống ngoại, nhưng để đạt được mục đích này, trong quy trình phát triển giống ngoại và thể lai khác loài, thì cần phải thực hiện việc lai chéo ít nhất một lần, mà có khả năng đạt được hiệu quả thu được bằng cách lai chéo *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer, giống quốc nội, với *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. var. *tuoliensis* C.J. Mou, *P. nebrodensis* (DC.:Fr.) Quel. hoặc *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. var. *ferulae* Lanzi, mà là giống ngoại, nghĩa là hiệu quả tương

đương với khả năng của thể lai khác loài trong việc lai chéo với *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel., v.v.

Để làm ví dụ, *P. nebrodensis* (DC.:Fr.) Quel. có thể được lai chéo với *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. var. *tuoliensis* C.J. Mou và sau đó thể lai có thể được lai chéo với *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer, hoặc *P. nebrodensis* (DC.:Fr.) Quel. có thể được lai chéo với *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. và sau đó thể lai có thể được lai chéo với *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer. Theo cách khác, *P. nebrodensis* (DC.:Fr.) Quel. có thể được lai chéo với *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. var. *tuoliensis* C.J. Mou để thu được thể lai, thể lai có thể được lai chéo với *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. để tiếp tục thu được thể lai, và sau đó thể lai có thể được lai chéo với *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer. Việc lai chéo có thể được lặp lại nhiều lần bất kỳ trong tổ hợp mà cho phép lai chéo trước khi lai chéo *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer với *P. nebrodensis* (DC.:Fr.) Quel., *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. var. *tuoliensis* C.J. Mou hoặc *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. var. *ferulae* Lanzi, hoặc việc lai chéo có thể được lặp lại nhiều lần bất kỳ trong tổ hợp mà cho phép lai chéo sau khi lai chéo *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer với *P. nebrodensis* (DC.:Fr.) Quel., *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. var. *tuoliensis* C.J. Mou hoặc *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. var. *ferulae* Lanzi.

Thể lai khác loài giữa *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer và giống ngoại có thể được tạo ra bằng cách sử dụng phương pháp lai chéo thông thường trong lĩnh vực kỹ thuật tạo giống. Nói cách khác, phương pháp sau đây được sử dụng. Việc tách bào tử đơn lẻ được thực hiện bằng cách làm rụng bào tử từ nấm bố-mẹ và sợi nấm được nảy mầm từ bào tử đơn lẻ trên môi trường aga để thu được sợi nấm đơn nhân. Tương tự, sợi nấm đơn nhân thu được từ nấm bố-mẹ khác và cả hai sợi nấm đơn nhân này được nuôi cấy trên môi trường aga bằng môi trường nuôi cấy kép. Đối với quy trình nuôi cấy, sợi nấm được lai chéo tạo ra khóm. Nói cách khác, thể lai có thể thu được bằng cách tách sợi nấm trong đó quan sát thấy khóm. Trong trường hợp này, đối với môi trường aga, môi trường aga mà có thể được sử dụng trong việc nuôi cấy sợi nấm có thể được sử dụng bao gồm môi trường aga dextroza khoai tây.

Mặc dù phần mô tả về phương pháp lai chéo được mô tả trên đây, nhưng không có nghĩa rằng phương pháp lai chéo phải được sử dụng, mà các công nghệ sinh học khác có thể được sử dụng bao gồm việc dung hợp tế bào và chuyển gen.

Đối với phương pháp nuôi cấy thể lai khác loài được tạo ra, thể lai này có thể được nuôi cấy bằng cách sử dụng kỹ thuật hiện nay được sử dụng để nuôi cấy nấm *Pleurotus* spp. Nói cách khác, phương pháp nuôi cấy được sử dụng đối với *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer, *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. và *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. var. *tuoliensis* C.J. Mou có thể được áp dụng.

Đối với môi trường để nuôi cấy nấm lai khác loài, nhiều cỏ và cây có thể được sử dụng làm vật liệu môi trường bao gồm mùn cưa, lõi ngô, vỏ bông, vỏ dừa, rơm lúa, lõi cây nghiền vụn, vỏ đậu tương, bột đậu tương, bột ngô thô, cám lúa mì, cám gạo, lúa mạch, lúa mì, cám lúa mạch, yến mạch, trấu, cám ngô, bột ngô, sợi ngô, vỏ ngô, lúa miến, bánh hạt cải dầu, bánh dầu đậu tương, bánh dầu vừng, bánh cà phê, các loại đậu như bã củ cải đường và bột sắn, các cây trồng cho hạt và rế. Ngoài ra, chất thải và chất cặn bã được tạo ra trong quy trình xử lý thức ăn cũng có thể được sử dụng bao gồm bã thải của đậu phụ, sản phẩm phụ của chưng cất rượu shochu và hạt ủ rượu bia. Khi chọn lọc vật liệu môi trường, môi trường được sử dụng đối với *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer, *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. và *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. var. *tuoliensis* C.J. Mou có thể được sử dụng một cách cơ bản, nhưng cũng có các trường hợp khi bản thiết kế cần phải được thay đổi nhiều hoặc ít theo sự đồng bộ hoá với các đặc điểm của thể lai khác loài nằm trong kiến thức thông thường trong lĩnh vực kỹ thuật nuôi cấy nấm.

Vật chứa được sử dụng để nuôi cấy nấm lai khác loài theo sáng chế có thể là chai nuôi cấy nấm, nhưng cũng có thể nuôi cấy nấm trong túi nuôi cấy nấm. Do việc sử dụng chai nuôi cấy nấm tạo thuận lợi cho thao tác cơ học, nên chai nuôi cấy nấm là thích hợp để nuôi cấy nấm trên quy mô công nghiệp.

Phương pháp nuôi cấy nấm lai khác loài theo sáng chế là phương pháp trong đó sau khi khuấy vật liệu môi trường tùy ý được chọn từ vật liệu môi trường được kể đến trên đây, nước được bổ sung vào sao cho hàm lượng hơi ẩm nằm trong khoảng từ 60% đến 70%, (hỗn hợp) còn được khuấy tiếp để điều chỉnh môi trường, môi trường được làm đầy vào chai nuôi cấy và sau khi vô trùng bằng cách gia nhiệt, (môi trường) được cấy sợi nấm lai khác loài theo sáng chế, sợi nấm này sau đó được nuôi cấy và được cho vào xử lý nảy mầm và (sợi nấm) được sinh trưởng tiếp.

Việc quản lý môi trường nuôi cấy tiêu chuẩn là như sau. Nhiệt độ được kiểm soát ở mức từ 20°C đến 23°C và tốt hơn là ở 22°C. Độ ẩm được kiểm soát nằm trong khoảng từ 80% đến 90%. Sự thông gió được kiểm soát sao cho nồng độ của khí cacbon dioxid trong buồng nuôi cấy không vượt quá 3000ppm. Buồng nuôi cấy nên được giữ trong bóng tối.

Việc quản lý nảy mầm và sinh trưởng tiêu chuẩn là như sau. Nhiệt độ được kiểm soát ở mức từ 14°C đến 15°C. Độ ẩm được kiểm soát nằm trong khoảng từ 80% đến 90%. Sự thông gió được kiểm soát sao cho nồng độ của khí cacbon dioxid trong buồng nảy mầm không lớn hơn 750 ppm. Ánh sáng khoảng 100 lx được chiếu từ đèn huỳnh quang trong thời gian nảy mầm và sinh trưởng.

Mặc dù việc nuôi cấy các giống *Pleurotus* spp. có thể được quản lý tốt trong môi trường được kể đến trên đây, số ngày nuôi cấy, nảy mầm và sinh trưởng thay đổi phụ thuộc vào các giống. Ví dụ, số ngày nuôi cấy là 21 ngày đối với *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer, 28 ngày đối với *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. và *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. var. *elaeoselini*, 35 ngày đối với *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. var. *tuoliensis* C.J. Mou và *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. var. *ferulae* Lanzi, và 42 ngày đối với *P. nebrodensis* (DC.:Fr.) Quel. số ngày nảy mầm và sinh trưởng là 9 ngày đối với *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer, 14 ngày đối với *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel., *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. var. *elaeoselini*, *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. var. *tuoliensis* C.J. Mou và *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. var. *ferulae* Lanzi, và 18 ngày đối với *P. nebrodensis* (DC.:Fr.) Quel.

Trong trường hợp các thể lai khác loài, việc quản lý nuôi cấy thay đổi phụ thuộc vào các giống được tạo ra và các điều kiện quản lý nuôi cấy thay đổi phụ thuộc vào các điều kiện nuôi cấy của các giống bố-mẹ và do đó việc tạo ra nhiều thể lai khác loài và việc chọn thể lai khác loài thích ứng đối với môi trường sinh trưởng được quan tâm trở nên dễ dàng hơn. Ví dụ, nếu mong muốn thu được giống có chu kỳ nuôi cấy ngắn như *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer, bạn chỉ nên thiết lập số ngày nuôi cấy, sinh trưởng, v.v. trong khoảng thời gian ngắn, nuôi cấy nằm trong điều kiện quản lý tiêu chuẩn được kể đến trên đây, kiểm tra liệu có tạo ra các tính trạng được quan tâm hay không và nếu tính trạng quan tâm này đạt được như kết quả của việc kiểm tra, thì chọn thể lai khác loài mà đạt được tính trạng quan tâm này.

Hơn nữa, các tác giả sáng chế đã lưu trữ hai chủng thu được bằng cách lai chéo lặp lại vài lần bằng cách sử dụng *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer, *P. nebrodensis* (DC.:Fr.) Quel., *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. và *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. var. *elaeoselini* vào NITE (National Institute of Technology and Evaluation) Patent Microorganisms Depositary (NPMD), phòng phối hợp quản lý độc lập, làm các chủng mà có thể được nuôi cấy trong khoảng thời gian tương đối ngắn. Chúng đã được lưu trữ với số lưu trữ NITE BP-1378 và NITE BP-1379.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế sẽ được mô tả một cách cụ thể dưới đây với việc tham chiếu đến các ví dụ, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở các ví dụ sau đây mà không tách rời tinh thần của sáng chế.

Ví dụ 1

Các tác giả sáng chế đã thực hiện việc tách bào tử đơn lẻ để thu được sợi nấm đơn nhân từ nấm *Pleurotus* spp. nghĩa là, *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer, *P. salmoneostramineus* L. Vass., *P. cornucopiae* (Paulet) Rolland var. *citrinopileatus* (Sing.) Ohira, *P. abalonus* Y.H. Han, K.M. Chen & S. Cheng và *P. pulmonarius* (Fr.) Quel., mà là các giống quốc nội và *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. *P. nebrodensis* (DC.:Fr.) Quel., *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. var. *ferulae* Lanzi, *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. var. *elaeoselini* và *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. var. *tuoliensis* C.J. Mou, mà là các giống ngoại. Trong mỗi giống, sợi nấm đơn nhân được lai với với nhau bằng việc nuôi cấy kép để quan sát liệu có khả năng ghép hay không và các tác giả sáng chế sau đó đã phân loại sợi nấm đơn nhân của mỗi giống thành bốn loại ghép.

Các tác giả sáng chế đã chọn tám chủng có sợi nấm đơn nhân bao gồm hai chủng từ mỗi bốn loại ghép trong mỗi giống và kiểm tra liệu có hay không khả năng lai chéo bằng nuôi cấy kép trong tất cả các tổ hợp trong đó có khả năng lai chéo khác loài. bảng 1 thể hiện các kết quả. Trong bảng 1, các tổ hợp được lai chéo được thể hiện bằng dấu +, và các tổ hợp trong đó không có việc lai chéo nào xảy ra được thể hiện bằng dấu -. Hơn nữa, số tổ hợp được lai chéo được thể hiện theo tỷ lệ phần trăm so với tất cả các tổ hợp của việc lai chéo khác loài tương ứng theo tỷ lệ lai.

Bảng 1

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)
(1)		0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	56,3%	9,4%	0,0%	18,8%
(2)	-		0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
(3)	-	-		0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
(4)	-	-	-		0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
(5)	-	-	-	-		0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
(6)	-	-	-	-	-		62,5%	75,0%	78,1%	71,9%
(7)	+	-	-	-	-	+		54,7%	31,3%	50,0%
(8)	+	-	-	-	-	+	+		70,3%	62,5%
(9)	-	-	-	-	-	+	+	+		12,5%
(10)	+	-	-	-	-	+	+	+	+	

(1): *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer, (2): *P. salmoneostramineus* L. Vass., (3): *P. cornucopiae* (Paulet) Rolland var. *citrinopileatus* (Sing.) Ohira, (4): *P. abalonus* Y.H. Han, K.M. Chen & S. Cheng, (5): *P. pulmonarius* (Fr.) Quel., (6): *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel., (7): *P. nebrodensis* (DC.:Fr.) Quel., (8): *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. var. *ferulae* Lanzi, (9): *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. var. *elaeoselini*, (10): *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. var. *tuoliensis* C.J. Mou.

Tiếp theo, các tác giả sáng chế đã tiến hành các thử nghiệm nuôi cấy đối với các thể lai giữa *P. nebrodensis* (DC.:Fr.) Quel. và *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer.

Ví dụ 2

Các tác giả sáng chế đã lai chéo *P. nebrodensis* (DC.:Fr.) Quel. với *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer, tùy ý chọn 90 chủng, cấy mỗi sợi nấm của 90 chủng vào môi trường nuôi cấy nấm một cách riêng biệt và kiểm tra trạng thái nảy mầm của nấm. Nấm được nuôi cấy như sau.

Phương pháp nuôi cấy nấm

Các tác giả sáng chế đã sử dụng môi trường nuôi cấy nấm có thành phần sau đây trong đó *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. có thể nảy mầm tốt. Các tác giả sáng chế đã

trộn lõi ngô, vỏ đậu, cám lúa mì và cám gạo ở tỷ lệ 64:18:9:9 theo tỷ lệ khối lượng và bổ sung nước vào sau khi khuấy để tạo ra hàm lượng hơi ẩm bằng 64%.

Các tác giả sáng chế đã nạp môi trường nuôi cấy nấm vào chai nuôi cấy nấm 850mL, nén môi trường trong khi tạo ra lỗ, lỗ này xuyên từ bề mặt trên đến đáy, hướng về phía đáy từ phần trung tâm của bề mặt trên của môi trường và sau đó gắn nắp vào cổ chai bằng cách khớp chúng với nhau, khử trùng ở 118°C trong 15 phút. Sau khi làm nguội chai nuôi cấy nấm được khử trùng đến 20°C, các tác giả sáng chế cấy sợi nấm của thể lai giữa *P. nebrodensis* (DC.:Fr.) Quel. và *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer vào chai. Tiếp theo, các tác giả sáng chế đã nuôi cấy nó ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 22°C đến 23°C và lượng ẩm từ 80% đến 90% trong từ 21 ngày đến 42 ngày, tiếp theo cào xước, đưa nó vào xử lý nảy mầm ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 14°C đến 15°C và lượng ẩm nằm trong khoảng từ 80% đến 90% trong từ 6 ngày đến 10 ngày và sau đó nảy mầm, để nó sinh trưởng ở nhiệt độ từ 14°C đến 15°C và lượng ẩm từ 80% đến 90% trong từ 3 ngày đến 10 ngày trước khi thu hoạch.

Về kết quả của việc nuôi cấy thể lai giữa *P. nebrodensis* (DC.:Fr.) Quel. và *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer, bảng 2 thể hiện các đặc điểm nông học và các đặc điểm hình thái học của chúng.

- (1) Về số ngày nuôi cấy, số ngày nuôi cấy tiêu chuẩn đối với *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer là 21 ngày và số ngày nuôi cấy tiêu chuẩn đối với *P. nebrodensis* (DC.:Fr.) Quel. là 42 ngày trong khi số ngày thay đổi từ 18 ngày đến 36 ngày đối với thể lai mới.
- (2) số ngày sinh trưởng (khoảng thời gian đến lúc thu hoạch từ khi xử lý cào xước) thay đổi từ 9 ngày đến 20 ngày và các tác giả sáng chế có thể thu được số ngày gần với *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer, số ngày trung gian, số ngày gần với *P. nebrodensis* (DC.:Fr.) Quel. và v.v.
- (3) Về các đặc điểm hình thái học và vị, các tác giả sáng chế cũng có thể thu được các loại giống khác nhau như các giống có hình dạng và vị gần với *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer, giống trung gian giữa *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer và *P. nebrodensis* (DC.:Fr.) Quel., và các giống gần với *P. nebrodensis* (DC.:Fr.) Quel..

Bảng 2

			P. ostreatus (Jacq.: Fr.) Kummer	P. nebrodensis (DC.:Fr.) Quel.	Lai chéo giữa P. ostreatus (Jacq.: Fr.) Kummer và P. nebrodensis (DC.:Fr.) Quel.
Các đặc điểm nông học	Số ngày nuôi cấy		21 ngày	42 ngày	18 ngày đến 36 ngày
	Số ngày sinh trưởng		9 ngày	18 ngày	9 ngày đến 20 ngày
	Sản lượng (khối lượng)		Sản lượng 22,1%	Sản lượng 17,6%	Sản lượng 15,8% đến 23,7%
Các đặc điểm hình thái học	Mũ	Hình dạng	Loại lõm	Loại lõm	Loại phễu, loại lõm, loại phẳng
		Màu sắc	Màu xám-nâu	Màu trắng vàng nhạt	Màu trắng, trắng màu vàng nhạt, màu xám-nâu
	Thân	Hình dạng	Mỏng và ngắn	Dày ở giữa	Mỏng và dài, mỏng và ngắn, dày ở giữa
		Màu sắc	Màu trắng	Màu trắng vàng nhạt	Màu trắng, màu trắng vàng nhợt
Vị và hương	Vị		Đắng	Ngọt	Được đa dạng hoá bao gồm vị đắng, vị đắng được giảm và có vị ngọt tương tự hạt dẻ.
	Kết cấu thức ăn		Mềm và thiếu độ giòn	Cứng và giòn	Được đa dạng hoá bao gồm vị và hương gần với P. ostreatus (Jacq.: Fr.) Kummer, vị và hương gần với P. nebrodensis (DC.:Fr.) Quel. và vị và hương mà có thể dường như không phải trong số chúng.

Ví dụ 3

Đối với việc lai chéo của thể lai giữa P. ostreatus (Jacq.: Fr.) Kummer và P. nebrodensis (DC.:Fr.) Quel. với P. eryngii (DC.:Fr.) Quel. hoặc P. eryngii (DC.:Fr.) Quel. var. elaeoselini, các tác giả sáng chế đã thực hiện việc tách bào tử đơn lẻ từ mỗi nấm và sau đó thực hiện việc lai chéo theo cách tương tự với cách của Ví dụ 1. bảng 3 thể hiện kết quả của lai chéo. Các số trong bảng 3 thể hiện tỷ lệ phần trăm lai chéo so với tất cả các tổ hợp của lai chéo khác loài tương ứng. Do P. ostreatus (Jacq.: Fr.) Kummer được lai chéo với P. nebrodensis (DC.:Fr.) Quel., các tác giả sáng chế có thể lai chéo chúng với P. eryngii (DC.:Fr.) Quel. hoặc P. eryngii (DC.:Fr.) Quel. var. elaeoselini để nhờ đó tạo ra chủng mang các gen của P. eryngii (DC.:Fr.) Quel. hoặc P. eryngii (DC.:Fr.) Quel. var. elaeoselini và P. ostreatus (Jacq.: Fr.) Kummer.

Bảng 3

	<i>P. eryngii</i> (DC.:Fr.) Quel.	<i>P. eryngii</i> (DC.:Fr.) Quel. var. <i>elaeoselini</i>
Lai chéo giữa <i>P. ostreatus</i> (Jacq.: Fr.) Kummer và <i>P. nebrodensis</i> (DC.:Fr.) Quel.	34,4%	10,0%

Ví dụ 4

Các tác giả sáng chế đã thực hiện việc tách bào tử đơn lẻ từ thể lai giữa *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer và *P. nebrodensis* (DC.:Fr.) Quel, trong khi cũng thực hiện việc tách bào tử đơn lẻ từ thể lai giữa *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. và *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. var. *elaeoselini*, lai chéo cả hai sợi nấm đơn nhân bằng việc nuôi cấy kép, thu được 70 chủng được lai chéo giữa thể lai giữa *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer và *P. nebrodensis* (DC.:Fr.) Quel và thể lai giữa *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. và *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. var. *elaeoselini* và nuôi cấy chúng bằng phương pháp nuôi cấy tương tự với phương pháp của Ví dụ 2.

Về kết quả nuôi cấy các thể lai giữa thể lai giữa *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer và *P. nebrodensis* (DC.:Fr.) Quel và thể lai giữa *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. và *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. var. *elaeoselini*, bảng 4 thể hiện các đặc điểm nông học và đặc điểm hình thái học của chúng.

(1) số ngày nuôi cấy thay đổi từ 21 ngày đến 36 ngày.

(2) số ngày sinh trưởng từ 10 ngày đến 14 ngày.

(3) các đặc điểm hình thái học là khác nhau bao gồm màu sắc và hình dạng gần với mũ và thân của *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer, các đặc điểm này biểu diễn tính trạng như màu sắc và hình dạng gần với *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel., đặc điểm trung gian giữa *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer và *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel., và các đặc điểm gần với *P. nebrodensis* (DC.:Fr.) Quel. hơn so với *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer hoặc *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. Đối với màu sắc, các tác giả sáng chế đề cập đến biểu đồ màu sắc RHS.

Bảng 4

Các đặc điểm nông học	Số ngày nuôi cấy		21 ngày đến 36 ngày
	Số ngày sinh trưởng		10 ngày đến 14 ngày
	Sản lượng		Sản lượng: 20,3% đến 31,6%
Các đặc điểm hình thái học	Mũ	Hình dạng	Loại phễu, loại lõm, loại phẳng, loại lồi
		Màu sắc	Màu trắng, màu trắng vàng nhạt, màu xanh hơi xám, màu xám-nâu, màu xám đen-nâu, màu nâu, màu nâu sẫm, các màu khác (159C nhóm màu cam-màu trắng, 22A nhóm màu vàng-màu cam, v.v)
	Thân	Hình dạng	Mỏng và dài, mỏng và ngắn, dày và dài, dày và ngắn, dày ở giữa
		Màu sắc	Màu trắng, màu trắng vàng, màu xám nhạt
Vị và hương	Vị		Có vị ngọt mạnh, không có vị nhiều
	Kết cấu thức ăn		Được đa dạng hoá bao gồm kết cấu thức ăn gần với kết cấu của bất kỳ trong số P. nebrodensis (DC.:Fr.) Quel., P. ostreatus (Jacq.: Fr.) Kummer, P. eryngii (DC.:Fr.) Quel. và P. eryngii (DC.:Fr.) Quel. var. elaeoselini và có kết cấu thức ăn đôi khi giữa bất kỳ trong số chúng.

Tiếp theo, phần mô tả sau đây mô tả các chủng thực tiễn thu được bằng cách lai chéo lặp lại vài lần bằng cách sử dụng *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer, *P. nebrodensis* (DC.:Fr.) Quel., *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. và *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. var. *elaeoselini*.

Ví dụ 5

Các chủng được lưu trữ tại NITE (National Institute of Technology and Evaluation) Patent Microorganisms Depositary (NPMD), phòng phối hợp quản lý độc lập, như NITE BP-1378 và NITE BP-1379 là các chủng thu được bằng cách lai chéo lặp lại của sợi nấm đơn nhân bằng việc nuôi cấy kép, sợi nấm đơn nhân thu được bằng cách sử dụng *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer, *P. nebrodensis* (DC.:Fr.) Quel., *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. và *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. var. *elaeoselini* và thực hiện việc tách bào tử đơn lẻ từ các giống bố-mẹ được chọn một cách tùy ý. Cụ thể là, việc này được thực hiện như sau.

Các tác giả sáng chế đã thu được các thể lai bằng cách lai chéo *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer với *P. nebrodensis* (DC.:Fr.) Quel. và chọn một giống sau khi kiểm tra hình dạng, v.v. (được gọi là thể lai 1). Mặt khác, các tác giả sáng chế thu

được các thể lai bằng cách lai chéo *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. với *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. var. *elaeoselini* và chọn một giống sau khi kiểm tra hình dạng, v.v. (được gọi là thể lai 2). Tiếp theo, các tác giả sáng chế thu được các thể lai bằng cách lai chéo thể lai 1 với thể lai 2 và chọn một giống sau khi kiểm tra hình dạng, v.v. (được gọi là thể lai 3). Các tác giả sáng chế thu được các thể lai bằng cách lai chéo thể lai 3 với *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer và chọn một giống sau khi kiểm tra hình dạng, v.v. (được gọi là thể lai 4). Các tác giả sáng chế đã thu được các thể lai bằng cách lai chéo thể lai 4 với *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. và chọn một giống sau khi kiểm tra hình dạng, v.v. (được gọi là thể lai 5). Các tác giả sáng chế đã thu được các thể lai bằng cách lai chéo thể lai 5 với *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer và chọn một giống sau khi kiểm tra hình dạng, v.v. (được gọi là thể lai 6). Các tác giả sáng chế đã thu được các thể lai bằng cách lai chéo thể lai 5 với thể lai 6, kiểm tra hình dạng, v.v., chọn hai chủng từ các thể lai này và lưu trữ hai chủng này ở NITE (National Institute of Technology và Evaluation) Patent Microorganisms Depository (NPMD), phòng phối hợp quản lý độc lập, với các số lưu trữ NITE BP-1378 và NITE BP-1379.

Tiếp theo, phần mô tả sau đây thể hiện các ví dụ nuôi cấy trên các môi trường aga khác nhau đối với các tính trạng vi sinh vật khác nhau của mỗi chủng được lưu trữ.

Các tác giả sáng chế đã nuôi cấy mỗi trong số các chủng có số lưu trữ NITE BP-1378 và số lưu trữ NITE BP-1379 trước trên môi trường aga dextroza khoai tây, được đục lỗ có đường kính 5,0mm bằng dụng cụ khoan nút chai, cấy các chủng này vào mỗi trong số các môi trường sau đây và nuôi cấy trong bóng tối.

Các kết quả của chủng có số lưu trữ NITE BP-1378

(1) Điều kiện sinh trưởng trên môi trường aga chứa tinh chất mạch nha (25°C)

Đường kính của khuẩn lạc vào ngày thứ 6 bằng 23,5mm, và màu sắc của khuẩn lạc là màu trắng. Mật độ của khuẩn lạc là rất thấp và gần như tương tự so với *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. và *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer. Lượng sợi nấm trong không khí là nhỏ, hơi nhỏ hơn so với *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. và gần như tương tự so với *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer.

(2) Điều kiện sinh trưởng trên môi trường aga dextroza khoai tây (25°C)

Đường kính của khuẩn lạc vào ngày thứ 6 bằng 42,5mm, và màu sắc của khuẩn lạc là màu trắng. Mật độ của khuẩn lạc là cao và gần như tương tự so với *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. và *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer. Lượng sợi nấm trong không khí là lớn và hơi nhiều hơn so với *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. và *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer.

(3) Điều kiện sinh trưởng trên môi trường aga Sabouraud (25°C)

Đường kính của khuẩn lạc vào ngày thứ 6 bằng 22,3mm, và màu sắc của khuẩn lạc là màu trắng. Mật độ của khuẩn lạc là cao và gần như tương tự so với *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. và *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer. Lượng sợi nấm trong không khí là lớn, tương tự so với *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. và hơi nhiều hơn so với *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer.

(4) Điều kiện sinh trưởng trên môi trường aga nấm mốc tổng hợp (25°C)

Đường kính của khuẩn lạc vào ngày thứ 6 bằng 17,1mm, và màu sắc của khuẩn lạc là màu trắng. Mật độ của khuẩn lạc là cao, tương tự so với *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. và hơi cao hơn so với *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer. Lượng sợi nấm trong không khí là nhỏ, tương tự so với *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. và hơi nhiều hơn so với *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer.

(5) Điều kiện sinh trưởng trên môi trường aga YpS (25°C)

Đường kính của khuẩn lạc vào ngày thứ 6 bằng 49,4mm, và màu sắc của khuẩn lạc là màu trắng. Mật độ của khuẩn lạc là cao và gần như tương tự so với *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. và *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer. Lượng sợi nấm trong không khí là ở mức vừa phải, tương tự so với *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. Và hơi ít hơn so với *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer.

(6) Điều kiện sinh trưởng trên môi trường aga Czapk-Dox (25°C)

Đường kính của khuẩn lạc vào ngày thứ 6 bằng 32,9mm, và màu sắc của khuẩn lạc là màu trắng. Mật độ của khuẩn lạc là rất thấp, cao hơn so với *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. và gần như tương tự so với *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer. Lượng sợi nấm trong không khí là nhỏ và gần như tương tự so với *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. và *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer.

(7) Điều kiện sinh trưởng trên môi trường aga bột yến mạch (25°C)

Đường kính của khuẩn lạc vào ngày thứ 6 bằng 59,2mm, và màu sắc của khuẩn lạc là màu trắng. Mật độ của khuẩn lạc là cao và gần như tương tự so với *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. và *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer. Lượng sợi nấm trong không khí là ở mức vừa phải, tương tự so với *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. và nhỏ hơn *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer.

(8) Điều kiện sinh trưởng trên môi trường thử nghiệm phenoloxidaza (25°C)

Trên môi trường dextroza khoai tây được bổ sung 0,5% axit tannic, không có sợi nấm nào được sinh trưởng vào ngày thứ 6 của quá trình nuôi cấy, thể hiện là không có dấu hiệu rỗ và màu sắc của môi trường xung quanh chất cấy hơi thay đổi thành màu nâu. Các kết quả tương tự cũng được thấy đối với *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. và *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer.

Trên môi trường dextroza khoai tây được bổ sung 0,5% axit galic, không có sợi nấm nào được sinh trưởng vào ngày thứ 6 của quá trình nuôi cấy và màu sắc của các phần xung quanh chất cấy được thay đổi thành màu nâu. Khi việc nuôi cấy được tiếp tục sau đó, thì sợi nấm có rỗ và đường kính của khuẩn lạc bằng 24,2mm vào ngày thứ 9 của quá trình nuôi cấy. Màu sắc của khuẩn lạc là màu trắng. Mật độ của khuẩn lạc là cao và gần như tương tự so với *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. Lượng sợi nấm trong không khí là nhỏ và gần như tương tự so với *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. Mặt khác, đối với *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer, không có rỗ nào cũng như không có sự sinh trưởng của sợi nấm nào được tìm thấy và chỉ có màu sắc của các phần xung quanh chất cấy được thay đổi thành màu nâu.

(9) Nhiệt độ sinh trưởng tối ưu: Sau khi cấy vào môi trường aga dextroza khoai tây mẫu sợi nấm có đường kính 5mm và nuôi cấy trước ở 25°C trong 2 ngày, các tác giả sáng chế đã nuôi cấy nó ở mỗi nhiệt độ. Khi tác giả sáng chế đo bán kính của khuẩn lạc 6 ngày sau đó, nhiệt độ sinh trưởng tối ưu là khoảng 28°C. Hơn nữa, sợi nấm hầu như không sinh trưởng ở 5°C và sinh trưởng rất kém ở 34°C.

(10) Độ pH sinh trưởng tối ưu: Sau khi khử trùng 25mL môi trường dạng lỏng PD, các tác giả sáng chế đã điều chỉnh độ pH từng khoảng 0,5 theo cách vô trùng bằng axit clohydric hoặc kali hydroxit nằm trong khoảng từ độ pH=3,0 đến độ pH=10,0. Tiếp theo, các tác giả sáng chế cấy vào đó mẫu sợi nấm có đường kính 5mm, tiến hành nuôi cấy tĩnh trong 15 ngày và sau đó đo mỗi khối lượng khô để phát hiện ra rằng độ pH

sinh trưởng tối ưu là khoảng 6,0. Hơn nữa, sự sinh trưởng của chủng hiện tại là tốt với độ pH nằm trong khoảng từ độ pH=4,5 đến độ pH=9,0.

Các kết quả của chủng có số lưu trữ NITE BP-1379

(1) Điều kiện sinh trưởng trên môi trường aga chứa tinh chất mạch nha (25°C)

Đường kính của khuẩn lạc vào ngày thứ 6 bằng 49,0mm, và màu sắc của khuẩn lạc là màu trắng. Mật độ của khuẩn lạc là rất thấp và gần như tương tự so với màu sắc của *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. và *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer. Lượng sợi nấm trong không khí là nhỏ, hơi nhỏ hơn một so với *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. và gần như tương tự so với *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer.

(2) Điều kiện sinh trưởng trên môi trường aga dextroza khoai tây (25°C)

Đường kính của khuẩn lạc vào ngày thứ 6 bằng 61,2mm, và màu sắc của khuẩn lạc là màu trắng. Mật độ của khuẩn lạc là cao và gần như tương tự so với *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. và *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer. Lượng sợi nấm trong không khí là lớn và hơi nhiều hơn so với *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. và *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer.

(3) Điều kiện sinh trưởng trên môi trường aga Sabouraud (25°C)

Đường kính của khuẩn lạc vào ngày thứ 6 bằng 39,8mm, và màu sắc của khuẩn lạc là màu trắng. Mật độ của khuẩn lạc là cao và gần như tương tự so với *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. và *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer. Lượng sợi nấm trong không khí là lớn, gần như tương tự so với *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. và hơi nhiều hơn so với *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer.

(4) Điều kiện sinh trưởng trên môi trường aga nấm mốc tổng hợp (25°C)

Đường kính của khuẩn lạc vào ngày thứ 6 bằng 19,5mm, và màu sắc của khuẩn lạc là màu trắng. Mật độ của khuẩn lạc là thấp, thấp so với *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. và gần như tương tự so với *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer. Lượng sợi nấm trong không khí là ở mức vừa phải, nhiều hơn so với *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. và hơi ít hơn so với *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer.

(5) Điều kiện sinh trưởng trên môi trường aga YpS (25°C)

Đường kính của khuẩn lạc vào ngày thứ 6 bằng 63,5mm, và màu sắc của khuẩn lạc là màu trắng. Mật độ của khuẩn lạc là ở mức cao và gần như tương tự như mật độ của *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. và *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer. Lượng sợi nấm trong không khí là ở mức vừa phải, gần như tương tự so với *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. Và hơi nhỏ hơn so với *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer.

(6) Điều kiện sinh trưởng trên môi trường aga Czapk-Dox (25°C)

Đường kính của khuẩn lạc vào ngày thứ 6 bằng 60,4mm, và màu sắc của khuẩn lạc là màu trắng. Mật độ của khuẩn lạc là rất thấp, cao hơn so với *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. và gần như tương tự so với *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer. Lượng sợi nấm trong không khí là nhỏ và gần như tương tự so với *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. và *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer.

(7) Điều kiện sinh trưởng trên môi trường aga bột yến mạch (25°C)

Đường kính của khuẩn lạc vào ngày thứ 6 bằng 75,6mm, và màu sắc của khuẩn lạc là màu trắng. Mật độ của khuẩn lạc là ở mức cao và gần như tương tự với mật độ của *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. và *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer. Lượng sợi nấm trong không khí là ở mức vừa phải, gần như tương tự so với *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. và nhỏ hơn so với *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer.

(8) Điều kiện sinh trưởng trên môi trường thử nghiệm phenoloxidaza (25°C)

Trên môi trường dextroza khoai tây được bổ sung 0,5% axit tannic, không có sợi nấm nào được sinh trưởng vào ngày thứ 6 của quá trình nuôi cấy, thể hiện là không có dấu hiệu rỗ và màu sắc của môi trường xung quanh chất cấy hơi thay đổi thành màu nâu. Các kết quả tương tự cũng được phát hiện đối với *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. và *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer.

Trên môi trường dextroza khoai tây được bổ sung 0,5% axit gallic, không có sợi nấm nào được sinh trưởng vào ngày thứ 6 của quá trình nuôi cấy và màu sắc của các phần xung quanh chất cấy được thay đổi thành màu nâu. Khi việc nuôi cấy được tiếp tục sau đó, thì sợi nấm có rỗ và đường kính của khuẩn lạc bằng 8,0mm vào ngày thứ 9 của quá trình nuôi cấy. Màu sắc của khuẩn lạc là màu trắng. Mật độ của khuẩn lạc là cao và gần như tương tự so với *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. Lượng sợi nấm trong không khí là nhỏ và gần như tương tự so với *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. Mặt khác, đối

với *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer, không có rễ cũng như không có sự sinh trưởng của sợi nấm nào được tìm thấy và chỉ có màu sắc của các phần xung quanh chất cấy được thay đổi thành màu nâu.

(9) Nhiệt độ sinh trưởng tối ưu: Sau khi cấy vào môi trường aga dextroza khoai tây mẫu sợi nấm có đường kính 5mm và nuôi cấy trước ở 25°C trong 2 ngày, các tác giả sáng chế đã nuôi cấy nó ở mỗi nhiệt độ. Khi tác giả sáng chế đo bán kính của khuẩn lạc 6 ngày sau đó, thì nhiệt độ sinh trưởng tối ưu là khoảng 28°C. Hơn nữa, sợi nấm hầu như không sinh trưởng ở 5°C và sinh trưởng rất kém ở 34°C.

(10) Độ pH sinh trưởng tối ưu: Sau khi khử trùng 25mL môi trường dạng lỏng PD, các tác giả sáng chế đã điều chỉnh độ pH ở từng khoảng 0,5 theo cách vô trùng bằng axit clohydric hoặc kali hydroxit nằm trong khoảng từ độ pH=3,0 đến độ pH=10,0. Tiếp theo, tác giả sáng chế cấy vào môi trường mẫu sợi nấm có đường kính 5mm, tiến hành nuôi cấy tĩnh trong 15 ngày và sau đó đo mỗi khối lượng khô để thấy rằng độ pH sinh trưởng tối ưu là khoảng 6,5. Hơn nữa, sự sinh trưởng của chủng hiện tại là tốt với độ pH nằm trong khoảng từ độ pH=4,5 đến độ pH=9,0.

Ví dụ 7

Các tác giả sáng chế đã để nấm nảy mầm từ các chủng có số lưu trữ NITE BP-1378 và số lưu trữ NITE BP-1379 theo cách tương tự với phương pháp nuôi cấy nấm trong Ví dụ 2. bảng 5 thể hiện các đặc điểm nông học, đặc điểm hình thái học, v.v. theo kết quả nuôi cấy. Màu sắc của mũ, hình dạng của thân v.v. là gần với màu sắc và hình dạng của *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer hơn so với *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. Đối với màu sắc, các tác giả sáng chế dùng để chỉ biểu đồ màu sắc RHS.

Bảng 5

			NITE BP-1378	NITE BP-1379
Các đặc điểm nông học	Số ngày nuôi cấy		21 ngày	21 ngày
	Số ngày sinh trưởng		12 ngày	12 ngày
	Sản lượng		Sản lượng 31,6%	Sản lượng 31,6%
Đặc điểm hình thái học	Mũ	Hình dạng	Loại lồi và mép được cuộn vào trong. Khi trưởng thành, phần tâm của mũ có vết lõm không đáng kể và cuộn lên trên, mép bị yếu. Bề mặt là nhẵn.	Loại phẳng và mép được cuộn vào trong. Khi trưởng thành, phần tâm của mũ có vết lõm không đáng kể và cuộn lên trên, mép bị yếu. Bề mặt là

				nhấn.
		Kích cỡ	30mm đến 40mm	35mm đến 45mm
		Màu sắc	Màu xám-nâu (N199A, nhóm màu xám-nâu)	Màu xám-nâu (N199B, nhóm màu xám-nâu), các mẫu sợi mỏng được thấy.
	Thân	Hình dạng kích cỡ	Loại hình trụ 65-75mm x 8-9mm	Loại hình trụ 60-65mm x 8-10mm
		màu sắc	Màu trắng (155D, nhóm màu trắng) bề mặt là nhẵn và phần bên trong là dạng rắn.	Màu trắng (155D, nhóm màu trắng) bề mặt là nhẵn và phần bên trong là dạng rắn.
	Phiến		Men xuống trên thân và đầu đỉnh là nhẵn. Màu trắng xám (156B, nhóm màu trắng xám)	Men xuống trên thân và đầu đỉnh là nhẵn. Màu trắng xám (156A, nhóm màu trắng xám)
	Đám	Hình dạng	Dạng chùy dài, loại 4 bào tử	Dạng chùy dài, loại 4 bào tử
		Kích cỡ	23-27 μ m x 6-9 μ m	24-27 μ m x 5-7 μ m
	Bào tử đám	Hình dạng	Loại hình trụ	Loại hình trụ
		Kích cỡ	9,0 đến 11,0 μ m x 3,5 đến 5,0 μ m	6,5 đến 10,5 μ m x 2,5 đến 4,5 μ m
		Màu sắc của bào tử	Màu trắng	Màu trắng
	Cheilocy stidium	Hình dạng	Dạng chùy	Dạng chùy
		Kích cỡ	18,0 đến 22,0 μ m x 4,5 đến 7,0 μ m	19,0 đến 23,0 μ m x 4,0 đến 7,0 μ m
Vị, hương	Vị		Vị và hương đơn nhất	Vị và hương đơn nhất
	Kết cấu thức ăn		Cứng vừa phải, giòn	Cứng vừa phải, giòn

Ví dụ 8

Các tác giả sáng chế đã kiểm tra trình tự bazơ của mỗi chủng trong số *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer, *P. nebrodensis* (DC.:Fr.) Quel., *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel., *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. var. *elaeoselini*, chủng có số lưu trữ NITE BP-1378 làm thể lai khác loài và chủng có số lưu trữ NITE BP-1379 làm thể lai khác loài trong vùng đệm phiên mã trong (sau đây gọi là vùng ITS - internal transcription spacer) và so sánh chúng.

(1) Xác định trình tự bazơ trong vùng ITS

Từ sợi nấm được thu hoạch và được làm đông khô của sáu chủng, nghĩa là, *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer, *P. nebrodensis* (DC.:Fr.) Quel., *P. eryngii* (DC.:Fr.)

Quel., *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. var. *elaeoselini*, *P. nebrodensis* (DC.:Fr.) Quel., chúng có số lưu trữ NITE BP-1378 và chúng có số lưu trữ NITE BP-1379 mà được ủ trong đĩa môi trường PDA, các tác giả sáng chế đã chiết một cách tương ứng ADN bằng cách sử dụng kit chiết ADN “Plant Geno-DNA-Template (TaKaRa Inc.).” Các tác giả sáng chế đã sử dụng mỗi ADN được chiết làm mẫu và ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG) và ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC) là một cặp đoạn mồi để khuếch đại vùng ITS của ADN ribosom bằng phương pháp PCR (Polymerase Chain Reaction), tinh chế sản phẩm PCR thu được theo cách này và sau đó xác định trình tự bazơ bằng cách giải trình tự. Tác giả sáng chế đã yêu cầu Bex Co., Ltd. thực hiện việc giải trình tự bằng phương pháp nhuộm trình tự kết thúc bằng cách sử dụng thiết bị ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems Japan).

(2) Phân tích các đặc điểm di truyền

Dựa trên trình tự bazơ trong vùng ITS của mỗi trong số sáu chủng được kể đến trên đây, các tác giả sáng chế đã tính toán khoảng cách tiến hoá với kimura 2 tham số bằng cách sử dụng chương trình MEGA (5.05), trong đó Fig.1 thể hiện mối quan hệ tiến hoá theo phân tử bằng phương pháp UPGMA. Trong trường hợp này, tác giả sáng chế đã thiết lập trị số cuốn-băng đến 1000.

Dựa vào các kết quả này, tác giả sáng chế đã thực hiện việc nhận dạng cuối cùng đối với nấm được sử dụng trong các ví dụ theo sáng chế để phát hiện ra rằng NITE BP-1378 là tương đồng ở mức cao với trình tự của “*P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel.”, nấm *Pleurotus* spp. và NITE BP-1379 là tương đồng ở mức cao với cả hai trình tự của “*P. eryngii*” và “*P. ostreatus*.” Kết quả này đã thiết lập rằng NITE BP-1379 có cả hai gen của *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer và *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. Mặt khác, NITE BP-1378 là gần với *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. trong vùng ITS, nhưng hình dạng của nấm là gần với *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer hơn so với *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. dựa vào kết quả của Ví dụ 7, và do đó qua xem xét tổng thể, tác giả sáng chế đã xác định rằng nó có các tính trạng hỗn hợp của *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer và *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel..

Khả năng ứng dụng trong công nghiệp

Sáng chế là hữu dụng trong việc sản xuất và tạo ra các loài nấm mới, tạo ra các sản phẩm đã qua chế biến bằng cách sử dụng các loài nấm mới, tạo ra các thực đơn sử dụng các loài nấm mới, v.v. số, trong lĩnh vực nông nghiệp và thực phẩm.

Số lưu trữ

MH006403 NITE BP-1378

MH006404 NITE BP-1379

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp phát triển thể lai khác loài của *Pleurotus* spp., phương pháp này bao gồm bước lai chéo *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer, là một bên bố mẹ để lai, với *P. nebrodensis* (DC.:Fr.) Quel., *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. var. *tuoliensis* C.J. Mou hoặc *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. var. *ferulae* Lanzi, là bên bố mẹ còn lại để lai, sử dụng các sợi nấm đơn nhân của chúng mà có thể lai chéo giữa các sợi nấm đơn nhân này.
2. Thể lai khác loài của *Pleurotus* spp. thu được bằng cách lai chéo *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer, là một bên bố mẹ để lai, với *P. nebrodensis* (DC.:Fr.) Quel., *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. var. *tuoliensis* C.J. Mou hoặc *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. var. *ferulae* Lanzi, là bên bố mẹ còn lại để lai, sử dụng các sợi nấm đơn nhân của chúng mà có thể lai chéo giữa các sợi nấm đơn nhân này.
3. Phương pháp phát triển thể lai khác loài của *Pleurotus* spp. bao gồm bước lai chéo thể lai khác loài của *Pleurotus* spp. theo điểm 2, là một bên bố mẹ để lai, với *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. hoặc *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. var. *elaeoselini*, là bên bố mẹ còn lại để lai, sử dụng các sợi nấm đơn nhân của chúng mà có thể lai chéo giữa các sợi nấm đơn nhân này.
4. Thể lai khác loài của *Pleurotus* spp. thu được bằng cách lai chéo thể lai khác loài của *Pleurotus* spp. theo điểm 2, là một bên bố mẹ để lai, với *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. hoặc *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. var. *elaeoselini*, là thể bên bố mẹ để lai còn lại, sử dụng các sợi nấm đơn nhân của chúng mà có thể lai chéo giữa các sợi nấm đơn nhân này.
5. Phương pháp phát triển thể lai khác loài của *Pleurotus* spp. bao gồm bước thu thể lai của hai giống bất kỳ trong số *P. nebrodensis* (DC.:Fr.) Quel., *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. var. *tuoliensis* C.J. Mou, *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. var. *ferulae* Lanzi, *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. và *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. var. *elaeoselini* theo cách mà một bên bố mẹ là *P. nebrodensis* (DC.:Fr.) Quel., *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. var. *tuoliensis* C.J. Mou hoặc *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. var. *ferulae* Lanzi, và lai chéo thể lai này với *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer, sử dụng các sợi nấm đơn nhân của chúng mà có thể lai chéo giữa các sợi nấm đơn nhân này.
6. Thể lai khác loài của *Pleurotus* spp. thu được bằng cách thu thể lai của hai typ bất kỳ trong số *P. nebrodensis* (DC.:Fr.) Quel., *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. var. *tuoliensis*

C.J. Mou, *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. var. *ferulae* Lanzi, *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. và *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. var. *elaeoselini* theo cách mà một bên bố mẹ là *P. nebrodensis* (DC.:Fr.) Quel., *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. var. *tuoliensis* C.J. Mou hoặc *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. var. *ferulae* Lanzi và lai chéo thể lai với *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer, sử dụng các sợi nấm đơn nhân của chúng mà có thể lai chéo giữa các sợi nấm đơn nhân này.

7. Phương pháp phát triển thể lai khác loài của *Pleurotus* spp. theo điểm 1, 3 hoặc 5, trong đó thể lai thu được bằng cách lai chéo hai giống bố mẹ trong số *P. nebrodensis* (DC.:Fr.) Quel., *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. var. *tuoliensis* C.J. Mou và *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. var. *ferulae* Lanzi được sử dụng thay cho *P. nebrodensis* (DC.:Fr.) Quel., *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. var. *tuoliensis* C.J. Mou hoặc *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. var. *ferulae* Lanzi, sử dụng các sợi nấm đơn nhân của chúng mà có thể lai chéo giữa các sợi nấm đơn nhân này.

8. Phương pháp phát triển thể lai khác loài của *Pleurotus* spp. theo điểm 3, 5 hoặc 7, trong đó thể lai thu được bằng cách lai chéo *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. với *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. var. *elaeoselini* được sử dụng thay cho *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. hoặc *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. var. *elaeoselini*, sử dụng các sợi nấm đơn nhân của chúng mà có thể lai chéo giữa các sợi nấm đơn nhân này.

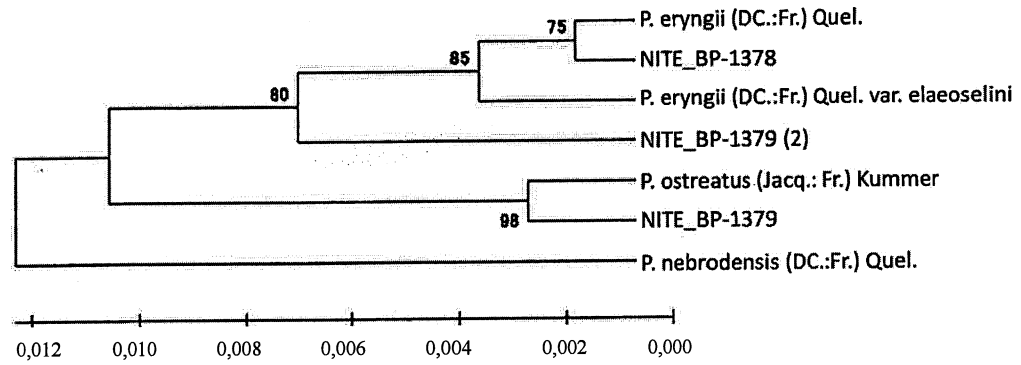
9. Thể lai khác loài của *Pleurotus* spp. thu được bằng phương pháp theo điểm 7 hoặc điểm 8.

10. Phương pháp nuôi cấy thể lai khác loài của *Pleurotus* spp. bao gồm bước tạo ra nấm bằng cách cấy thể lai khác loài của *Pleurotus* spp. theo điểm 2, 4, 6 hoặc 9 vào môi trường nuôi cấy nấm.

11. Thể lai khác loài *Pleurotus* spp. (NITE BP-1378) hoặc *Pleurotus* spp. (NITE BP-1379), thu được bằng cách sử dụng *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer, *P. nebrodensis* (DC.:Fr.) Quel., *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. và *P. eryngii* (DC.:Fr.) Quel. var. *elaeoselini* làm bố mẹ.

12. Phương pháp nuôi cấy thể lai khác loài của *Pleurotus* spp., bao gồm bước tạo ra thể lai khác loài của *Pleurotus* spp. (NITE BP-1378) hoặc *Pleurotus* spp. (NITE BP-1379), bằng cách cấy thể lai này vào môi trường nuôi cấy nấm.

[Fig. 1]



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Hokto Kabushikikaisya

<120> THỂ LAI KHÁC LOÀI CỦA PLEUROTUS SPP., PHƯƠNG PHÁP PHÁT TRIỂN VÀ PHƯƠNG PHÁP NUÔI CẤY THỂ LAI KHÁC LOÀI CỦA PLEUROTUS SPP.

<160>8

<210>1

<211>572

<212>ADN

<213>Pleurotus ostreatus (Jacq.:Fr.) Kummer

<400>1

```

ttgttgctgg cctctagggg catgtgcacG cttcactagt ctttcacccc tgtgaacttt 60
tgatagatct gtgaagtcgt ctttcaagtC gtcagacttg gtttgctggg atttaaactgt 120
ctcgggtgtga caacgcagtc tatttactta acacacccca aatgtatgtc tacgaatgtc 180
atttaaatggg ccttctgcct ataaaccata atacaacttt caacaacgga tctcttggct 240
ctcgcacatga tgaagaacgc agcgaaatgc gataagtaat gtgaattgca gaattcagtg 300
aatcatcgaa tctttgaacg caccttgccg cccttggtat tccgaggggc atgcctgttt 360
gagtgtcatt aaattctcaa actcactttg gttttttcca attgtgatgt ttggattgtt 420
gggggctgct ggccttgaca ggtcggctcc tcttaaagtc attagcagga cttctcattg 480
cctctgcgca tgatgtgata attatcactc atcaatagca cgcagaatag agtccagctc 540
tctaatacgtc cgcaaggaca attgacaatt ga 572

```

<210>2

<211>629

<212>ADN

<213>Pleurotus eryngii (DC.:Fr.) Quel. ver. nebrodensis Inzenga

<400>2

```

ttgttgctgg cctctagggg catgtgcacg cttcactagt ctttcaaccc ctgtgaactt 60
ttgatagatc tgtgaagtcg tctctcaagt cgtcagactt ggtttgctgg gatttaaATG 120
tcttagtgtg actacgcagt ctatttactt atacaccccc aaatgtatgt ctacgaatgt 180
catttaaatgg gccttctgcc tataaaccat aatacaactt tcaacaacgg atctcttggc 240
tctcgcacat atgaagaacg cagcgaaatg cgataagtaa tgtgaattgc agaattcagt 300
gaatcatcga atctttgaac gcaccttgcg ccccttggtt ttccgagggg catgcctgtt 360
tgagtgtcat taaattctca aactcactct ggtttttcca attgtgatgt ttggattgtt 420
gggggctgct ggccttgaca ggtcggctcc tcttaaagtc attagcagga cttctcattg 480
cctctgcgca tgatgtgata attatcactc atcaatagca cgcatagaat gagtctggct 540
ttctaaccgt ccgcaaggac aatttgacaa tttgacctca aatcaggtag gactacccgc 600
tgaacttaag catatcaata agcggagga 629

```

<210>3

<211>555

<212>ADN

<213>Pleurotus eryngii (DC.:Fr.) Quel

<400>3

```

ttgttgctgg cctctagggg catgtgcacg cttcactagt ctttcacccc tgtgaacttt 60
tgatagatct gtgaagtcgt ctctcaagtc gtttagacttg gtttgctggg atgtaaacgt 120
ctcgggtgtga ctacgcagtc tatttactta taacacccca aatgtatgtc tacgaatgtc 180
atttaaaggg ccttgtgcct ataaaccata atacaacttt caacaacgga tctcttggct 240
ctcgcatcga tgaagaacgc agcgaaatgc gataagtaat gtgaattgca gaattcagtg 300
aatcatcgaa tctttgaacg caccttgccg cccttggtat tccgaggggc atgcctgttt 360
gagtgtcatt aaattctcaa actcactctg gtttttccaa ttgtgatgtt tggattgttg 420
ggggctgctg gccttgacag gtcggctcct cttaaagca ttagcaggac ttctcattgc 480
ctctgcgcgt gatgtgataa ctatcactca tcaatagcac gcatgaatag agtttggctc 540
tctaaccgtc cgcaa 555

```

<210>4

<211>605

<212>ADN

<213>Pleurotus eryngii (DC.:Fr.) var. elaeoselini

<400>4

```

ttgttgctgg cctctagggg catgtgcacg cttcactagt ctttcaaccc ctgtgaactt 60
ttgatagatc tgtgaagtcg tctctcaagt cgtagactt ggtttgctgg gatgtaaacg 120
tctcgggtgtg actacgcagt ctatttactt ataacacccc aaatgtatgt ctacgaatgt 180
catttaaagg gccttgtgcc tataaatcat aatacaactt tcaacaacgg atctcttggc 240
tctcgcatcg atgaagaacg cagcgaaatg cgataagtaa tgtgaattgc agaattcagt 300
gaatcatcga atctttgaac gcaccttgcg ccccttggtt ttccgagggg catgcctgtt 360
tgagtgtcat taaattctca aactcactct ggtttttcca attgtgatgt ttggattgtt 420
gggggctgct ggccttgaca ggtcggctcc tcttaaagtc attagcagga cttctcattg 480
cctctgcgca tgatgtgata attatcactc atcaatagca cgcatagaata gagtctggct 540
ctctaaccgt ccgcgaggac aatttgacaa ttgacctca aatcaggtag gactaccgcg 600
tgaac 605

```

<210>5

<211>584

<212>ADN

<213>Pleurotus sp. NITE BP-1378

<400>5

```

ttgttgctgg cctctagggg aatgtgcacg cttcactagt ctttcacccc tgtgaacttt 60
tgatagatct gtgaagtcgt ctctcaagtc gttagacttg gtttgctggg atgtaaactgt 120
ctcgggtgtga ctacgcagtc tatttactta taacacccca aatgtatgtc tacgaatgtc 180
atttaaagggt ccttgtgcct ataaaccata atacaacttt caacaacgga tctcttggct 240
ctcgcatcga tgaagaacgc agcgaaatgc gataagtaat gtgaattgca gaattcagtg 300
aatcatcgaa tctttgaacg caccttgccg cccttggtat tccgaggggc atgcctgttt 360
gagtgtcatt aaattctcaa actcactctg gtttttccaa ttgtgatgtt tggattgttg 420
ggggctgctg gccttgacag gtcggctcct cttaaagtca ttagcaggac ttctcattgc 480
ctctgcgcgt gatgtgataa ctatcactca tcaatagcac gcataaatag agtctggctc 540
tctaaccgtc cgcaaggaca attgacaatt gactcaatca ggta 584

```

<210>6

<211>566

<212>ADN

<213>Pleurotus sp. NITE BP-1379

<400>6

```

ttgttgctgg cctctagggg catgtgcacg cttcactagt ctttcacccc tgtgaacttt 60
tgatagatct gtgaagtcgt ctytcaagtc gtyagacttg gtttgctggg atktaaactgt 120
ctcgggtgtga cwacgcagtc tatttactta wmacacccca aatgtatgtc tacgaatgtc 180
atttaaawggg ccttgtgcct ataaaccata atacaacttt caacaacgga tctcttggct 240
ctcgcatcga tgaagaacgc agcgaaatgc gataagtaat gtgaattgca gaattcagtg 300
aatcatcgaa tctttgaacg caccttgccg cccttggtat tccgaggggc atgcctgttt 360
gagtgtcatt aaattctcaa actcactytc gttttttcca attgtgatgt ttggattgtt 420
gggggctgct ggccttgaca ggtcggctcc tcttaaagtgc attagcagga cttctcattg 480
cctctgcgca tgatgtgata aytatcactc atcaatagca cgcakaatag agtccrgctc 540
tctaaycgtc cgcaaggaca attgac 566

```