



(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)



1-0029420

(51)⁷ A01N 63/04; A01P 13/00

(13) B

(21) 1-2016-03193

(22) 23/01/2015

(86) PCT/IN2015/000046 23/01/2015

(87) WO2015/111082 30/07/2015

(30) 327/CHE/2014 27/01/2014 IN

(45) 25/09/2021 402

(43) 27/02/2017 347A

(73) 1. PRAHARAJU LAXMINARAYANA (IN)

35E, Phase V, IDA Cherlapally, Hyderabad - 500051, India

2. KUMAR SINGH, Ajay (IN)

35E, Phase V, IDA Cherlapally, Hyderabad - 500051, India

(72) KUMAR SINGH, Ajay (IN).

(74) Công ty TNHH Trường Xuân (AGELESS CO.,LTD.)

(54) CHẾ PHẨM DIỆT CỎ ĐỂ DIỆT TRỪ CÂY LỤC BÌNH

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm diệt cỏ bao gồm thuốc diệt cỏ thu được từ *Setosphaeria monoceras* AGWH#11 được nộp lưu tại NCIM và IMTECH với số nộp lưu lần lượt là NCIM 1370, MTCC 5974, một trong số chất hoạt động bề mặt và dầu khoáng, và chất kháng sinh hữu ích để kiểm soát cây lục bình.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chế phẩm diệt cỏ có chứa chất diệt cỏ mới được phân lập từ *Setosphaeria monoceras*, hữu ích trong kiểm soát sinh học tiềm năng đối với cây lục bình.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Cây lục bình (*Eichhornia sp.*) thuộc chi cỏ độc hại sống dưới nước. Chi này bao gồm loài *Eichhornia azurea*, *Eichhornia crassipes*, *Eichhornia diversifolia*, *Eichhornia paniculata*. Ở Ấn Độ, hơn 200.000 ha bề mặt nước bị nhiễm bởi thực vật từ chi này. Nó đặt ra vấn đề nghiêm trọng về kinh tế, xã hội và môi trường ở Ấn Độ và nhiều nước ở vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới. Nó thể hiện khả năng sinh sản của thực vật, khả năng đáp ứng, yêu cầu về dinh dưỡng và kháng lại môi trường bất lợi làm cho không có khả năng diệt trừ nó và khó kiểm soát. Vấn đề về sự lây lan của cây lục bình theo sông hồ và kênh rạch, điều này làm lãng phí nước do tăng tốc độ thoát hơi nước và cạnh tranh mạnh với cá và sinh vật phù du và do đó thay đổi chất lượng tự nhiên của nước như kết quả của sự phân hủy thực vật và sự tiêu thụ oxy hòa tan và cuộc sống dưới nước. Nó là thực vật lớn trôi nổi trong nước, hình thức sinh sản là cả sinh sản sinh dưỡng bằng mẫu thân được tạo ra từ chồi nách trên thân bò, và cả sinh sản hữu tính bằng hạt.

Nhiều phương pháp khác nhau được thử để kìm hãm sự sinh trưởng của cỏ. Thuốc diệt cỏ được sử dụng thường xuyên nhất, vì chúng tạo ra hoạt tính ngay lập tức, mặc dù, chúng tốn kém và có thể có tác dụng độc hại nếu không được sử dụng theo đúng hướng dẫn của nhà sản xuất. Hiện tại đang có nhiều lo ngại về việc sử dụng thuốc trừ cỏ hóa học tổng hợp, ví dụ, glyphosat, để kiểm soát cỏ dại. Do đó, việc sử dụng thuốc trừ cỏ hóa học tổng hợp đã bị cấm hoặc hạn chế ở nhiều vùng trên thế giới.

Vì khả năng sinh sản và sự sinh trưởng nhanh của cây lục bình, cần thiết sử dụng bộ chất kiểm soát sinh học để tăng áp lực sinh học để giảm sự hồi sinh của quần thể. Trong số kẻ thù của cây lục bình, yếu tố gây bệnh thực vật và chất chuyển hóa của nó có thể hữu ích vì, chúng thường đặc hiệu vật chủ (không có nguy cơ cho cây trồng, thực vật hoặc động vật địa phương), dễ nhân giống và phân tán và tự duy trì, do đó giảm nhu cầu sử dụng lặp lại. Tuy nhiên, như là trường hợp đối với thuốc trừ sâu sinh khác, thuốc diệt cỏ

của vi sinh vật bị bất hoạt trong môi trường tiếp xúc với nhiệt độ, độ ẩm bức xạ cực tím và thấp. Trong thực tế, vấn đề chính của thuốc trừ sâu sinh là sản xuất quy mô lớn của họ trong một công thức có thể cho phép một ứng dụng thành công trong lĩnh vực này. Trong số các tác nhân gây bệnh, nấm là những tác nhân gây bệnh thực vật tự nhiên quan trọng nhất. Nhiều tác nhân gây bệnh nấm được kể đến trong tài liệu làm chất kiểm soát sinh học tiềm năng đối với cây lục bình. Trong số chúng là *Cercosporapiaropi* (= *C. rodmanii*), *Acremoniumzonatum*, *Alternariaeichhorniae*, *Myrotheciumrorida*, *Rhizoctoniasolani* và *Uredo eichhorniae*. *A. eichhorniae* và *C. piaropi*, đã được nghiên cứu về sinh học, khả năng kiểm soát sinh học, chế phẩm đặc hiệu vật chủ và được kiểm tra trong điều kiện thí nghiệm.

Tuy nhiên, hiện không có thuốc diệt cỏ sinh học thương mại nào đối với cây lục bình. Kiểm soát sinh học làm giảm sức sống cỏ dại, kết hợp với điều kiện môi trường, hiện tượng học của thực vật và sử dụng tích hợp các phương án quản lý khác. Do đó việc sử dụng các thuốc diệt cỏ sinh học làm chất kiểm soát sinh học đang thu hút sự chú ý đáng kể. Thuốc diệt cỏ sinh học thường đặc hữu và được sử dụng ngập để kiểm soát thảm thực vật không mong muốn. Cụ thể, thuốc diệt cỏ nấm là thuốc diệt cỏ sinh học có nguồn gốc từ yếu tố gây bệnh ở thực vật là nấm. Mục tiêu chính trong việc đối phó với cỏ dại là để giảm sự cạnh tranh từ cỏ dại để cho phép thực vật mong muốn phát triển một cách tự do. Theo đó, kiểm soát sinh học cỏ dại nhằm đến mối quan tâm về tác động của hóa chất lên sự toàn vẹn môi trường và sức khỏe con người.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất chế phẩm diệt cỏ thích hợp để kiểm soát cây lục bình, chế phẩm chứa chất diệt cỏ từ *Setosphaeria* sp, cụ thể là, chủng AGWH#11. Chủng này được lưu trong các sáng chế của IMTECH theo các điều khoản của Hiệp ước Budapest và được chỉ định số nộp lưu là MTCC 5974. Nó cũng được lưu ở NCIM dưới số nộp lưu 1370. *Setosphaeria monoceras* AGWH#11 được chỉ định số nộp lưu của IMTECH là MTCC 5974 và số nộp lưu của NCIM là 1370 sẽ không thể thu hồi và không có hạn chế hoặc điều kiện được công bố công khai khi được cấp bằng sáng chế. Theo khía

cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp kiểm soát sự sinh trưởng của cây lục bình, bao gồm bước cho cây lục bình tiếp xúc với chế phẩm diệt cỏ theo sáng chế.

Khía cạnh khác nữa của sáng chế đề cập đến việc sử dụng chủng *Setosphaeria* dùng để sản xuất chất diệt cỏ có hiệu quả để kiểm soát sự sinh trưởng của cây lục bình. Chủng được sử dụng tốt hơn là chủng có đặc điểm đặc trưng của chủng *Setosphaeria* AGWH#11 được nộp lưu tại IMTECH dưới số nộp lưu MTCC 5974.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất phép phân tích trình tự 18s rARN đã thể hiện sự tương đồng nucleotit 96% của nấm với *Setosphaeria monoceras*. (AGBIO chỉ ra là AGWH#11/NCIM1370/MTCC 5974) mà còn chỉ ra sự khác nhau về nucleotit của nấm này với các chi khác đã biết của Bipolaris, Pleosporaceae, Cochiliobolus, Alternaria bao gồm thuốc diệt cỏ thay thế khác khả dụng cho môi trường cho thuốc diệt cỏ hóa học tổng hợp để kiểm soát cỏ dại, như cây lục bình.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất chế phẩm diệt cỏ để kiểm soát cây lục bình. Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất phương pháp kiểm soát cây lục bình.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất chế phẩm thích hợp để kiểm soát cây lục bình, chế phẩm này chứa chất diệt cỏ từ *Setosphaeria monoceras*. *Setosphaeria monoceras* tốt hơn là chủng có đặc điểm đặc trưng của *Setosphaeria monoceras* (MTCC 5974).

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập phương pháp kiểm soát sự sinh trưởng của cây lục bình, bao gồm bước cho một lượng có hiệu quả chế phẩm diệt cỏ theo sáng chế tiếp xúc với vùng kiểm soát cây lục bình.

Theo khía cạnh khác nữa, sáng chế đề cập đến việc sử dụng *Setosphaeria monoceras* để kiểm soát sự sinh trưởng của cây lục bình. Chủng được sử dụng tốt hơn là chủng có đặc điểm đặc trưng của *Setosphaeria monoceras* AGWH#11 được nộp lưu tại IMTECH và nhận số nộp lưu là MTCC 5974 và cuối cùng được chỉ ra là *Setosphaeria monoceras*.

Khía cạnh khác nữa của sáng chế đề cập đến việc nghiên cứu toàn bộ hệ gen và nghiên cứu phân tử *Setosphaeria monoceras*.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 minh họa mối quan hệ phát sinh loài của nấm với loài được chọn từ các chi khác căn cứ vào gen 16S ARN theo sáng chế;

Fig. 2 minh họa HPLC thường, dữ liệu giải pháp cột pha ngược C18 của chất diệt cỏ (phytotoxin) theo sáng chế;

Fig. 3 minh họa đặc điểm vĩ mô của chủng theo sáng chế;

Fig. 4 minh họa đặc điểm vi mô của chủng theo sáng chế;

Fig. 5 và Fig. 6 minh họa sự phân bố điểm chuẩn cơ bản, đầu trái (R1) và phải (R2) của đoạn đọc kết đôi của mẫu theo sáng chế;

Fig. 7 và Fig. 8 minh họa sự phân bố chế phẩm cơ bản của đầu trái và phải của trình tự đoạn đọc kết đôi của mẫu nấm theo sáng chế;

Fig. 9 và Fig. 10 minh họa sự phân bố GC của đầu trái và phải của trình tự đoạn đọc kết đôi của mẫu nấm theo sáng chế;

Fig. 11 minh họa sự phân bố giá trị BLASTX E của mẫu nấm theo sáng chế;

Fig. 12 minh họa kết quả được chú giải của 15 sinh vật hàng đầu được phát hiện trong BLASTX của mẫu nấm theo sáng chế;

Fig. 13 minh họa 13 đối tượng hàng đầu trong hạng mục chức năng sinh học được xác định bằng cách sử dụng chú giải bản thể học gen của mẫu theo sáng chế;

Fig. 14 minh họa 13 đối tượng hàng đầu trong chức năng phân tử được xác định bằng sử dụng chú giải bản thể học gen của mẫu theo sáng chế;

Fig. 15 minh họa 13 đối tượng hàng đầu trong chức năng tế bào được xác định bằng sử dụng chú giải bản thể học gen của mẫu theo sáng chế;

Bảng 1: Hiệu quả của AGWH#11 lên cây lục bình;

Bảng 2: Sự giảm sinh khối của cây lục bình;

Bảng 3: Hiệu quả của AGWH#11 lên lá được tách ra của cây lục bình;

Bảng 4: Phản ứng của thử nghiệm cây trồng, họ tương tự và cây gia vị đối với tính nhạy cảm;

Bảng 5: Nấm thu được từ cây lục bình;

Bảng 6: Mầm bệnh nấm thu được từ cây lục bình (thử nghiệm được áp dụng cho lá tách ra của cây lục bình);

Bảng 7: Vòng sàng lọc thứ hai của chủng phân lập được;

Bảng 8. Thực vật được sử dụng trong thử nghiệm phân lập AGWH#11 đặc hiệu vật chủ;

Bảng 9: Sự so sánh giữa trình tự ADN được tiến hành giữa các loài AGWH#11 sp. phân lập;

Bảng 10: Sự phát triển của các triệu chứng trên cây lục bình do nhiễm AGWH#11 suốt 20 ngày;

Bảng 11: Phân tích sinh học hợp chất được chiết bởi dung môi từ AGWH#11;

Bảng 12: Thử nghiệm tương thích của các công thức khác nhau của AGWH#11 bởi phân tích sinh học tổng thể ở thực vật.

Mô tả chi tiết sáng chế

Mục đích chính của sáng chế là đề xuất thuốc diệt cỏ mới có hiệu quả chống lại cây lục bình. Mục đích khác của sáng chế là đề xuất thuốc diệt cỏ chứa dịch lọc nuôi cấy không chứa tế bào của *S. monoceras* MTCC 5974 với chất phụ gia hoặc chất mang. Mỗi quan hệ phát sinh của loài được chọn từ các chi *Setosphaeria monoceras*, căn cứ vào gen 16S ARN, đã được xác định. Trong khảo sát ở Village AdaviRamanpalam, PenuballiMandal, Khammam District, Andhra Pradesh, loài nấm mới *Setosphaeria monoceras* được phân lập từ cây lục bình bị bệnh. Phần thương tổn cắt ra được khử trùng bề mặt bằng cách ngâm trong etanol 70% trong 30 giây và rửa phần thương tổn cắt ra trong nước vô trùng, đặt trong đĩa petri chứa thạch dextroza khoai tây (Potato Dextrose Agar - PDA), và ủ 20 cm dưới ánh sáng huỳnh quang (12 giờ mỗi ngày) trong 3 ngày. Các khuẩn lạc của *Setosphaeria monoceras* được chuyển vào khay PDA tươi và sau đó được chuyển vào môi trường thạch PDA nghiêng để lưu trữ. Chúng phân lập được sinh trưởng trên môi trường thạch dextroza khoai tây và dịch nuôi cấy của chúng được duy trì trong phòng thí nghiệm và đánh số AGWH#11 và đã đăng ký trong NCIM, Pune, India và có số nộp lưu NCIM 1370 và dưới hiệp ước Budapest IMTECH, Chandigarh, India, với số nộp lưu MTCC 5974.

Sáng chế đề cập đến *Setosphaeria monoceras* mới được phân lập mà thể hiện tính đặc hiệu vật chủ với cỏ lục bình. Các khuẩn lạc trên thạch dextroza khoai tây ban đầu có màu trắng đến màu nâu xám và thành màu xanh oliu đến màu đen với đường viền xám tăng lên khi nó trưởng thành. Ngược lại cũng có sắc tố sẫm và màu từ oliu đến đen. Các

khuẩn lạc trưởng thành trong vòng 5 ngày. Sợi vân sẫm đến giống tóc. Sợi nấm có vách ngăn và màu nâu. Cuống bào tử đính (chiều rộng 4,5-6 μm) màu nâu, đơn giản hoặc phân nhánh, cong gập và gốc ghép, cong tại điểm mà từng bào tử đính phát sinh từ đó. Đặc tính này làm tạo ra hình chữ chi của cuống bào tử. Bào tử đính, còn được gọi là bào tử đính xóp, có từ 3 đến 6-tế bào, có dạng từ hình que đến hình trụ, các màu nâu từ nhạt đến đậm và có phần sinh trưởng gốc ghép cong gập. Bào tử đính xóp (30-35 μm x 11-13,5 μm) có vách ngăn méo và có rốn hạt phồng lên, màu tối. Vết sẹo cơ sở này chỉ ra điểm gắn cuống bào tử đính. Từ tế bào kết thúc của bào tử đính, ống mầm có thể phát triển và kéo dài theo hướng trục theo chiều dài của bào tử đính. Phép phân tích trình tự 18s rARN thể hiện độ tương đồng 96% về trình tự nucleotit của nấm với loài *Setosphaeria* nhưng cũng chỉ ra sự khác nhau về trình tự nucleotit của nấm này với chi khác đã biết (Fig. 1). Khả năng gây bệnh của *Setosphaeria monoceras*, dưới dạng thuốc diệt cỏ được thử nghiệm. Chúng được thử nghiệm để xác định phạm vi vật chủ với chất diệt cỏ sinh học. Thực vật 4 tuần tuổi và được xử lý bằng chế phẩm phát triển 1%.

Theo đó, sáng chế đề xuất chế phẩm diệt cỏ dùng để kiểm soát cây lục bình, chế phẩm này bao gồm chất diệt cỏ từ *Setosphaeria monoceras*. *Setosphaeria monoceras* tốt hơn là chủng có đặc điểm đặc trưng của *Setosphaeria monoceras* AGWH#11. Đặc điểm đặc trưng của chủng này là trình tự 18s rARN của nó. Phân tích trình tự thể hiện độ tương đồng về nucleotit của AGWH#11 với *Setosphaeria monoceras* là 96% nhưng cũng chỉ ra sự sai khác về nucleotit của chủ này với các loài khác đã biết của chi *Setosphaeria*. Ngoài ra, AGWH#11 có đặc điểm ngạc nhiên về hoạt tính diệt cỏ, cụ thể là chống lại cây lục bình. Chủng *Setosphaeria monoceras* có đặc điểm đặc trưng của *Setosphaeria monoceras* AGWH#11 tốt nhất là *Setosphaeria monoceras* AGWH#11 được nộp lưu là MTCC 5974 hoặc NCIM1370.

Theo một phương án của sáng chế, chất diệt cỏ có thể là sợi nấm hoặc chất cấy truyền bào tử, như chất cấy truyền bào tử đính. Thuật ngữ chất cấy truyền để chỉ chất chứa sinh khối nấm. Chất cấy truyền có thể sống hoặc không sống. Chất cấy truyền không sống có thể thu được bằng cách xử lý bất hoạt chất cấy truyền sống như đã biết trong lĩnh vực này. Xử lý nhiệt có thể thích hợp được sử dụng để bất hoạt chất cấy truyền. Chất cấy truyền sợi nấm và/hoặc bào tử (bào tử đính) được có thể thu được từ quá trình lên men rắn

hoặc lỏng. Chất cấy truyền sợi nấm có thể được chọn dưới dạng dịch huyền phù sợi nấm. Tương tự, chất cấy truyền bào tử (bào tử dính) có thể được chọn từ dịch huyền phù bào tử.

Theo phương án của sáng chế, chất diệt cỏ có thể là canh trường nuôi cấy (canh trường lên men). Trong sáng chế, thuật ngữ canh trường nuôi cấy đề chỉ chất lỏng mà nấm sinh trưởng trong đó. Canh trường nuôi cấy có thể được sử dụng dưới dạng sản phẩm lên men lỏng và có thể chứa sinh khối nấm như sinh khối sợi nấm và/hoặc bào tử (bào tử dính). Theo phương án được ưu tiên của sáng chế, canh trường nuôi cấy được tinh chế ít nhất một phần. Thuật ngữ “được tinh chế ít nhất một phần” bao gồm được tinh chế một phần. Canh trường nuôi cấy được tinh chế một phần là sản phẩm từ việc tiến hành một số bước tinh chế làm tăng hàm lượng các hợp chất nhất định của canh trường nuôi cấy (trong khi loại bỏ các thành phần khác). Canh trường nuôi cấy được tinh chế một phần giữ lại hỗn hợp các hợp chất. Ví dụ, nước canh thịt nuôi cấy được tinh chế một phần có thể là dịch lọc nuôi cấy không chứa tế bào (CFCF), ví dụ, thu được bằng cách lọc bỏ sinh khối nấm bằng phương tiện đã biết bất kỳ như vi màng lọc. Canh trường nuôi cấy được tinh chế một phần có thể còn thu được từ chiết xuất dung môi (hữu cơ) của các hợp chất nhất định từ canh trường nuôi cấy hoặc từ CFCF thu được từ đó. Theo các phương án nhất định, dung môi được chọn từ hexan, etyl axetat, cloroform, metanol hoặc hỗn hợp của chúng. Dung môi được chọn tốt hơn là bao gồm cloroform và tốt nhất là cloroform. Khi sử dụng cloroform làm dung môi, chất diệt cỏ có hiệu lực thu được còn được mô tả chi tiết trong các ví dụ. Do đó, sáng chế còn đề cập đến chất diệt cỏ có thể thu được bằng chiết xuất dung môi hữu cơ, cụ thể là, chiết xuất cloroform, của CFCF của *Setosphaeria monoceras* được sử dụng. Chiết xuất dung môi cloroform có thể có dữ liệu giải hấp được thể hiện trong Fig. 2 trong dữ liệu HPLC C 18. Chất diệt cỏ theo sáng chế sẽ bao gồm một số chất chuyển hóa thứ cấp. “Một số” trong phạm vi sáng chế nên hiểu có nghĩa là một hoặc nhiều, như số nhiều, ví dụ, từ 2 đến 10 như là, 3-9, 4-8, 5-7, hoặc 6. Chất chuyển hóa thứ cấp trong chất diệt cỏ có thể còn được tinh chế. Theo các phương án nhất định của sáng chế, chất chuyển hóa thứ cấp được tinh chế tới > 80% độ tinh khiết, như là >85%, >90%, >95%, >99% lên đến 99,9 % độ tinh khiết.

Chế phẩm và phương pháp của sáng chế bao gồm đề xuất việc sử dụng dịch lọc nuôi cấy không chứa tế bào và chất chuyển hóa của chúng để sản xuất chất diệt cỏ mới. Chế phẩm thuốc diệt cỏ có thể được điều chế dưới dạng chế phẩm lỏng bằng cách tạo huyền phù canh trường, canh trường được tinh chế một phần, như, canh trường không chứa tế bào, chất chuyển hóa thô hoặc được tinh chế trong chất mang dùng trong nông nghiệp để áp dụng cho cỏ hoặc vị trí cỏ sinh trưởng. Đối với chế phẩm của sáng chế, chất mang dùng trong nông nghiệp bất kỳ có thể được sử dụng dù nó là chất lỏng hoặc rắn miễn là có thể sử dụng được trong chế phẩm nông nghiệp hoặc làm vườn và tốt hơn là nó trở về mặt sinh học. Chất mang lỏng dùng trong nông nghiệp điển hình bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, nước, chất hoạt động bề mặt, dầu thực vật, và dầu khoáng. Theo phương án được ưu tiên, chất mang dùng trong nông nghiệp cho chế phẩm lỏng là nước, và chất diệt cỏ bao gồm canh trường không chứa tế bào.

Chế phẩm diệt cỏ còn có thể được điều chế dưới dạng chế phẩm hạt, chế phẩm chảy được, hoặc chế phẩm bột thấm ướt bằng cách trộn với chất mang dùng trong nông nghiệp, sau đó áp dụng lên cỏ.

Chất mang rắn dùng trong nông nghiệp thích hợp bao gồm bột khoáng, chẳng hạn như đất sét, đá tan, bentonit, canxi cacbonat, diatomit và cacbon trắng; bột thực vật như bột đậu nành và tinh bột, và một vài polyme như rượu polyvinyl và polyalkylen glycol.

Theo phương án được ưu tiên, trong chế phẩm, chất hoạt động bề mặt như Tween 80, Triton X, dầu parafin và Tween 20 được kết hợp với chất kháng sinh. Như được thể hiện trong phần thí nghiệm, chế phẩm làm tăng hoạt tính của việc kiểm soát cây lục bình. Theo phương án được ưu tiên khác, trong chế phẩm, dầu khoáng, như dầu parafin được kết hợp với kháng sinh (kháng vi sinh vật). Như được thể hiện trong phần thí nghiệm như chế phẩm làm tăng bất ngờ hoạt tính kiểm soát cây lục bình. Các kháng sinh có thể được chọn từ nhóm bao gồm Streptomycin, Ampilox, Azithromycin. Trong chất tạo chế phẩm chúng có thể được bổ sung với lượng 0,2-0,9% (trọng lượng/trọng lượng), như 0,3-0,8%, 0,4-0,7%, 0,4-0,6%, như khoảng 0,5% (trọng lượng/trọng lượng) vào chất diệt cỏ. Chất kháng sinh có thể được bổ sung với lượng 0,05-0,5% (trọng lượng/trọng lượng) như 0,06-0,4%, 0,07-0,3%, 0,08-0,3%, 0,09-0,3%, 0,1-0,3% như khoảng 0,2% (trọng lượng/trọng lượng) vào chất diệt cỏ.

Ngoài ra, theo phương án khác của sáng chế, chế phẩm còn bao gồm nguồn dưỡng chất đối với chủng *Setosphaeria monoceras*. Dưỡng chất có thể được chọn từ nhóm bột thực vật như bột đậu nành và tinh bột và được bổ sung với lượng 0,5% vào môi trường nuôi cấy.

Khía cạnh khác của sáng chế đề cập đến phương pháp kiểm soát cỏ dại, cụ thể là cây lục bình và loài liên quan. Phương pháp bao gồm bước cho cây lục bình tiếp xúc với chế phẩm theo sáng chế, chứa chất diệt cỏ. Chế phẩm theo sáng chế có thể được áp dụng lên cỏ lục bình để tiếp xúc được bằng cách phun chế phẩm lỏng lên cỏ. Lượng được phun tốt hơn là vừa đủ để chủ yếu bao phủ lá của cỏ. Một lần sử dụng có thể thích hợp để giảm sự sinh trưởng hiện thời; tuy nhiên, lặp lại việc sử dụng có thể cần thiết nếu xuất hiện sự sinh trưởng lại của thực vật từ việc kháng lại hoặc dưới cấu trúc bề mặt. Ngoài ra phương pháp của sáng chế có thể được sử dụng bổ sung vào hoặc kết hợp với các biện pháp kiểm soát khác.

Phương pháp này là để diệt trừ hoặc ngăn ngừa sự sinh trưởng của cây lục bình và phương pháp bao gồm bước cho cây lục bình tiếp xúc với chế phẩm của sáng chế. Chi tiết về đặc điểm kỹ thuật của chế phẩm của sáng chế được thảo luận ở trên. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực sẽ hiểu chế phẩm của sáng chế sẽ được gây truyền nhiễm với lượng thích hợp để tạo ra hiệu quả, cụ thể là, hiệu quả kiểm soát (giảm hoặc ức chế) sự sinh trưởng của cây lục bình. Việc xác định lượng có hiệu quả nằm trong phạm vi kiến thức và kỹ năng của người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Theo một phương án, lượng có hiệu quả có thể ở trong phạm vi 10 ml canh trường không chứa tế bào được tạo ra được bổ sung vào 1 lít nước để sử dụng. Khoảng 1,0 đến 1,5 lít trên mỗi mẫu Anh được sử dụng bằng phương pháp phun và các phương pháp tương tự. Thuốc diệt cỏ theo sáng chế có thể được điều chế bằng cách tạo huyền phù bào tử trong nước, thu được bằng cách nuôi cấy sinh khối, nhưng phương pháp điều chế không bị giới hạn ở đó. Trong phương pháp này, nồng độ bào tử xấp xỉ 2×10^8 bào tử/ml nhưng không giới hạn ở phạm vi này. Trong huyền phù bào tử trong nước, tá dược như, chất hoạt động bề mặt và chất khuếch tán có thể được bổ sung. Chủng *Setosphaeria monoceras* là thành phần chính có thể là chủng tươi ngay sau khi lên men. Theo cách khác, chủng được lưu trữ có thể được sử dụng sau khi hồi phục lại đặc tính bằng nước hoặc tương tự. Phương pháp lưu trữ,

phương pháp đã biết nhiều để lưu trữ chủng như lưu trữ ở nhiệt độ cực thấp (-10 độ C), đông lạnh chân không hoặc phương pháp tương tự có thể được sử dụng.

Theo phương án bất kỳ của sáng chế, việc cấy truyền được tiến hành ở giai đoạn sau khi nhú lên của cỏ lục bình. Theo một số phương án của phương pháp của sáng chế, sinh khối cây lục bình có thể giảm, ví dụ với phương tiện máy móc, như loại bỏ sinh khối cây lục bình bằng máy móc.

Khía cạnh khác của sáng chế đề cập đến việc sử dụng chủng *Setosphaeria monoceras*, tốt hơn là chủng có đặc điểm đặc trưng của chủng *Setosphaeria monoceras* AGWH#11 để sản xuất chất diệt cỏ có hiệu quả kiểm soát sự sinh trưởng của cây lục bình. Đặc điểm kỹ thuật của chất diệt cỏ đã được thảo luận ở trên liên quan đến thảo luận về chế phẩm của sáng chế. Tương tự với những gì được thảo luận về chế phẩm của sáng chế, chất diệt cỏ có thể được chọn từ nhóm chất cấy truyền sợi nấm, chất cấy truyền bào tử, tốt hơn là chất cấy truyền bào tử đỉnh, canh trường nuôi cấy, tốt hơn là canh trường nuôi cấy tinh chế ít nhất một phần, chất chuyển hóa thứ cấp.

Khía cạnh khác nữa của sáng chế đề cập đến chất diệt cỏ có thể thu được bằng phương pháp bao gồm bước chiết dịch lọc nuôi cấy không chứa tế bào (CFCF) của *Setosphaeria monoceras* bằng cloroform. Theo phương pháp CFCF, tốt hơn là bằng cách nuôi cấy chủng được chọn trong dịch nuôi cấy lỏng và sản xuất ra CFCF từ canh trường nuôi cấy. Sau đó, tiến hành chiết cloroform trên CFCF. Hoàn thành bước chiết chất chuyển hóa. Một lít môi trường canh trường được cấy truyền nhiễm và được ủ xấp xỉ 14 ngày ở 28°C. Cloroform với thể tích giống nhau được bổ sung vào chất lỏng huyền phù. Thu hồi lại chất chuyển hóa thô bằng cách rót bỏ cẩn thận lớp nước. Việc chiết chất lỏng huyền phù nuôi cấy bằng cloroform thu được 9,5 g chất chuyển hóa thô. *Setosphaeria monoceras* tốt hơn là chủng có đặc điểm đặc trưng của *Setosphaeria monoceras* AGWH#11.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ sau nhằm minh họa sáng chế và do đó không nên hiểu là để hạn chế phạm vi sáng chế.

Ví dụ 1

Khảo sát, phân lập và phân loại nấm:

Khảo sát nhiều nơi ở Andhra Pradesh để thu thập các phần nhiễm bệnh của cây lục bình (cuống lá và lá). Các mẫu được đưa đến phòng thí nghiệm trong túi nhựa dẻo sạch và bảo quản ở 4°C cho đến khi xét nghiệm. Làm sạch các phần của thực vật được bảo quản bằng cách rửa bằng nước để loại bỏ mảnh vụn bề mặt, cắt ra thành các mảnh nhỏ (xấp xỉ 1×1 cm), và khử trùng bề mặt bằng cách ngâm lần lượt vào etanol 96% trong 30 giây, hypoclorit 14% trong 30 giây và rửa bằng nước vô trùng trong 1 phút. Các phần được khử trùng bề mặt từ cuống lá và lá được đặt vào khay chứa dextroza khoai tây được bổ sung 0,5mg streptomycin. Ủ khay trong 7 ngày ở nhiệt độ 25°C. Thu được giống nuôi cấy được phân lập và tinh khiết. Việc xác định chi nấm khác nhau căn cứ vào đặc điểm hình thái của từng khuẩn lạc vi khuẩn sinh trưởng. Nấm có đặc điểm khác biệt của thực vật hoại sinh (tức là, sinh trưởng nhanh và sự hình thành bào tử trên đĩa PDA và phân lập thành chi *Penicillium*, *Aspergillus*, và *Trichoderma* được loại khỏi sự xem xét sau lần phân lập đầu tiên của chúng. Mẫu phân lập nấm loại tử giữ lại được xác định. Mẫu phân lập nấm được bảo quản trong phòng thí nghiệm. Các triệu chứng xuất hiện đầu tiên là đốm hoại tử và phát triển lá hoại tử, lan rộng khắp bề mặt lá và cuống lá. Nấm nhiễm (46 mẫu phân lập của nấm sợi) được xác định thuộc về 7 chi đã biết (bảng 7) căn cứ vào đặc điểm hình thái của nó và sự sắp xếp và cấu trúc của bào tử đính của nó. Dịch lọc không chứa tế bào của nấm AGWH#11 10 ngày nuôi cấy được phát hiện có hoạt tính bằng với dịch huyền phù bào tử của nó trong kích thích hoạt tử mô cây lục bình. Điều này đã chỉ ra rằng nấm tạo ra chất chuyển hóa độc hại trong canh trường nuôi cấy mà thường gây ra hội chứng này làm phá hủy các thành phần tế bào và gây vỡ thành tế bào của cây lục bình. Độc tố thực vật được chiết ra từ dịch lọc nuôi cấy không chứa tế bào của AGWH#11, sinh trưởng trong môi trường lỏng. Dịch lọc không chứa tế bào được chiết thành công bằng dung môi hexan, etyl axetat, cloroform và metanol (Fig. 1). Hợp chất độc tố thực vật thể hiện nhiều tính độc trong phân đoạn cloroform.

Bảng 1: Nấm thu được từ cây lục bình

Yếu tố gây bệnh	Triệu chứng	Số nộp lưu
<i>Setosphaeria monoceras</i> Tổng = 07	Đốm lá	AGWH04 AGWH05 AGWH11 AGWH20 AGWH56 AGWH 58 AGWH61
<i>Alternaria sp.</i> Tổng = 10	Đốm lá	AGWH01 AGWH16 AGWH 59 AGWH60 AGWH69 AGWH70 AGWH 75 AGWH76 AGWH77 AGWH79
<i>Fusarium sp.</i> Tổng = 09	Đốm lá	AGWH07 AGWH08 AGWH10 AGWH14 AGWH62 AGWH65 AGWH66 AGWH67 AGWH68
<i>Phoma sp.</i> Tổng = 05	Đốm lá	AGWH02 AGWH03 AGWH06

		AGWH63 AGWH64
<i>Curvularia</i> sp. Tổng = 03	Đốm lá	AGWH12 AGWH15 AGWH18
<i>Pestalotia</i> sp. Tổng = 04	Đốm lá	AGWH11 AGWH13 AGWH19 AGWH21=04
<i>Colletotrichum</i> sp. Tổng = 06	Đốm lá	AGWH09 AGWH71 AGWH72 AGWH73 AGWH74 AGWH78

Ví dụ 2

Thử nghiệm gây bệnh:

Trong suốt thí nghiệm, chất cấy truyền bào tử đỉnh đầu tiên được lấy khỏi môi trường nuôi cấy PDA trên đĩa petri, bảo quản ở 4°C không quá 6 tháng, và sau đó nuôi cấy thay thế ở 25°C trong môi trường nuôi cấy trước khi sử dụng. Thu thập cây lục bình khỏe không bị phá hoại tự nhiên và bảo tồn trong nhà kính của phòng thí nghiệm. Trong vòng sàng lọc sơ bộ, tác nhân gây bệnh nấm được kiểm tra về tác động của nó lên các mảnh lá được cắt ra từ cây lục bình khỏe mạnh. Mỗi mảnh được đặt lên bề mặt đĩa petri chứa giấy thấm với nước. Dịch huyền phù bào tử (20 ml) được điều chế từ nấm phân lập (2 x 10 ml bào tử với Tween 20), và phun bằng tay lên các mảnh lá. Sau khi cấy truyền, bịt kín ngay lập tức đĩa petri bằng parafin để ngăn mất nước và ủ ở 25°C chu kỳ chiếu sáng 16h trong 4 tuần.

Tính tỷ lệ triệu chứng bệnh ở thực vật. Lặp lại thí nghiệm ba lần. Các mảnh lá và thực vật được tính tỷ lệ về hội chứng bệnh lần lượt bao gồm đốm lá, vết lá, và lá chết. Tác động của yếu tố gây bệnh được xác định bằng cách xác định loại thương tổn (độ nghiêm

trọng của bệnh - disease severity-DS). DS được xác định cho từng lá theo thang 0= không có tác động; 1= lên đến 20% diện tích lá bị hoại tử; 2= lên đến 40% diện tích lá bị hoại tử; 3= lên đến 60% diện tích lá bị hoại tử; 4= lên đến 80% diện tích lá bị hoại tử; 5= lên đến 100% diện tích lá bị hoại tử.

Trong sàng lọc sơ bộ, tất cả 44 mẫu nấm phân lập được kiểm tra trên các mảnh lá của cây lục bình. Tất cả nấm phân lập có khả năng nhiễm vào thực vật là tạo ra một số triệu chứng bệnh (bảng 2). Bệnh bắt đầu là đốm hoại tử nhỏ và phát triển thành lụi lá mà có xu hướng la ra khắp lá, tuy nhiên chỉ chín yếu tố gây bệnh tạo ra triệu chứng trên hơn 50% tổng diện tích lá ở cuối của giai đoạn ủ 4 tuần. Chúng là: AGWH#11 (*Setosphaeria monoceras*), AGWH20 (*Setosphaeria monoceras*), AGWH06 (*Phoma* sp.), AGWH15(*Curvulariasp*), AGWH21 (*Pestalotia* sp.), AGWH 16 (*Alternaria* sp.), AGWH8 (*Fusarium* sp.), AGWH10 (*Fusariumsp*), và AGWH9 (*Colletotrichum* sp.). Giá trị mức độ nghiêm trọng của bệnh được tính suốt 4 tuần ở tất cả 46 mẫu phân lập (bảng 3). Giá trị DS ở cuối thí nghiệm đối với 4 yếu tố gây bệnh gây thiệt hại nặng nhất là: 80-100% tương ứng đối với mẫu phân lập *Setosphaeria monoceras* AGWH11 và AGWH 20, 60% đến 79% đối với mẫu phân lập *Alternaria* sp. AGWH16, AGWH08, AGWH10 đối với mẫu phân lập *Fusarium* sp., AGWH06 đối với mẫu phân lập *Phoma* sp. AGWH09 đối với *Collectotrichum*, AGWH15 đối với *Curvularia* AGWH21 đối với *Pestalotia*.

Bảng 2: Yếu tố gây bệnh nấm thu được từ cây lục bình (các thử nghiệm sử dụng lá được tách ra từ cây lục bình)

Yếu tố gây bệnh	Triệu chứng	Số nộp lưu	Phân tích sinh học lá được tách ra
<i>Setosphaeria monoceras</i> Tổng = 07	Đốm lá	AGWH04	2
		AGWH05	2
		AGWH11	5
		AGWH20	4
		AGWH56	2
		AGWH 58	2
		AGWH61	2
<i>Alternaria</i> sp.	Đốm lá	AGWH01	1

Tổng = 10		AGWH16 AGWH 59 AGWH60 AGWH69 AGWH70 AGWH 75 AGWH76 AGWH77 AGWH79	3 2 2 2 2 2 2 2 2
<i>Fusarium sp.</i> Tổng = 09	Đốm lá	AGWH07 AGWH08 AGWH10 AGWH14 AGWH62 AGWH65 AGWH66 AGWH67 AGWH68=09	2 3 4 2 2 2 2 2 2
<i>Phoma sp.</i> Tổng = 05	Đốm lá	AGWH02 AGWH03 AGWH06 AGWH63 AGWH64=05	1 1 3 2 2
<i>Curvularia sp.</i> Tổng = 03	Đốm lá	AGWH12 AGWH15 AGWH18=03	1 4 1
<i>Pestalotia sp.</i> Tổng = 04	Đốm lá	AGWH11 AGWH13 AGWH19 AGWH21=04	2 2 1 3
<i>Colletotrichum</i> sp.	Đốm lá	AGWH09 AGWH71	3 2

Tổng = 06	AGWH72	2
	AGWH73	2
	AGWH74	2
	AGWH78	2

Chữ viết tắt chính cho tỷ lệ lá được tách ra 0= không có tác động; 1= lên đến 20% diện tích lá bị hoại tử; 2= lên đến 40% diện tích lá bị hoại tử; 3= lên đến 60% diện tích lá bị hoại tử; 4= lên đến 80% diện tích lá bị hoại tử; 5= lên đến 100% diện tích lá bị hoại tử. Chủng AGWH 06, 08, 09, 10, 11, 15, 16, 20& 21 gây ra hơn 50% LAD, được chọn từ vòng sàng lọc thứ hai.

Ví dụ 3

Vòng sàng lọc thứ hai của chủng:

Vòng sàng lọc thứ được tiến hành bằng cách sử dụng chín mẫu phân lập nấm bọc lộ hoạt tính diệt cỏ cao nhất *in vitro*. Trong số chúng, chỉ mẫu phân lập AGWH#11 (*Setosphaeria monoceras*) thể hiện là DS ít nhất 100% sau 96 h ủ (bảng 3). DS ở trong phạm vi 40% đến 47% đối với mẫu phân lập *Alternaria* sp. AGWH16, AGWH08, AGWH10 đối với mẫu phân lập *Fusarium* sp., AGWH06 đối với *Phoma* sp. AGWH09 đối với *Colletotrichum*, AGWH15 đối với *Curvularia* AGWH21.

Bảng 3: Vòng sàng lọc thứ hai của chủng phân lập

SN	Mẫu phân lập nấm	% Độ nghiêm trọng của bệnh			
		24 giờ	48 giờ	72 giờ	96 giờ
1	AGWH06	1	2	2	2
2	AGWH 08	1	1	1	1
3	AGWH 09	1	2	2	2
4	AGWH 10	1	2	3	3
5	AGWH 11	1	3	5	5
6	AGWH15	1	2	2	2
7	AGWH16	1	2	2	3
8	AGWH20	1	2	2	2
9	AGWH21	1	2	3	3

Chữ viết tắt chính cho tỷ lệ lá được tách ra 0= không có tác động; 1= lên đến 20% diện tích lá bị hoại tử; 2= lên đến 40% diện tích lá bị hoại tử; 3= lên đến 60% diện tích lá bị hoại tử; 4= lên đến 80% diện tích lá bị hoại tử; 5= lên đến 100% diện tích lá bị hoại tử.

Kết quả nổi bật AGWH#11 là thuốc diệt cỏ sinh học tiềm năng để sử dụng trong phòng trừ cây lục bình.

Ví dụ 4

Thử nghiệm đặc hiệu vật chủ

Sự đặc hiệu vật chủ của nấm được chọn cũng được thử nghiệm trong nhà kính. Thực vật không sống ở nước được nuôi sinh trưởng trong các chậu đồ đầy đất vô khuẩn bán trên thị trường, không chứa nấm. Thử nghiệm được lặp lại ba lần. Sự cấy truyền loại sinh thái cây lục bình và cây trồng được thực hiện bằng cách phun dịch huyền phù chứa 2×10^6 bào tử/ml. Các thực vật được theo dõi triệu chứng bệnh. Từ điều này có thể kiểm tra được phạm vi của AGWH#11 phân lập. Bảng 4 và Fig.1 thể hiện kết quả thu được khi chủng được phân tán tới cây trồng và cỏ. Bốn tuần sau khi sử dụng chủng phân lập, cây lục bình thể hiện các tổn thương trên lá của chúng, trong khi đó không có thực vật nào khác thể hiện dấu hiệu nhiễm bệnh. Căn cứ vào kết quả này, mẫu phân lập nấm sẽ không được kỳ vọng ảnh hưởng đến các thực vật quan trọng về kinh tế và do đó nên xem là yếu tố tiềm năng để kiểm soát việc nhiễm bệnh ở cây lục bình.

Bảng 4: Thực vật sử dụng ở thử nghiệm đặc hiệu vật chủ của mẫu phân lập AGWH#11 (+ có nghĩa là thể hiện việc nhiễm bệnh)

Thực vật thử nghiệm	Độc tố thực vật
Ớt	-
Cà chua	-
Cà tím	-
Cây lục bình	+
Cỏ	-

Ví dụ 5

Đặc điểm hình thái học:

Trong phép phân tích hình thái, chủng địa phương AGWH#11(NCIM 1370) được phân lập từ cây lục bình bị nhiễm lên lá là *Setosphaeria monoceras*. AGWH#11 (phân loại Ấn Độ *Drechslerasp*) được phân loại là *Setosphaeria monoceras* ở Nhật Bản và Australia.

Đặc điểm vĩ mô

Các chủng *Setosphaeria monoceras*. sinh trưởng nhanh, đạt đường kính từ 3 đến 9 cm sau khi ủ ở 25°C trong 7 ngày trên môi trường thạch dextroza khoai tây. Chủng trưởng thành trong vòng 5 ngày. Kết cấu từ mịn đến xù. Bề mặt của khuẩn lạc ban đầu có màu trắng đến màu nâu xám và trở thành màu xanh oliu đến màu đen với viền ngoài hơi xám tăng lên khi nó trưởng thành. Ngược lại là được nhuộm đậm và màu từ ôliu đến đen.

Đặc điểm vi mô

Sợi nấm có vách ngăn và màu nâu. Cuống bào tử đính màu nâu, đơn hoặc phân nhánh, cong gấp và gốc ghép, cong ở các điểm mà mỗi bào tử đính nhú lên từ đó. Đặc tính này làm cuống bào tử có hình chữ chi. Bào tử đính, mà còn được gọi là bào tử đính xộp, có 3 đến 6 tế bào, hợp lại thành hình trụ, màu nâu nhạt đến nâu đậm và có mẫu sinh trưởng gốc ghép cong gấp.

Ví dụ 6

Phân tích phân tử

Nghiên cứu hiện tại được thiết kế để cung cấp vị trí phân loại của mẫu phân lập AGWH#11 ở mức độ loài, sử dụng so sánh trình tự ADN.

Các ký tự phiên mã nội tại 1 và 2 [ITS-1 và 2] và vùng 5.8 S của đơn vị phiên mã ADN ribosom nhân [rADN] được thực hiện giữa mẫu phân lập AGWH#11 và loài gần nhất hoặc mẫu phân lập mà có trình tự. So sánh gen rADN ITS đã thể hiện rằng mẫu phân lập AGWH#11 tương đồng 99% với hai mẫu phân lập khác (Bảng 5). Liên quan đến nghiên cứu, mẫu phân lập AGWH#11 thể hiện 96% độ tương đồng với *Setosphaeria monoceras*. Tương tự với gen ITSrADN, trình tự gen 18S rADN của mẫu phân lập AGWH#11 thể hiện hơn 91% độ tương đồng với bốn *Alternaria* sp khác nhau. Tương tự với gen ITSrADN, trình tự gen 18S rADN của mẫu phân lập AGWH#11 thể hiện hơn 93% độ tương đồng với *Cochliobolus lunatus* và *Cochliobolus* sp khác thể hiện 94% độ tương đồng. Tương tự, nó thể hiện 95% độ tương đồng với *Bipolaris secalis*.

Bảng 6: So sánh trình tự ADN được thực hiện giữa các mẫu phân lập AGWH#11 sp.

Sinh vật	Số đăng ký trong ngân hàng gen	% tương đồng (bp)
<i>Setosphaeria monoceras</i>	DQ337380	96
<i>Bipolariseleusines</i>	DQ337382	95
<i>Pleosporaceae sp</i>	EF060604	99
<i>Pleosporaceae sp</i>	EF060407	99
<i>Cochliobolus lunatus</i>	DQ337381	93
<i>Pleosporaceae sp</i>	EF060433	99
<i>Cochliobolus sp.</i>	FJ235087	94
<i>Alternaria multirostrata</i>	AM237287	91
<i>Alternaria cichorii</i>	AM237286	91
<i>Alternaria jesenskiae</i>	AM237084	91
<i>Alternaria passiflorae</i>	AM237288	91

Sự so sánh trình tự ADN và mô tả hình thái học đã cung cấp đầy đủ bằng chứng là mẫu phân lập *Setosphaeria monoceras*. AGWH#11 thuộc về chi *Setosphaeria* và đủ khác biệt với loài *Setosphaeria monoceras* đã biết. Mẫu nuôi cấy được nộp lưu tại NCIM với số nộp lưu 1370 và MTCC 5974 nộp lưu tại IMTECH.

Ví dụ 7

Phân tích sinh học của dịch lọc nuôi cấy không chứa tế bào AGWH#11:

Theo nghiên cứu của sáng chế, chi AGWH#11 được phát hiện kích động mạnh trong phát sinh bệnh ở cây. Dịch lọc nuôi cấy không chứa tế bào của AGWH#11 có khả năng kích thích hội chứng giống với huyền phù bào tử của nó. Chất hoạt tính của CFCF được nghiên cứu bằng HPLC. Chất hoạt tính tách ra thể hiện làm hoại tử lá. Chất này xuất hiện để giữ vài triển vọng về chất kiểm soát sinh học khả thi đối với cây lục bình.

Phương pháp bao gồm bước cấy truyền *Setosphaeria monoceras*, làm thuốc diệt cỏ sinh học. *Setosphaeria* sinh trưởng trong môi trường canh trường sucroza khoai tây (Potato sucrose broth-PSB) cải biến ở $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong bình thốt cổ một lít chứa 250 ml môi trường cải biến. Dịch nuôi cấy được thu lại bằng cách cho đi liên tục qua giấy lọc Whatman No.1. Dịch lọc có thể được kết hợp với chất mang lỏng, như dầu parafin và chất hoạt động bề mặt không có độc tố thực vật như glyxerol 2%. Sợi nấm và/hoặc bào tử dính

từ dịch nuôi cấy của *Setosphaeria monoceras* được tiêu diệt bằng xử lý nhiệt và trộn với natri benzoat 0,2% dưới dạng vi sinh vật vào canh trường nuôi cấy. Tỷ lệ áp dụng lên cây lục bình nên ở phạm vi khoảng 10 ml sản phẩm trộn vào 1 lít nước. Sự tấn công của thuốc diệt cỏ sinh học lên cây lục bình được chứng tỏ bằng sự xuất hiện của thương tổn màu nâu hoặc vùng hoại tử, sau đó là héo và chết cây. Kết quả của thử nghiệm này được thể hiện ở bảng 10.

Bảng 7: Sự phát triển của các triệu chứng trên cây lục bình do nhiễm AGWH#11 trong suốt 20 ngày

Ngày sau khi gây nhiễm	Mô tả triệu chứng
2	Không có triệu chứng xuất hiện
5	Đốm màu vàng lan rộng
7	Đốm màu vàng đậm lan rộng với mép có màu nâu
10	Các vùng chịu tác động chuyển thành hoại tử và xuất hiện vết đốm trên bề mặt hoặc lá bị rui.
12	Hội chứng lan rộng đến cuống lá và hoặc thân bò của cây, một số phần khô lại; lá rụng một phần trong khi các lá khác trở nên khô.
20	Cỏ biến mất và các thành phần của hầu hết các chậu thành chất lỏng bẩn hoặc màu nâu đậm.

Ví dụ 8

Phân tích sinh học lá được tách ra:

Lá cây lục bình được tách ra được sử dụng cho thử nghiệm hoạt tính sinh học của dịch lọc không chứa tế bào, dịch lọc thô và chất độc tinh chế một phần. Đặt lá được tách ra lên giấy lọc ẩm trong đĩa petri có đường kính 9cm. Việc cấy truyền dịch lọc thô, dịch lọc không chứa bào tử và tế bào, và độc tố thực vật được tinh chế một phần được áp dụng lên lá bằng ống hút vi thể. Mười lá được sử dụng cho từng quy trình xử lý. Lá đối chứng nhận nước vô trùng. Bịt kín các đĩa bằng parafin và ủ ở nhiệt độ trong phòng với điều kiện sáng 12 giờ. Độc tố thực vật tác động lên lá cắt bỏ được xử lý được đánh giá bằng mất thương về độ hư hại trong 5 ngày. Kết quả của thử nghiệm này được thể hiện trong bảng 3.

Bảng 8: Tác động của AGWH#11 lên lá được tách ra của cây lục bình

Độc tố thực vật	Nồng độ (µl/ml)	Tính độc thực vật
Dịch lọc không chứa tế bào	100	+
Dịch lọc thô	10	+
HPLC tinh chế	0,2	+
Đối chứng	100	-

Hư hại do độc tố thực vật được đánh giá bằng mắt thường trong 5 ngày. - = không bị ảnh hưởng bởi độc tố thực vật, + = chịu tác động bởi độc tố thực vật.

Ví dụ 9

Phân tích sinh học của chất chuyển hóa thô chiết xuất bằng dung môi:

Các lá cây được tách ra của cây lục bình bằng chất chuyển hóa chiết xuất bằng dung môi được kiểm tra. Hợp chất độc tố thực vật được phát hiện trong phân đoạn hexan và ethyl axetat (Bảng 11). Phân đoạn cloroform thể hiện độc tính 100%.

Bảng 9: Phân tích sinh học của hợp chất chiết bằng dung môi từ AGWH#11

Mẫu	Tính độc thực vật				
	Đối chứng	Chiết bằng Metanol	Chiết bằng Hexan	Chiết bằng Cloroform	Chiết bằng Ethyl axetat
Lá được tách ra	0	+	++	++++	++

Chỉ số hoạt tính độc tố thực vật theo thang

0= 0 được xử lý bằng nước, không tổn thương; + = 5% diam; ++ = 25%; +++ = 75%
++++ = 100%,

Nhiều loại nấm gây bệnh ở thực vật làm hoại tử thuộc về lớp Dothideomycetes sản xuất chất chuyển hóa gây độc thực vật và peptit mà thường cần thiết cho việc gây ra bệnh. Độc tố thực vật và tác động trên phạm vi rộng các loài thực vật được biết đến là độc tố không đặc hiệu vật chủ (non-host-specific toxins - non-HSTs), trong khi HST chỉ ảnh hưởng đến loài thực vật cụ thể nhất định hoặc thường xuyên hơn là ảnh hưởng đến kiểu gen của loài đó. Đối với mầm bệnh sản xuất HST, yếu tố gây bệnh và vật chủ đặc hiệu được xác định rộng rãi bằng khả năng sản xuất độc tố, trong khi tính nhạy của thực vật không phụ thuộc vào sự có mặt của đích độc tố. Độc tố không đặc hiệu vật chủ không

phải là yếu tố quyết định chính của yếu tố gây bệnh nhưng đóng góp độc lực của yếu tố gây bệnh sinh ra. *Dothideomycetes* đáng chú ý để sản xuất chất độc, cụ thể là HST, vì chúng là loài nấm duy nhất đã biết để sản xuất ra độc tố này.

Ví dụ 10

Việc sản xuất và tinh chế độc tố thực vật và sắc ký lỏng hiệu năng cao:

Setosphaeria monoceras sinh trưởng ở $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong bình một lít chứa 250ml môi trường PSB cải biến. Môi trường vô trùng được cấy 1 mol dịch huyền phù bào tử nấm, lắc nhẹ, và ủ dưới dạng nuôi cấy đứng trong 14 ngày. Dịch lọc nuôi cấy được thu lại bằng cách cho đi liên tục qua giấy lọc Whatman No.1, và màng lọc Sartorius (0,20 μm). Dịch lọc nuôi cấy được cho đi qua màng lọc Sartorius. Dịch lọc nuôi cấy không chứa tế bào được chiết bằng cloroform để thu được chiết xuất bằng dung môi. Dịch lọc vô trùng được chiết bằng cloroform được bảo quản ở 4°C phụ thuộc vào thử nghiệm hoặc phân đoạn. Sắc ký lỏng hiệu năng cao (High Performance Liquid Chromatography - HPLC) được tiến hành sử dụng metanol: nước (gradient 0-100% trong 30 phút) làm hệ dung môi ở cột đảo pha C18. Trong HPLC thông thường, dữ liệu giải hấp của cột đảo pha C18 của độc tố được tinh chế một phần thể hiện ở (Fig. 1).

Việc tách các đỉnh khác nhau của chất chuyển hóa AGWH#11 và mô tả đặc tính hóa học của nó được mô tả bằng nghiên cứu NMR và GC MS và nó sẽ được bổ sung vào kết quả.

Ví dụ 11

Nghiên cứu chế phẩm:

Chế phẩm đề cập đến quy trình trộn chất chuyển hóa thứ cấp hoặc vi khuẩn với chất mang trợ để thay đổi đặc tính vật lý của chúng để tăng cường chính tuổi thọ và năng suất. Chế phẩm bao gồm việc sử dụng chế phẩm mà chứa: tá dược, chất hoạt động bề mặt, chất làm ướt, chất khuếch tán và chất bảo quản. Việc sử dụng chế phẩm để kiểm soát sinh học là việc sử dụng tương đối mới mà đã biết trong công nghiệp thuốc diệt cỏ hóa học. Tá dược tăng hiệu quả của thuốc diệt cỏ sau khi xuất hiện bằng cách tăng tính ẩm của bề mặt đích vì chúng giảm độ căng bề mặt. Tá dược cũng đã biết là tăng cường sự thâm nhập. Để kiểm tra tính tương thích của độc tố thực vật được sản xuất bằng nấm thử nghiệm, nhiều công thức khác nhau được kiểm tra. Do đó, mục đích của nghiên cứu là đánh giá tính

tương thích của các công thức khác nhau khi dùng riêng rẽ và khi kết hợp để chống lại cỏ dại mục tiêu.

Để kiểm tra tính tương thích của độc tố được tổng hợp bằng bảy chất tạo chế phẩm gây bệnh, cụ thể là, Tween-20, Tween -80, dầu đậu nành Ek Bond, dầu mù tạc, dầu cây thân củ mọc dưới đất, glyxerol được sử dụng. Chất tạo chế phẩm được bổ sung với lượng 0,5% vào CFCF chứa độc tố thực vật với chất kháng sinh với lượng 0,2% và tính tương thích được xác định bằng phân tích sinh học toàn bộ thực vật.

Để đánh giá tính tương thích của độc tố thực vật được sản xuất từ các công thức khác nhau của nấm thử nghiệm mà được kiểm tra. Dữ liệu có trong bảng 12, các nghiên cứu về thiệt hại do độc tố thực vật thể hiện rõ ràng rằng công thức tương thích nhất là dầu parafin sau đó bảo quản bằng dầu dừa, Ek bond, Tween-80, Tween-20 và glyxerol. Căn cứ vào các kết quả thu được ở trên, có thể kết luận rằng chất chuyển hóa thứ cấp của AGWH#11 có tiềm năng diệt cỏ cao với dầu parafin và có thể được phát triển làm thuốc diệt cỏ tiềm năng để kiểm soát cây lục bình.

Bảng 10: Thử nghiệm tính tương thích của các chế phẩm khác nhau của AGWH#11 bằng phân tích sinh học toàn bộ cây

SN	Tá được	Tỷ lệ bệnh do độc tố thực vật ở cây lục bình		
		3 ngày	5 ngày	10 ngày
1	Đối chứng a	0	0	0
2	Đối chứng b	0	0	0
3	Dầu dừa	2	2	2
4	Tween 20 + kháng sinh	3	3	4
5	Dầu parafin + kháng sinh	4	5	5
6	Dầu đậu nành+ kháng sinh	2	2	2
7	Glyxerol + kháng sinh	2	2	2
8	Dầu mù tạc + kháng sinh	2	2	2
9	EK bond + kháng sinh	2	2	3
10	Chi CFCF + kháng sinh	2	2	2

Đối chứng a - môi trường sinh trưởng không chuyển hóa

Đối chứng b - Nước vô trùng;

Lượng CFCF chứa độc tố thực vật được sử dụng là = 10 ml/cây

Tỷ lệ bệnh ở thực vật (PLANT DISEASE RATING - PDR)

0-1 = xoắn nhẹ & héo; 1-2 = úa lá nhẹ; 2-3 = úa lá tạo đốm, hoại tử nhẹ; 3-4 = hoại tử cao và úa lá tạo đốm; 4-5 = hoại tử cấp tính và úa lá tạo đốm; 5 = úa lá cấp tính và hoại tử cấp tính làm chết cây giống.

Ví dụ 12

Nghiên cứu việc giảm sinh khối:

Thử nghiệm gây bệnh ở toàn bộ thực vật sát đường trong nhà kính để kiểm tra thuốc diệt cỏ sinh học phát triển. Mục đích là để đánh giá tính hiệu quả của nồng độ 1% của *S. monoceras* lên cây lục bình sau khi áp dụng. Dịch lọc nuôi cấy không chứa tế bào của *S. monoceras* được tạo chế phẩm với natri benzoat 0,2%. Tỷ lệ áp dụng nên ở trong phạm vi từ khoảng 10 ml hỗn hợp sản phẩm tạo chế phẩm vào 1 lít nước lên cây lục bình. Sự tấn công của sản phẩm lên cây lục bình được biểu hiện bằng sự xuất hiện thương tổn màu nâu hoặc vùng hoại tử, sau đó héo và chết. Các kết quả thể hiện sự giảm lớn về trọng lượng sinh khối khô với hơn 80% không kể nồng độ 1% ở thực vật trong giai đoạn lá 1-3 và 5-7. Tỷ lệ đạt được hoàn toàn trong vào 7 ngày. Kết quả thu được minh họa rằng việc áp dụng sản phẩm ở hàm lượng 10 ml/1 lít nước để xử lý toàn bộ làm giảm lượng lớn sinh khối và tái tạo ra tác động bất lợi lên thực vật. Kết quả của thử nghiệm này được thể hiện trong bảng 11.

Bảng 11: Sự giảm sinh khối của cây lục bình

SN	Sinh khối trước khi áp dụng (g)	Sinh khối sau khi áp dụng (g)						
	Ngày 0	Ngày 1	Ngày 2	Ngày 3	Ngày 4	Ngày 5	Ngày 6	Ngày 7
Đối chứng	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5
Cỏ 1	60,5	51,5	42,5	41,5	29,5	22,5	19,5	18,0
Cỏ 2	75,0	66,0	56,0	55,0	36,0	29,0	23,0	20,0
Cỏ 3	60,0	50,0	49,0	47,0	33,0	26,0	21,0	17,0
Cỏ 4	40,0	31,0	23,0	21,0	13,0	9,0	7,0	5,0
Cỏ 5	100,0	90,0	87,0	82,0	60,0	42,0	40,0	31,0
Cỏ 6	32,0	22,0	13,0	11,0	7,0	5,0	4,0	4,0

Nghiên cứu hệ gen

ADN của *Setosphaeria monoceras* được chiết bằng quy trình phát triển Scigenom và thư viện trình tự được chuẩn bị sử dụng kit chế phẩm mẫu ADN có đầu được cặp đôi Illumina. Việc giải trình tự được tiến hành sử dụng máy phân tích hệ gen Illumina. Đoạn đọc ngắn được lắp ráp de novo sử dụng velvet và cải thiện chất lượng lắp ráp bằng ống bao gồm hai bộ lắp ráp thay thế Edena và Minimus.

Chủng *Setosphaeria monoceras* AGWH#11 (NCIM 1370) được giải trình tự bằng súng bắt gen toàn bộ hệ gen sử dụng máy phân tích hệ gen Illumina. Kiểm tra chất lượng, ráp De novo để nghiên cứu hệ gen, dự đoán gen, chú giải ORF và tiến hành tra cứu Blastx.

Kiểm tra chất lượng Fastq lọc kết quả được thể hiện trong bảng 12

Bảng 12: Tóm tắt đoạn đọc thô

Mẫu	AGWH 11
Số lượng đoạn đọc kết đôi	25.892.527
Số lượng bazơ (Gb)	5,17
% GC	52,83
Tỷ lệ phần trăm của dữ liệu $\geq Q30$	80

Kiểm tra chất lượng Fastq bao gồm kiểm tra chất lượng các thông số về trình tự thu được từ máy đọc trình tự. Sự phân bố điểm chất lượng bazơ, hàm lượng bazơ trung bình trên đoạn đọc và sự phân bố GC trong các đoạn đọc được thực hiện đối với tệp fastq đầu vào. Sự phân bố điểm chất lượng bazơ, chất lượng của đầu trái (R1) và phải (R2) của đoạn đọc kết đôi đối với mẫu được thể hiện trong các hình Fig. 5 và Fig. 6. Trục x thể hiện chu kỳ giải trình tự và trục y thể hiện điểm chất lượng phred của bazơ. Quan sát thấy rằng chất lượng bazơ trung bình là trên Q30 (xác suất sai số $\geq 0,001$) đối với trên 80% bazơ.

Sự phân bố thành phần bazơ của đầu trái và phải của trình tự đoạn đọc kết đôi được thể hiện trong các hình Fig. 7 và Fig. 8. Trục x thể hiện chu kỳ giải trình tự và trục y thể hiện tỷ lệ phần trăm nucleotit. Quan sát độ dốc trong thành phần bazơ hướng tới điểm

khởi đầu của đoạn đọc. Độ dốc trong thành phần trình tự thường được quan sát theo các thí nghiệm NGS.

Sự phân bố GC của đầu trái và phải của trình tự đoạn đọc kết đôi được tiến hành (các hình Fig. 9 và Fig. 10). Trục x thể hiện thành phần GC trung bình trong trình tự và trục y thể hiện tổng phần trăm của các đoạn đọc. Thành phần GC trung bình của các đoạn đọc trong mẫu tuân theo phân phối chuẩn.

Tập fastq được cắt tía trước khi tiến hành ráp Denovo contig. Các nhà khoa học ở Scigenom đã cắt tía ba bazơ từ điểm khởi đầu và hai bazơ từ điểm kết thúc của đoạn đọc. Tóm tắt đoạn đọc đã cắt tía được thể hiện trong bảng 13.

Bảng 13: Tóm tắt đoạn đọc đã cắt tía của mẫu AGWH#11

Mẫu	AGWH#11
Số lượng đoạn đọc kết đôi	25.892.527
Số lượng bazơ (Gb)	4,92
Chiều dài đoạn đọc	2x 95bp

Ngoài ra, các đoạn đọc đã lọc ra được có trong adaptor illumina. Kmer Genie được sử dụng để dự đoán giá trị k tối ưu và kích thước lắp ráp. Kết quả KmerGenie được ghi nhận ở bảng 14.

Bảng 14: Kết quả KmerGenie

Mẫu	AGWH#11
K tốt nhất được dự đoán	63
Kích thước lắp ráp được dự đoán	35.117.793

Các contig độc lập được lắp ráp khác nhau được sử dụng để tích hợp các contig. Đối với AGWH#11, việc lắp ráp sau cùng có 150 contig và contig dài nhất có chiều dài 1261505 bp. Thống kê về việc lắp ráp được thể hiện trong Bảng 15.

Bảng 15: Thống kê về việc lắp ráp đối với contig

Chương trình lắp ráp	Nhỏ nhất	Lớp nhất	Trung bình	N50	Tổng số contig	Tổng chiều dài của tất cả các contig
AS	198	1119830	23715,43	319829	1486	35241127
Edena	142	394286	45948,5	94664	746	34277582
SOAPdenovo	66	284116	3610,24	59318	9833	35499493
Velvet	125	191558	6111,9	42794	5745	35112848
MaSuRCa	300	227951	15356,7	5446	2295	35243629
CISA	3140	1261505	236557,7	510532	150	35483656

Đối với việc dự đoán gen và chú giải, ORF được dự đoán từ các contig của mẫu nấm AGWH 11 sử dụng phương pháp Augustus. So sánh với dự đoán gen của AGWH11, dữ liệu đào tạo từ *Aspergillus nidulans* và *Neurospora crassa* được sử dụng để dự đoán ORF độc lập. Đã phát hiện ra 13.950 ORF đơn nhất trong mẫu AGWH#11 từ các dự đoán này. ORF đã dự đoán được chú giải sử dụng ống dẫn nội bộ Scigenom (CANoPIContig Annotator) để lắp ráp de novo. Các bước chú giải ORF được so sánh với dữ liệu NCBI sử dụng chương trình BLASTX, chú giải sinh vật, chú giải gen và protein cho ORF phù hợp, chú giải về bản thể học gen và chú giải về quy trình.

ORF đã dự đoán được so sánh với cơ sở dữ liệu protein cần thiết trong NCBI sử dụng chương trình BLASTX. Sự phù hợp với giá trị $E \leq 1e-5$ và điểm tương đồng $\geq 40\%$ được giữ lại để chú giải tiếp. Tổng kết BLASTX được thể hiện trong bảng 16. Đối với toàn bộ mẫu AGWH#11, đã phát hiện 13.602(97,38%) của ORF được dự đoán có ít nhất một kết quả trong cơ sở dữ liệu NCBI.

Bảng 16: Tổng kết BLASTX và UniProt

Hạng mục	AGWH11
Số lượng ORF	13.967
Số lượng ORF với sự phù hợp BLASTX đáng kể	13.400
Số lượng ORF với chú giải UniProt	13.380

Sự phân bố giá trị E của nghiên cứu BLASTX được thể hiện trong Fig. 11. Khoảng 91% ORF được phát hiện bằng cách sử dụng BLASTX đối với mẫu có mức độ tin cậy ít nhất là $1e-50$, mà đã chỉ ra sự bảo tồn protein cao. 91% ORF dự đoán được phát hiện bằng cách sử dụng BLASTX có độ tương đồng về protein hơn 60% với protein tồn tại trong cơ sở dữ liệu NCBI trong mẫu AGWH#11.

Đối với chú giải sinh vật, sự có mặt trong hàng đầu BLASTX của mỗi ORF được nghiên cứu và lọc ra tên sinh vật. 15 sinh vật hàng đầu được phát hiện trong chú giải của mẫu được thể hiện trong Fig. 12.

Phần lớn sự có mặt trong hàng đầu BLASTX thuộc về *Setosphaeria turica* đối với mẫu này.

Đối với chú giải gen và protein, protein được dự đoán từ BLASTX được chú giải dựa vào NCBI, quy trình UniProt và các cơ sở dữ liệu khác. Trong số đó, 13.380 ORF ở kết quả BLASTX đáng kể hàng đầu được chú giải sử dụng cơ sở dữ liệu UniProt. Đối với sự chú giải protein được dự đoán trong kết quả BLASTX còn lại dựa vào NCBI. Sự chú giải đã hoàn thiện được chia thành ba hạng mục sau (bảng 17).

Bảng 17: Tình trạng chú giải

Mẫu	AGWH11
Số lượng ORF mà không có kết quả BLASTX đáng kể	365
Số lượng ORF với kết quả BLASTX đáng kể mà không có thông tin UniProt	20
Số lượng ORF với kết quả BLASTX đáng kể và có thông tin UniProt	13.380

Các đối tượng bản thể học gen dùng cho ORF được xuất ra bất cứ khi nào có thể. T số các đối tượng khác nhau của GO đã chỉ ra trong quá trình sinh học, chức năng phân tử và loại thành phần tế bào được thể hiện trong bảng 18.

Bảng 18: Các đối tượng bản thể học gen đã xác định trong từng hạng mục

Hạng mục	Số lượng đối tượng
Quá trình sinh học	643
Chức năng phân tử	849

Thành phần tế bào	234
-------------------	-----

13 đối tượng hàng đầu trong từng hạng mục được đề cập đến trong các hình từ Fig. 13 đến Fig. 15 với ba đối tượng khác nhau về quá trình sinh học, chức năng phân tử và thành phần tế bào. Sinh vật AGWH #11 có tổng số bản thể học gen được nghiên cứu trong các hạng mục khác nhau tương ứng, đã thể hiện 643 quá trình sinh học, 849 chức năng phân tử và 234 thành phần tế bào.

Mặc dù những mô tả trên của sáng chế được thể hiện và được mô tả ở đây với sự tham chiếu đến các phương án cụ thể và việc ứng dụng chúng, nên có mục đích minh họa và mô tả mà không có mục đích thể hiện đầy đủ hoặc hạn chế sáng chế ở các phương án cụ thể và ứng dụng của nó. Sẽ rõ ràng đối với người có hiểu biết trong lĩnh vực này rằng một số thay đổi, cải biến, biến thể, hoặc thay thế sáng chế như được mô tả ở đây có thể được tạo ra, về mặt liều lượng, sự pha loãng, ứng dụng và các dạng khác về sử dụng, mà không lệch khỏi bản chất hoặc phạm vi của sáng chế. Các phương án cụ thể và ứng dụng được lựa chọn và mô tả ở đây để tạo ra sự minh họa tốt nhất về nguyên tắc của sáng chế và việc ứng dụng thực tế của nó, do đó người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể sử dụng sáng chế với nhiều phương án và cải biến thích hợp với việc ứng dụng cụ thể được dự tính. Do đó, tất cả những thay đổi, cải biến, biến thể, và thay thế nên hiểu là nằm trong phạm vi của sáng chế như được xác định bởi các yêu cầu bảo hộ đi kèm được diễn giải theo nghĩa rộng mà công bằng, hợp pháp, bình đẳng.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm diệt cỏ bao gồm:
chất diệt cỏ thu được từ *Setosphaeria monoceras* AGWH#11 được nộp lưu tại NCIM và IMTECH với số nộp lưu lần lượt là NCIM 1370, MTCC 5974;
một trong số chất hoạt động bề mặt và dầu khoáng; và
chất kháng sinh.
2. Chế phẩm diệt cỏ theo điểm 1, trong đó chất diệt cỏ được chọn từ nhóm gồm có chất cây truyền sợi nấm, chất cây truyền bào tử, chất cây truyền bào tử đỉnh, canh trường nuôi cấy, và canh trường nuôi cấy tinh chế ít nhất một phần.
3. Chế phẩm diệt cỏ theo điểm 1, trong đó chất diệt cỏ còn bao gồm canh trường nuôi cấy không chứa tế bào của *Setosphaeria monoceras* AGWH#11.
4. Chế phẩm diệt cỏ theo điểm 1, trong đó chất diệt cỏ còn bao gồm môi trường nuôi cấy cho *Setosphaeria monoceras*.
5. Chế phẩm diệt cỏ theo điểm 1, trong đó chất diệt cỏ còn bao gồm nguồn dưỡng chất cho *Setosphaeria monoceras*.

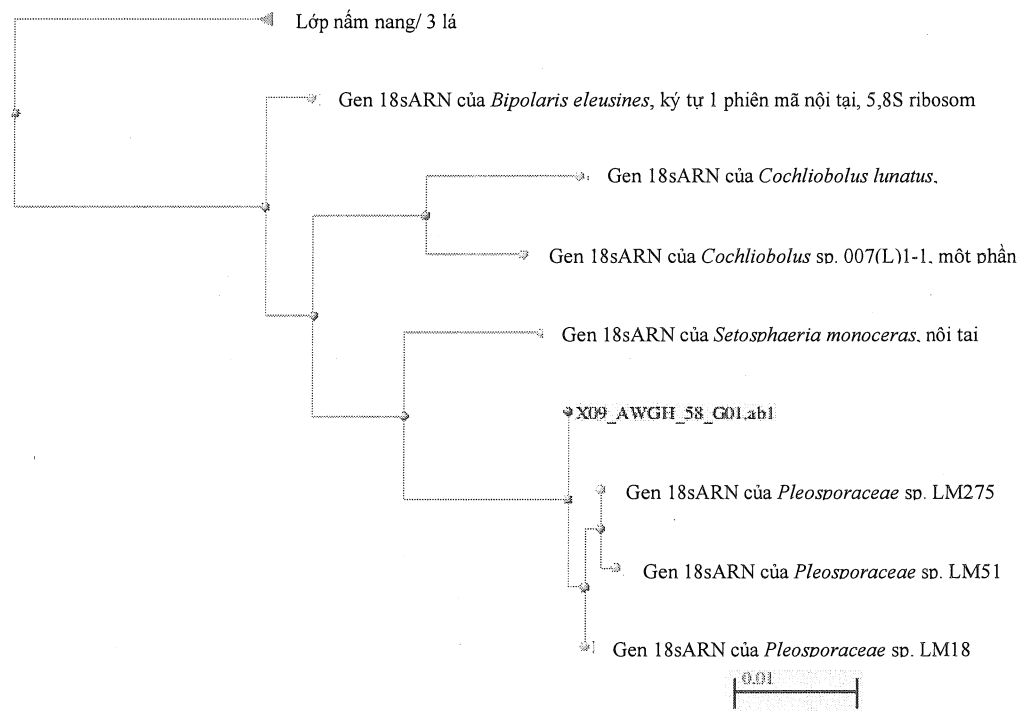


Fig. 1

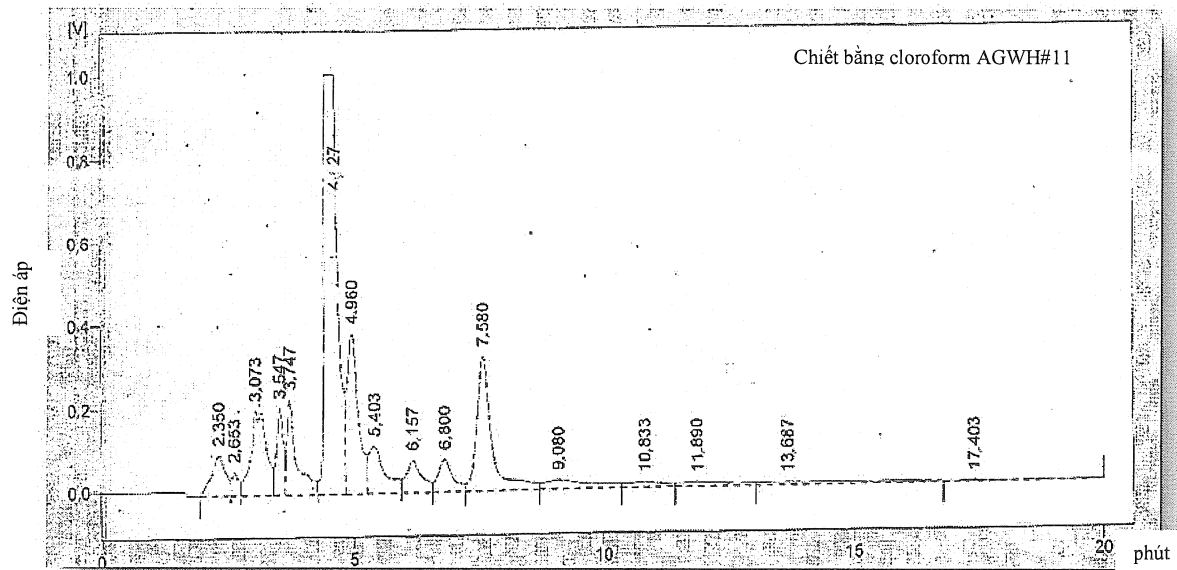


Fig. 2

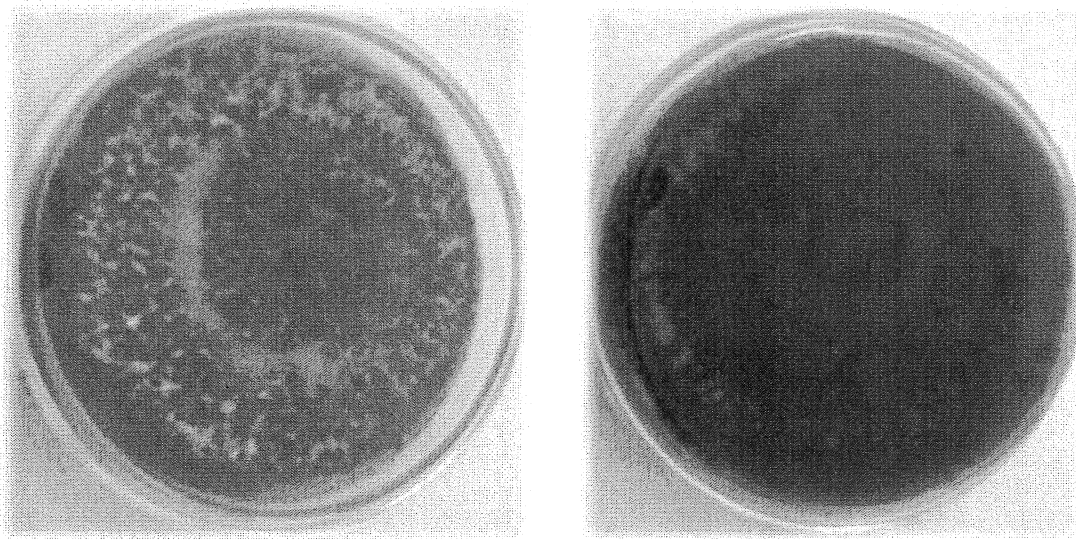


Fig. 3

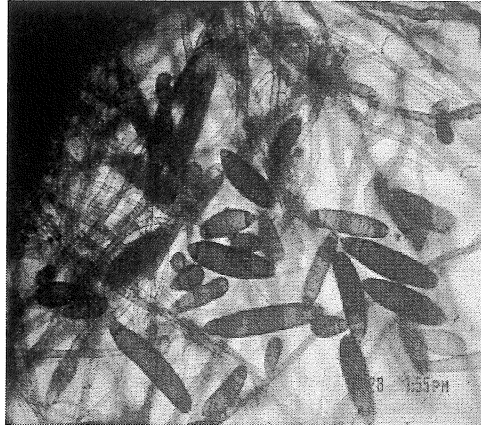


Fig. 4

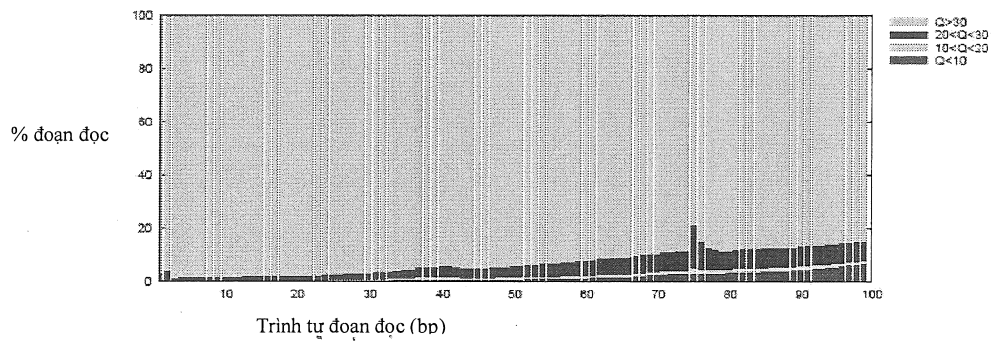


Fig. 5

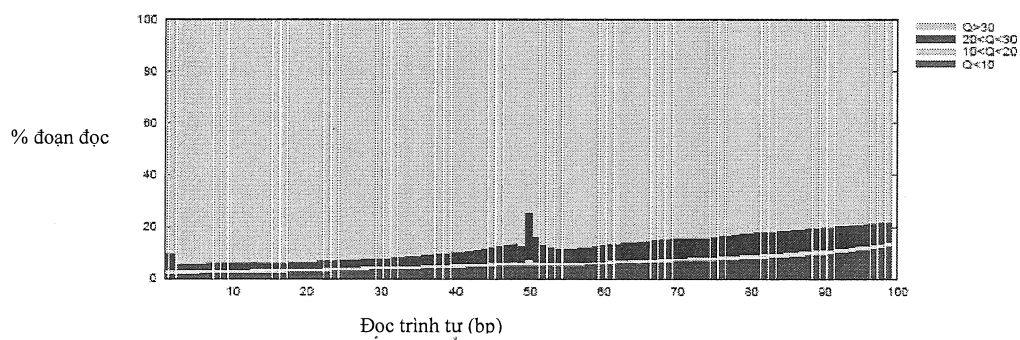


Fig. 6

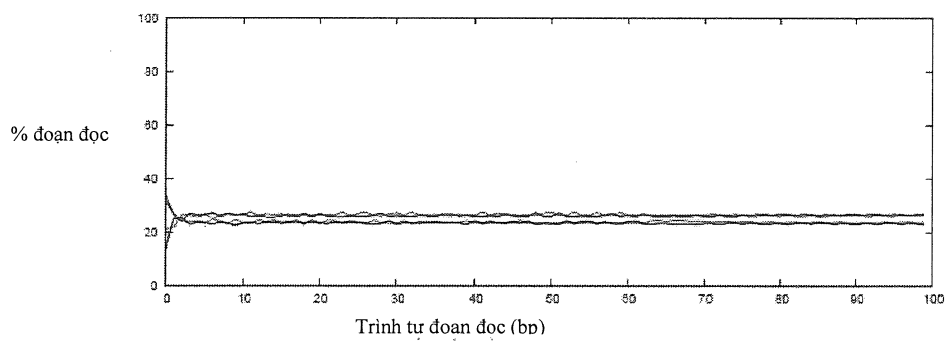


Fig. 7

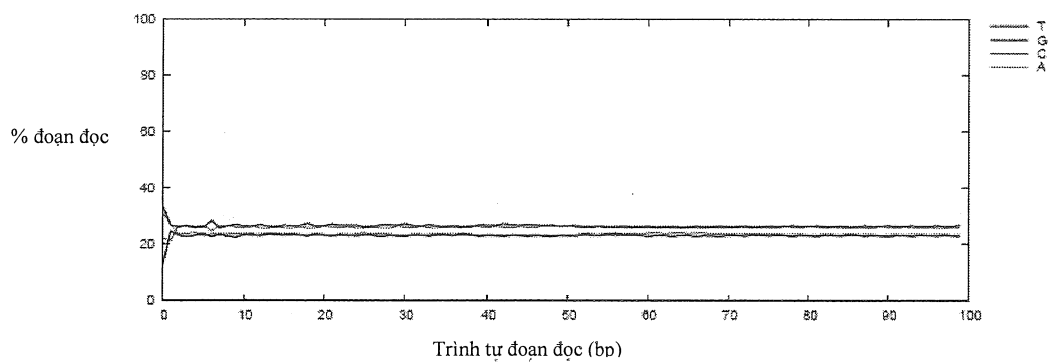


Fig. 8

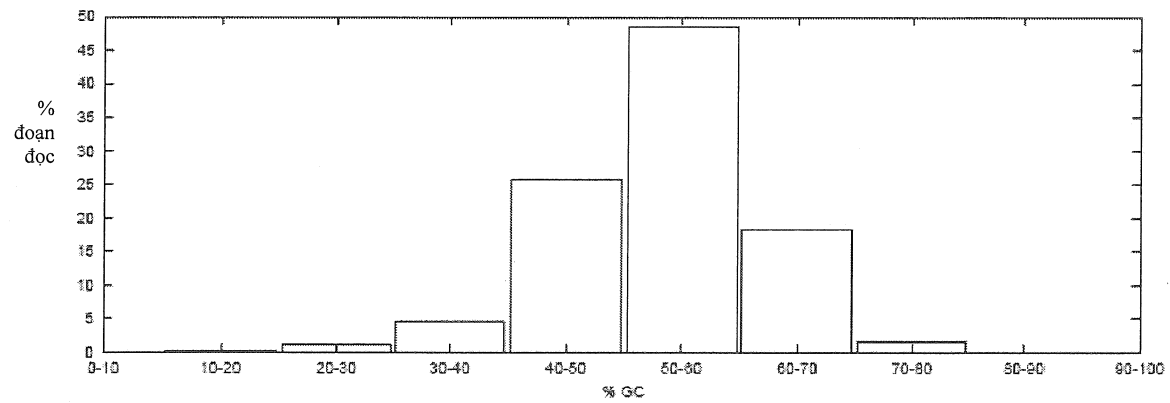


Fig. 9

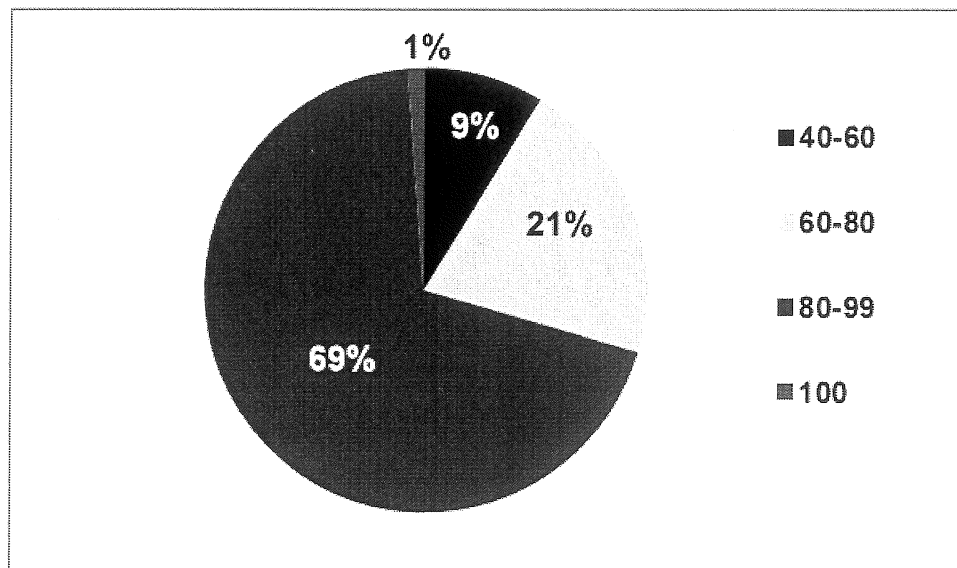


Fig. 10

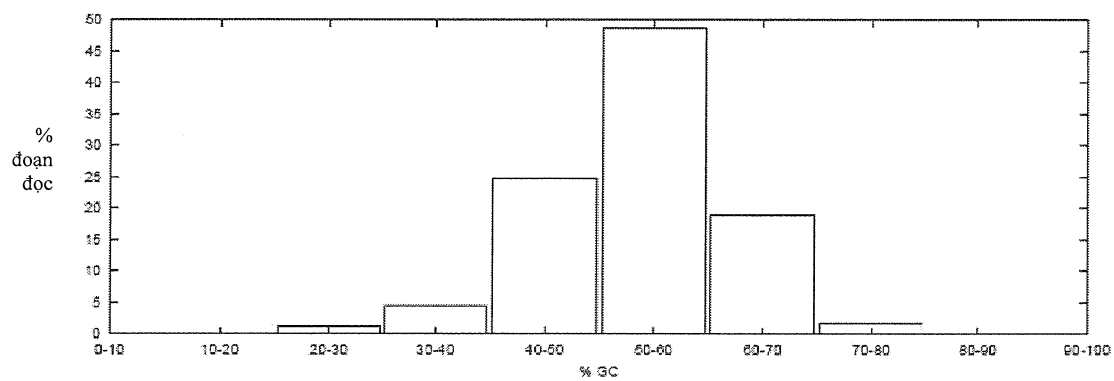


Fig. 11

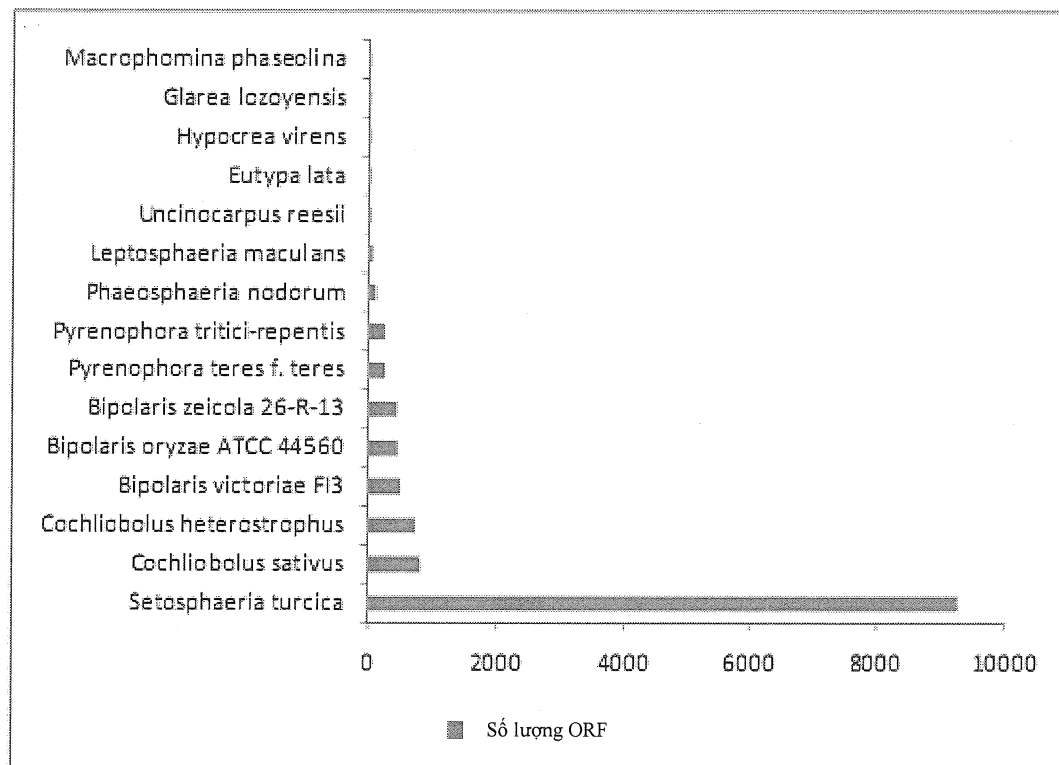


Fig. 12

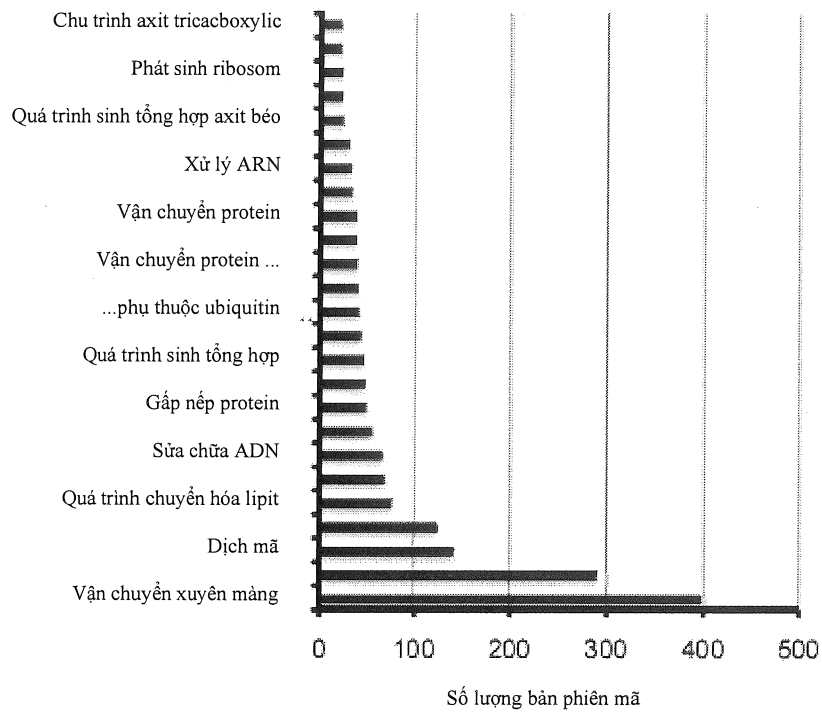


Fig. 13

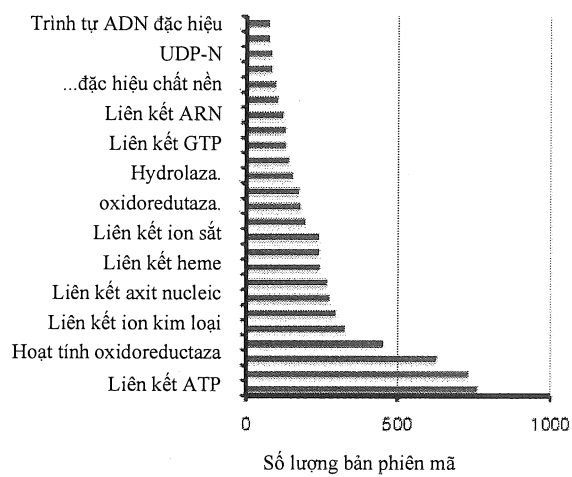


Fig. 14

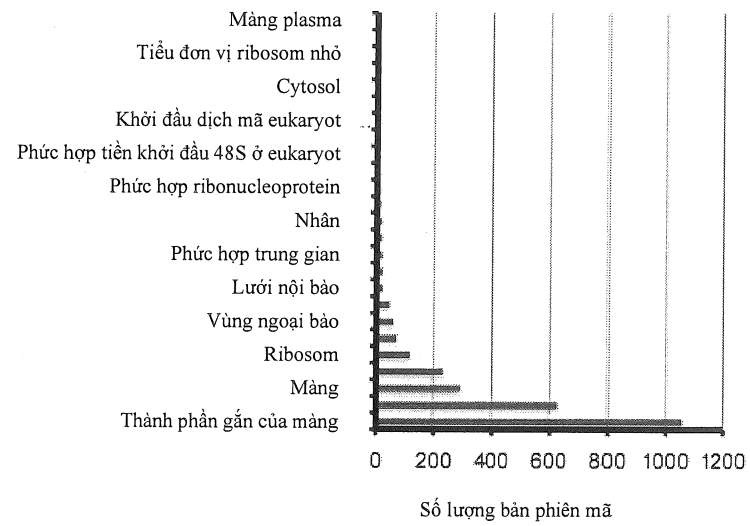


Fig. 15