



(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)



1-0037233

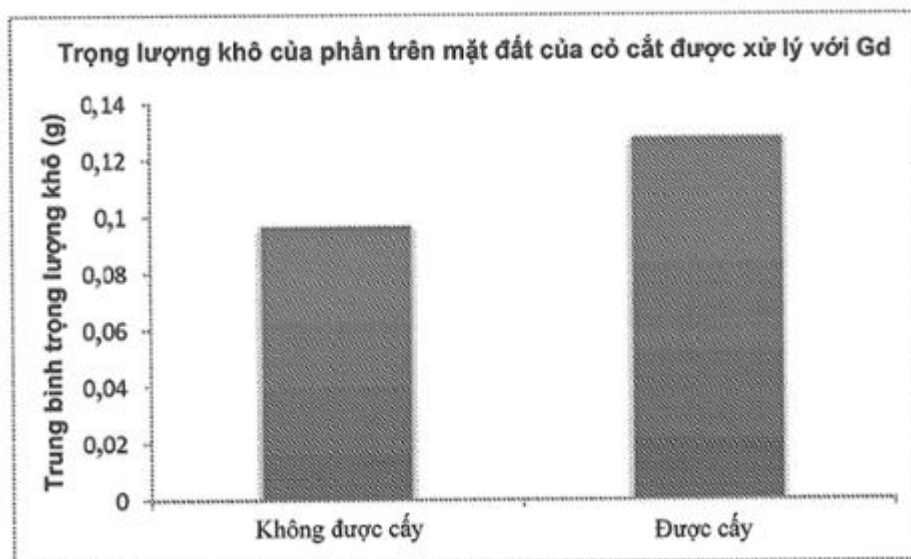
(51)^{2020.01} C05F 11/08; C05G 3/70; C12R 1/02;
C05G 5/27; C12N 1/20; C12R 1/01;
A01N 63/10; C05G 5/23

(13) B

- (21) 1-2017-00541 (22) 28/07/2015
(86) PCT/GB2015/052170 28/07/2015 (87) WO 2016/016629 04/02/2016
(30) 1413333.4 28/07/2014 GB
(45) 25/10/2023 427 (43) 25/07/2017 352A
(73) AZOTIC TECHNOLOGIES LTD. (GB)
R9, Building N2, Chorley Business & Technology Centre, Euxton Lane, Euxton,
Chorley Lancashire PR7 6TE, United Kingdom
(72) DENT, David (GB); CLARKE, Ian (GB).
(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) PHƯƠNG PHÁP CÂY VI KHUẨN CỐ ĐỊNH NITƠ VÀO CÂY

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp cây vi khuẩn cố định nitơ vào cây như *Gluconacetobacter diazotrophicus*, phương pháp này bao gồm sử dụng vi khuẩn cố định nitơ cho vết thương của cây đang sinh trưởng, ví dụ cho cỏ mới cắt. Cây theo cách này dẫn đến các đặc tính sinh trưởng được tăng cường bao gồm màu xanh của cỏ được tăng lên. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến chế phẩm nông dụng chứa *Gluconacetobacter diazotrophicus* thích hợp để sử dụng trong phương pháp, cùng với các kit tạo ra chúng.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp cấy vi khuẩn cố định nitơ vào cây và các chế phẩm và các kit thích hợp để sử dụng trong phương pháp này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Vi khuẩn cố định nitơ *Gluconacetobacter diazotrophicus*, đã được biết đến trước đây là *Acetobacter diazotrophicus* (Gillis, M. et al. Int. J. Syst. Bacterid. 39:361—364; 1989), được phân lập đầu tiên từ rễ và thân cây mía (Cavalcante, V. A., et al. (1988) Plant Soil Vol. 108, p. 23-31). Thông qua việc đưa vào $^{15}\text{N}_2$ đã chứng minh rằng *G. diazotrophicus* cố định nitơ bên trong cây mía (Sevilla, M. et al. Mol. Plant Microbe Interact. 14:358-366; 2001; Boddey, R. M. et al. Plant Soil 252: 139-149; 2003) và nó có khả năng tiết ra gần một nửa số nitơ được cố định ở dạng khả dụng cho cây (Cojho, E. H et al. Fed. Eur. Microbiol. Soc. Microbiol. Lett. 106:341-346; 1993). Vi khuẩn này sẽ xâm nhập vào giữa các tế bào của mô phân sinh của rễ cây mía và tại các điểm xuất hiện của rễ phụ, chúng hình thành khuẩn lạc giữa các tế bào, và tương tự trong mô gỗ, mà không tạo nốt sần (James, E. K. et al. J. Exp. Bot. 52:747-760; 2001). Sự hình thành khuẩn lạc của Gd trong tế bào có thể xảy ra trong các điều kiện cho phép cố định nitơ nội cộng sinh không nốt sần đã được chứng minh (EP-B-1422997 và Cocking, E.C., et al. (2006) In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant Vol. 42, No. 1, p 74-82). Cụ thể, vi khuẩn này được bổ sung vào môi trường sinh trưởng của cây vì cây sinh trưởng từ khi nảy mầm hoặc trong vòng 7 ngày sau đó.

WO2011/144741 gợi ý rằng các vi khuẩn như Gd, có thể được cấy vào thân cây mía để tăng cường quá trình cố định nitơ. Rõ ràng là kỹ thuật này là kỹ thuật có thể được áp dụng trong hoạt động nông nghiệp quy mô lớn bất kỳ.

Các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng các cây đang sinh trưởng có thể được cấy nitơ cố định vi khuẩn thành công.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến phương pháp cấy vi khuẩn cố định nitơ vào cây, phương pháp này bao gồm việc đưa vi khuẩn cố định nitơ vào vết thương của cây đang sinh trưởng.

Đã phát hiện thấy rằng khi đưa vào vết thương của cây, cụ thể là lên bề mặt của vết thương trong mô cây, tốc độ sinh trưởng của cây sau đó được tăng cường.

Ví dụ sinh khối hoặc năng suất có thể tăng lên và/hoặc, số lượng hoa có thể tăng. Điều này có thể là do sự hình thành khuẩn lạc của vi khuẩn cố định nitơ trong mô cây theo cách thức tương tự với cách thức được mô tả như trong EP- B- 1422997, mặc dù thực tế rằng điều này có thể xảy ra khi được áp dụng theo cách thức này là đáng ngạc nhiên. Việc vi khuẩn cố định nitơ hình thành khuẩn lạc bên trong mô cây có thể cung cấp nguồn nitơ nội bào làm tăng khả năng sinh trưởng của cây. Do đó phương pháp theo sáng chế đưa ra biện pháp sử dụng hữu ích phương pháp xử lý tăng cường khả năng sinh trưởng của cây cho cây đang sinh trưởng.

Vi khuẩn cố định nitơ nên là loại vi khuẩn thích hợp, mà có thể được nằm trong tế bào, trong tế bào thực vật. Theo phương án cụ thể, đây là vi khuẩn cố định nitơ cộng sinh hình thành khuẩn lạc nội bào *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Gd), ví dụ chủng *Gluconacetobacter diazotrophicus* IMI 504998 (trước đây là IMI 501986) hoặc IMI 504958 (trước đây là IMI 504853), cả hai đều được nộp lưu tại CABI (Anh) lần lượt là ngày 21 tháng 9 năm 2012 và ngày 22 tháng 5 năm 2015. Các chủng vi khuẩn này là mới và là các khía cạnh khác của sáng chế. Mặt khác, vi khuẩn cố định nitơ có thể là loài *Herbaspirillum*. Các vi khuẩn nitơ cố định khác bao gồm *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Clostridium*, *Rhizobium*, *Klebsiella* và *Spirillum lipoferum*.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Sáng chế sẽ được mô tả cụ thể sau đây bằng ví dụ với viện dẫn đến hình đi kèm trong đó:

Fig. 1 là biểu đồ thể hiện trọng lượng khô trung bình (g) của cỏ cắt không được cây và cỏ cắt được cây;

Fig. 2 là biểu đồ thể hiện trọng lượng khô phần nằm trên mặt đất của cỏ cắt được cây được xử lý với Gd và sucroza, Tween và/hoặc Gôm Arabic hoặc hỗn hợp của chúng;

Fig. 3 thể hiện ví dụ sản xuất nhân giống chèn sinh dưỡng, trong đó (A) thể hiện sự loại bỏ phần cắt và (B) thể hiện theo dạng sơ đồ của các phần phụ của mỗi phần cắt được lấy từ phân lập ADN;

Fig. 4 thể hiện ảnh gel của sản phẩm PCR thu được từ mẫu của cây chèn được cây với Gd; tất cả các băng ở cây đối chứng được giải trình tự và được xác nhận là liên kết không đặc hiệu. Các băng được giải trình tự từ cây được cấy được xác nhận là *Gluconacetobacter diazotrophicus*;

Fig. 5 là biểu đồ thể hiện tác dụng của các cách xử lý khác nhau lên sinh khối của cỏ cắt;

Fig. 6 thể hiện các kết quả của thử nghiệm xác định tác dụng của Gd lên số lượng hoa của cỏ; và

Fig. 7 là biểu đồ thể hiện các kết quả của các cách xử lý với các chế phẩm khác nhau lên sinh khối của cỏ cắt.

Mô tả chi tiết sáng chế

Theo phương án cụ thể, các vi khuẩn cố định nitơ được sử dụng cùng nhau hoặc kết hợp với chủng *Terribacillus*, như được mô tả trong đơn sáng chế quốc tế đang xét nghiệm hưởng quyền ưu tiên từ đơn sáng chế Anh số 1400840,3. Các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng chủng này có thể tăng cường hoạt động của vi khuẩn cố định nitơ. Các chủng *Terribacillus* thích hợp bao gồm *Terribacillus saccharophilus*, *Terribacillus halophilus*, *Terribacillus goriensis* hoặc *Terribacillus aidingensis* nhưng cụ thể là chủng *Terribacillus saccharophilus*. *Terribacillus Terribacillus* được sử dụng một mình hoặc trong hỗn hợp với vi khuẩn cố định nitơ nêu trên. *Terribacillus* có thể nằm trong hỗn hợp với vi khuẩn cố định nitơ, (và sự thật là, IMI501986 (bây giờ là IMI 504998) đã được phân loại là tập hợp của Gd và *Terribacillus*,) hoặc nó có thể được sử dụng trong dạng đồng nuôi cấy, hoặc nuôi cấy hỗn hợp.

Vết thương trên cây có thể là kết quả của tổn thương ngẫu nhiên hoặc do tổn thương từ thiên nhiên, khi có sẵn nitơ bổ sung thì có thể hỗ trợ quá trình sinh trưởng sửa chữa. Tuy nhiên, theo phương án cụ thể, vết thương là kết quả của các hoạt động như xén (cỏ sân vườn), cắt (cỏ ủ chua và cỏ khô), tạo chồi mới (cây chuối, cây dứa, cây mía, cây lúa miến, cây lúa gạo, cây đậu thiều, cây bông, cây chuối sợi, cây gai), cắt tỉa (cây có quả, cây nho), do gia súc tiêu thụ hoặc do thu hoạch. Các hoạt động khác, ví dụ như bừa, trong đó cây có thể bị tổn thương một cách vô ý hoặc tổn thương không hoàn toàn, có thể không thích hợp trong một số trường hợp. Cụ thể, vết thương này sẽ được phát hiện ở phần “nằm trên mặt đất” của cây, như lá hoặc thân.

Do đó, phương pháp theo sáng chế có thể còn bao gồm bước ban đầu là gây “tổn thương” trên cây, cụ thể bằng cách xén, cắt, tạo chồi mới, cắt tỉa hoặc bằng cách thu hoạch. Vi khuẩn cố định nitơ sẽ được dùng thích hợp trong khoảng thời gian tương đối ngắn khi tiến hành các hoạt động này, ví dụ, trong 48 giờ, ví dụ trong 24 giờ, như trong 10 giờ và thích hợp trong 1-2 giờ sau khi tổn thương được tạo ra trên cây.

Việc phân phối vi khuẩn được thực hiện bằng cách đưa chế phẩm phối trộn thích hợp lên vùng bị tổn thương, cụ thể, lên bề mặt của vết thương, ở dạng chế phẩm. Chế phẩm có thể ở dạng chất lỏng, gel, bột nhão mà có thể được sử dụng trực tiếp hoặc ở dạng được pha loãng, hoặc nó có thể ở dạng chế phẩm dạng rắn như chế phẩm dạng bột hoặc hạt mà sẽ được hòa tan trong chất lỏng như nước trước khi sử dụng. Đối với các chế phẩm dạng rắn, vi khuẩn sẽ thường được sử dụng ở dạng được làm khô, ví dụ ở dạng được đông khô, mà có khả năng hoàn nguyên khi bổ sung nước. Vi khuẩn có thể được bao vi nang sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực theo mong muốn, để duy trì khả năng sống và tính ổn định cao của vi khuẩn.

Theo phương án cụ thể, chế phẩm này ở dạng thích hợp để phun trên cây và do đó sẽ chứa phần cô đặc dễ pha loãng mà có thể ở dạng lỏng hoặc rắn, cụ thể ở dạng lỏng, hoặc nó có thể chứa chế phẩm loãng chứa nước mà có thể được phun trực tiếp. Mặt khác, chế phẩm này có thể là chế phẩm trong đó bề mặt của vết thương của cây có thể được ngâm vào ví dụ bằng cách nhúng.

Lượng vi khuẩn cố định nitơ được sử dụng trong trường hợp cụ thể bất kỳ sẽ khác nhau và phụ thuộc vào các yếu tố như loại hạt giống được xử lý, chủng vi khuẩn cố định nitơ cụ thể được sử dụng, mức độ tăng cường nảy mầm cần thiết và phương pháp sử dụng, cũng như hiệu quả cần thiết. Tuy nhiên, thông thường dung dịch chứa từ 1 đến 1×10^7 vi khuẩn trong mỗi mililit chế phẩm được sử dụng, ví dụ từ 10^1 - 10^3 vi khuẩn trong mỗi mililit chế phẩm ví dụ từ 50-200 vi khuẩn trong mỗi mililit chế phẩm như 100 vi khuẩn trong mỗi mililit chế phẩm được sử dụng lên các vết thương của cây. Dung dịch này có thể thu được bằng cách nuôi cấy vi khuẩn đến mức độ dễ phát hiện, ví dụ bằng cách kiểm tra mật độ quang học và sau đó pha loãng dung dịch này.

Các tác giả sáng chế đã phát hiện thấy rằng ví dụ, đối với một số vi khuẩn nhất định, các ảnh hưởng đối với đặc tính như sinh khối, sẽ bị ảnh hưởng bởi lượng vi khuẩn được sử dụng theo cách phụ thuộc liều. Điều này có nghĩa là nhiều liều khác nhau có thể được sử dụng phụ thuộc vào mục đích xử lý. Trong trường hợp là cỏ ví dụ, có thể cần tối đa sinh khối trên đồng cỏ, trong khi đó đối với cỏ sân vườn hoặc bãi cỏ, tốc độ sinh trưởng chậm là khía cạnh có thể được ưu tiên. Trong các trường hợp này, lượng vi khuẩn sẽ được chọn sử dụng để thu được lượng sinh khối tối ưu đối với các loại cỏ mục tiêu, như được minh họa dưới đây.

Theo phương án cụ thể, chế phẩm còn chứa chất dinh dưỡng cho vi khuẩn cố định nitơ, ví dụ chế phẩm có thể chứa 3%w/v sucroza như được mô tả trong EP-B-1422997.

Vi khuẩn cố định nitơ có thể là thành phần có hoạt tính duy nhất của chế phẩm hoặc nó có thể được kết hợp với các thành phần có hoạt tính dùng trong nông nghiệp bổ sung như thuốc trừ sâu, thuốc diệt nấm hoặc chất điều hòa sinh trưởng của cây khi cần.

Chế phẩm có thể còn chứa phụ gia hoặc tá dược như các chất làm đặc, các chất phân tán, các chất pha loãng, các chất giữ ẩm, các chất mang dạng rắn v.v. như được biết đến trong lĩnh vực.

Theo phương án cụ thể, chế phẩm còn chứa polysacarit hoặc chất hoạt động bề mặt nông dụng hoặc hỗn hợp của chúng.

Theo phương án cụ thể, chế phẩm còn chứa chất hoạt động bề mặt nông dụng. Sự có mặt của chất hoạt động bề mặt đảm bảo rằng chế phẩm có khả năng chảy tương đối tự do trên toàn bộ bề mặt của vết thương để tạo điều kiện cho vi khuẩn cố định nitơ xâm nhập vào.

Các chất hoạt động bề mặt hoặc các chất tẩy rửa thích hợp bao gồm các chất tẩy rửa không ion như các chất có tên thương mại là 'Tween'®, ví dụ Tween 80.

Tween 80 là chất tẩy rửa không ion; 70% thành phần là axit béo axit oleic và phần còn lại là hỗn hợp của các axit linoleic, palmitic và stearic. pH của dung dịch 1% nằm trong khoảng từ 5,5-7,2. Các chất tạo nhũ tương và chất phân tán được sử dụng rộng rãi trong sản phẩm y tế và thực phẩm. Nó có ít hoặc không có hoạt tính như chất kháng vi khuẩn (Dawson et al. (1986) Data for Biochemical Research, 3rd ed., Oxford University Press (New York, NY: 1986), p. 289).

Lượng chất hoạt động bề mặt được sử dụng lên vết thương của cây nên đủ để tạo ra hiệu quả tăng cường sinh trưởng của cây khi kết hợp với vi khuẩn cố định nitơ (và kết hợp tùy ý với polysacarit như được mô tả thêm dưới đây). Điều này sẽ khác nhau phụ thuộc vào các nhân tố khác nhau như chất hoạt động bề mặt cụ thể, loại cây được xử lý, bản chất của vết thương, chủng vi khuẩn cố định nitơ cụ thể được sử dụng và phương pháp sử dụng. Tuy nhiên, thông thường, chế phẩm chứa từ 0,0005 đến 10%v/v, như từ 0,0005 đến 0,5%v/v, ví dụ từ 0,0005 đến 1 %v/v, bao gồm từ 0,0005 đến 0,2%v/v ví dụ từ 0,0005 đến 0,15%v/v như khoảng 0,1%v/v.

Theo phương án khác, chế phẩm chứa polysacarit. Polysacarit thích hợp để sử dụng trong chế phẩm chứa polysacarit hydrocoloit có nguồn gốc từ cây, động vật hoặc vi sinh vật.

Cụ thể, chúng bao gồm các dịch tiết gồm polysacarit như gồm Arabic, gồm gati, gồm karaya và gồm tragacan, các dẫn xuất xenluloza như carboxymetylxenluloza, metyloxenluloza, hydroxypropyl xenluloza, hydroxypropyl metyloxenluloza hoặc vi tinh thể xenluloza, tinh bột và các chất phát sinh bao gồm, ví dụ tinh bột ngô, tinh bột sắn, tinh bột khoai tây, tinh bột gạo, tinh bột lúa mỳ, và các loại được biến đổi của chúng như tinh bột tiền hồ hóa, tinh bột oxy hóa, tinh bột etyl hóa, dextrin tinh bột hoặc maltodextrin, pectin, polysacarit có nguồn gốc từ rong biển như aga, alginat, carrageenan, và fucellaran, các gồm từ hạt như gồm guar và gồm đậu locust, polysacarit có nguồn gốc từ lên men bằng vi sinh vật như gồm xanthan và gồm gellan, và nitor chứa polysacarit như chitosan; hoặc hỗn hợp của chúng.

Theo phương án cụ thể, polysacarit dịch tiết gồm polysacarit như gồm Arabic, gồm gati, gồm karaya hoặc gồm tragacan. Ví dụ cụ thể của polysacarit là gồm Arabic.

Gôm Arabica là gồm tự nhiên được thu gom như các dịch tiết từ các loài cây keo khác nhau (Fang et al. 2010 (2010) Biomolecules: 11, 1398-1405); phức hệ polysacarit có phạm vi ứng dụng rộng rãi trong lĩnh vực công nghiệp bao gồm sơn, keo, dược phẩm, dệt may và thực phẩm. Gôm Arabic từ cây keo là polyme phân nhánh của galactosa, rhamnoza, arabinoza, và axit glucuronic như các muối canxi, magie, và kali với trọng lượng phân tử là khoảng 250000. Nó (Badar, K.V. et al. (2011) Recent Research in Science và Technology 3 (5) 6-7) có tác dụng đến quá trình nảy mầm của hạt khi hạt của một số loài cây nhất định được ngâm trong dung dịch 1% của gồm arabica trong 24 giờ trước khi nảy mầm. Hơn nữa, WO02/058466 đã cho thấy rằng chế phẩm nhất định chứa hỗn hợp của polysacarit và peptit có thể làm tăng năng suất cây trồng.

Lượng polysacarit được sử dụng lên vết thương của cây nên đủ để tạo ra hiệu quả tăng cường cố định nitor khi kết hợp với vi khuẩn cố định nitor và kết hợp tùy ý với chất hoạt động bề mặt. Điều này sẽ khác nhau phụ thuộc vào các nhân tố khác nhau như polysacarit sử dụng cụ thể, loại cây được xử lý, bản chất của vết thương, chủng vi khuẩn cố định nitor cụ thể được sử dụng và phương pháp sử dụng. Tuy nhiên, thông thường, chế phẩm chứa từ 0,1 đến 1%w/w, ví dụ từ 0,1 đến 0,5%w/w như khoảng 0,3%w/w polysacarit được sử dụng.

Theo một phương án, chế phẩm chứa cả polysacarit và chất hoạt động bề mặt nông dụng. Trong một số trường hợp, các thành phần này đã được tìm thấy rằng tăng cường hiệu quả của vi khuẩn cố định nitor, và dường như hoạt động cùng nhau để tạo ra độ tăng cường đáng kể hơn. Các cây được xử lý với chế phẩm chứa

các thành phần này có thể thể hiện mức độ sinh trưởng tăng lên như được chứng minh bởi trọng lượng khô tăng lên của cây được xử lý.

Các chế phẩm mới chứa các thành phần nêu trên tạo nên khía cạnh khác của sáng chế. Do đó theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất chế phẩm nông dụng chứa vi khuẩn cố định nitơ, cụ thể *Gluconacetobacter diazotrophicus*, và polysacarit, chất hoạt động bề mặt hoặc hỗn hợp của chúng.

Vi khuẩn cố định nitơ như được mô tả ở trên, và cụ thể là *Gluconacetobacter diazotrophicus* có mặt với lượng thích hợp được mô tả ở trên. Tương tự, polysacarit là polysacarit như được mô tả ở trên, như dịch tiết gồm polysacarit, ví dụ gồm Arabic, và chế phẩm chứa nó với lượng như được mô tả ở trên, ví dụ với hàm lượng là từ 0,1 đến 1%w/w polysacarit. Hơn nữa, chất hoạt động bề mặt thích hợp là chất hoạt động bề mặt như được mô tả ở trên như chất tẩy rửa không ion, ví dụ chất hoạt động bề mặt mà 70% chứa axit béo axit oleic và phần còn lại là hỗn hợp của các axit linoleic, palmitic và stearic.

Theo phương án cụ thể, chế phẩm sẽ chứa từ 0,0005 đến 10%v/v chất hoạt động bề mặt ví dụ từ 0,0005 đến 0,2%v/v chất hoạt động bề mặt.

Theo khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất kit điều chế chế phẩm nông dụng bao gồm vi khuẩn cố định nitơ. Trong các kit này, vi khuẩn cố định nitơ, và cụ thể *Gluconacetobacter diazotrophicus*, có thể được giữ riêng biệt với các thành phần khác của chế phẩm, ví dụ trong các hộp chứa riêng biệt, hoặc trong gói hoặc hộp chứa có hai phần. Vi khuẩn cố định nitơ có thể được đông khô. Các thành phần khác có thể là ở dạng cô đặc, dễ bảo quản hoặc vận chuyển, sẵn sàng để pha loãng với ví dụ, nước, lúc sử dụng. Các phần cô đặc của chất này sẽ chứa các thành phần giống với chế phẩm được liệt kê ở trên, nhưng thông thường với mức độ cao hơn. Do đó, ví dụ, phần cô đặc có thể chứa từ 1 đến 10%w/w, ví dụ từ 1 đến 5%w/w như khoảng 3%w/w polysacarit, và pha loãng 10 lần sẽ tạo ra chế phẩm thích hợp để sử dụng trong ví dụ, phương pháp theo sáng chế. Tương tự, chất hoạt động bề mặt có thể có mặt với lượng từ 0,005 đến 2%v/v trong phần cô đặc. Các thành phần khác, như ví dụ, chất dinh dưỡng cho vi khuẩn cố định nitơ là thích hợp để chứa trong phần cô đặc với hàm lượng cần thiết.

Các kit của loại này có thể được sử dụng để tạo ra chế phẩm theo sáng chế, có thể được sử dụng trực tiếp. Cụ thể phần cô đặc bất kỳ sẽ được pha loãng với nước đến thể tích thích hợp, trong đó vi khuẩn cố định nitơ sẽ được thêm vào.

Sáng chế cho phép vi khuẩn cố định nitơ nội bào được sử dụng và được vận chuyển cho phạm vi cây trồng rộng. Cụ thể, chúng có thể là cây lâu năm, cây hai

năm, hoặc cây một năm không rụng lá bao gồm nhưng không giới hạn ở cây có quả và cây bụi (ví dụ cây việt quất, cây mâm xôi và cây chèn), cây nho, cây thức ăn gia súc (cây linh lăng và cỏ đề ỉ chua, đề khô hoặc sử dụng trực tiếp bởi gia súc) cỏ sân vườn và cây hàng rào, cây lâm nghiệp, cây trồng trọt và thảo mộc (ví dụ họ, măng tây, cà tím).

Gd trước đây đã được thông báo rằng có thể cải thiện sản xuất của cây trồng giàu sucroza như củ cải đường hoặc mía (WO2010/022517). Tuy nhiên, Các tác giả sáng chế đã tìm thấy rằng khi sử dụng cách xử lý theo sáng chế, thì sự cải thiện được trông thấy ở cây trồng không giàu sucroza và chúng tạo nên phương án cụ thể theo sáng chế.

Theo phương án cụ thể, phương pháp và chế phẩm theo sáng chế được sử dụng lên cỏ như cỏ sân vườn, bãi cỏ hoặc đồng cỏ, ngay sau khi cắt hoặc một lát sau khi cắt. Cách xử lý này dẫn đến sự sinh trưởng được tăng cường của cỏ với bằng chứng là trọng lượng khô tăng lên của cỏ được cấy so với cỏ không được cấy. Vi khuẩn cố định nitơ có khả năng đi vào trong cây cỏ qua vết thương do quá trình cắt, và hình thành khuẩn lạc trong tế bào cây cỏ, dẫn đến các đặc tính sinh trưởng được tăng cường.

Hơn nữa, sự hình thành khuẩn lạc bởi Gd được tìm thấy rằng có thể làm tăng mức diệp lục trong cây và cụ thể là trong các loại cỏ như cỏ đồng cỏ, cỏ sân vườn hoặc cỏ bãi cỏ. Sự tăng diệp lục liên quan đến không chỉ hàm lượng nitơ mà còn liên quan đến mức độ màu xanh của cây, đặc tính này rất được mong muốn khi sử dụng như cỏ sân vườn trong đó mức độ màu xanh đậm là có lợi.

Tuy nhiên, người có hiểu biết trong lĩnh vực sẽ biết rõ rằng các chi tiết cụ thể là không cần thiết để thực hành sáng chế. Phần mô tả dưới đây của các phương án cụ thể theo sáng chế được thể hiện với mục đích giải thích và mô tả. Chúng không có dự định nêu toàn diện hoặc hạn chế sáng chế đến các dạng chính xác được bộc lộ nào. Rõ ràng là, nhiều biến đổi và biến thể là có khả năng xảy ra. Các phương án được thể hiện và được mô tả để giải thích tốt nhất các nguyên tắc của sáng chế và các ứng dụng thực tế của nó, từ đó cho phép người có hiểu biết trong lĩnh vực sử dụng sáng chế tốt nhất và các phương án khác nhau với các biến đổi khác nhau được làm cho phù hợp với cách sử dụng cụ thể được dự liệu.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1

Áp dụng lên cỏ cắt

Phương pháp

Nuôi cấy *G. diazotrophicus*:

Chủng *G. diazotrophicus* EVII 501986 (hiện tại là IMI 50998) với plasmid pRGS561 biểu hiện GUS, được nuôi cấy trên môi trường ATGUS, cần [0,8% (w/v) aga, chiết xuất từ nấm men (2,7 g l⁻¹), glucoza (2,7 g l⁻¹), manitol (1,8 g l⁻¹), dung dịch đệm MES (4,4 g l⁻¹), K₂HPO₄ (4,8 g l⁻¹), và KH₂PO₄ (0,65 g l⁻¹), pH 6,5]. Sự biểu hiện của b-glucuronidaza (*gusA*) gen được thử nghiệm bằng cách cấy trên môi trường ATGUS chứa X-Gluc (muối xyclohexylamoni axit 5-brom-4-clo-3-indolyl-beta-D-glucuronic) với 50 mg l⁻¹; sự hình thành các khuẩn lạc màu xanh dương đậm thể hiện sự biểu hiện của gen *gusA*.

Quy trình cấy:

Huyền phù chứa nước của *G. diazotrophicus* được tạo ra với mật độ quang học ở 600 nm là 1,1, 10⁹ đơn vị hình thành khuẩn lạc (CFU) mỗi mililit. Số lượng CFU được xác định bằng dãy pha loãng, cấy trên môi trường ATGUS (với kháng sinh thích hợp) và đếm các khuẩn lạc vi khuẩn sau 4 ngày nuôi cấy trên đĩa Petri (28°C, tối). Huyền phù được pha loãng đến 10⁻⁴ để tạo ra dung dịch chứa khoảng 100 vi khuẩn mỗi ml sẵn sàng để phun như được mô tả dưới đây.

Trọng lượng tiêu chuẩn của 0,5g hạt giống *Cassiopeia* cỏ *Lolium perenne* được gieo trong khay cây giống chứa phân trộn John Innes số 1 và phủ một ít phân trộn.

Các khay riêng lẻ được đặt trong khay lớn hơn và được cung cấp đủ nước trong phòng sinh trưởng ở chu kỳ 21°C/15°C ngày/đêm 16/8h trong 20 ngày. Sau đó, cỏ được cắt với độ cao là 2 cm ở trên mặt đất sử dụng kéo (các mẫu được loại bỏ) và các hỗn hợp xử lý sau được áp dụng có sử dụng máy phun sương cầm tay:

Thử nghiệm 1. Hỗn hợp xử lý

Nước đối chứng + 3% sucroza

Gd + nước + 3% sucroza

Thử nghiệm 2: Hỗn hợp xử lý

Gd + nước

Gd + nước + 3% sucroza

Gd + nước + 0,1%Tween

Gd + nước + 0,3% Gôm Arabic

Gd + nước + 3% sucroza + 0,1% Tween

Gd + nước + 3% sucroza + 0,3% Gôm Arabic

Gd + nước + 3% sucroza + 0,1% Tween + 0,3% Gôm Arabic

Trọng lượng khô của cây giống đã nảy mầm

Cây giống được lấy ra từ aga bằng kẹp và toàn bộ lượng aga còn lại được rửa khỏi rễ. Mỗi cây giống được đặt trong túi giấy và được đặt lò nướng 80°C trong 48 giờ và sau đó được cân.

Các kết quả từ thử nghiệm 1 và thử nghiệm 2 được thể hiện lần lượt trong Fig. 1 và 2.

Các kết quả trong Fig. 1 thể hiện trọng lượng khô trung bình của cỏ tăng lên đáng kể (0,09676g trong biểu đồ không được cấy và 0,1276g trong biểu đồ được cấy). Các trọng lượng khô này khác biệt đáng kể với $P < 0,01$. Do đó, cấy theo phương pháp này rõ ràng rằng dẫn đến tăng cường sinh trưởng đáng kể.

Các kết quả này được thể hiện trên Fig. 2 thể hiện khác biệt đáng kể ($P < 0,001$) giữa Gd/S/T/GA và trọng lượng khô cao nhất tiếp đó (Gd/T) và Gd/S/T, thể hiện tác dụng hiệp đồng của hỗn hợp ba thành phần. Gd và Gd/S không có khác biệt đáng kể với $P = 0,05$.

Vi dụ 2

Sự hình thành khuẩn lạc ở chè (Camellia sinensis) bởi Gluconacetobacter diazotrophicus (Azoticus)

Sự tái tạo sinh dưỡng từ thân cắt

Tiêu chuẩn trung bình của nhân giống thực vật của các dòng vô tính của chè là cắt lá đơn. Từ thân lớn hơn bao gồm khoảng bốn đến sáu mắt và một ngọn chồi, các phần thân và lá được chọn dựa trên tình trạng của mô (nghĩa là không có sâu và bệnh). Phần được chọn để cắt nằm giữa phần gỗ đỏ và xanh lá cây như được khuyến nghị bởi Yamasaki et al. Soil and Crop Management, (2008) SCM-23). Các chồi mới trưởng thành chứa phần vỏ cây màu đỏ nhạt liền kề với lá trưởng thành với các chồi nách đang nảy tích cực được tìm thấy là tạo rễ thành công nhất.

Từ các phần được ưu tiên, mẫu được chọn bao gồm phần thân 3-5cm và một lá khỏe mạnh. Mỗi phần thân được cắt sử dụng cắt chéo (1) khoảng 0,5cm phía trên lá (2) và cắt chéo khác phía dưới lá quanh đốt (3) tránh chèn ép hoặc làm gấp vị trí vết thương (xem Fig. 3A.)

Chân của mỗi thân cắt của chè được nhúng vào dung dịch axit indol butyric 1% và được đặt vào các bình riêng biệt; phần cắt được trồng với phần thân thẳng hơi nghiêng sao cho lá không chạm đất. Mỗi bình chứa cát và hỗn hợp cát John Innes số 1 với tỷ lệ 4:1, được bão hòa bởi nước. Áp dụng lên mặt trên của mỗi phần cắt 20 μ l nước, hoặc 20 μ l Gd với $2,5 \times 10^5$ cfu/ml trong nước, và độ ẩm của mỗi mẫu được duy trì bằng cách phủ lên mỗi bình tấm nhựa và phun nước nhẹ nhàng.

Sau 3 tháng sinh trưởng, và để xác nhận sự hình thành khuẩn lạc thành công của Gd ở thân cắt, thân cắt không được cấy và thân cắt được cấy được lấy ra từ các bình. Mỗi phần cắt được chia thành các phần là (a) đỉnh chồi, gồm cả vị trí cấy (4) trong (Fig. 3B), (b) phần mắt (5) trong Fig. 3B, và (C) phần thân thấp hơn bao gồm mô rễ bất kỳ (6) trong Fig. 3B. Các phần này sau đó được đông lạnh nhanh trong nitơ lỏng.

Sự phân lập ADN từ mỗi phần cắt (nghĩa là 4, 5 và 6 trong Fig. 3B) được tiến hành sử dụng chất phản ứng TRIzol theo quy trình của nhà sản xuất và PCR được tiến hành. Phản ứng PCR được tiến hành là phản ứng hai bước như được mô tả bởi Tian et. al, (2009); bước đầu tiên sử dụng GDI-25F (5'-T AGTGGCGGACGGGTGAGTAACG-3') và GDI-923R (5'-CCTTGCGGGAAACAGCCATCTC-3') sao chép sản phẩm 899bp chứa đơn vị siêu sao chép của mồi GDI139F (5'-TGAGTAACGCGTAGGGATCTG-3') và GDI916R (5'-GGAAACAGCCATCTCTGACTG-3'), mồi sau được thiết kế dựa trên thông tin trình tự 16S rADN có trong cơ sở dữ liệu của Ngân hàng Gen. Sau bước biến tính đầu tiên ở 95°C trong 3 phút, profin nhiệt độ sau được thực hiện 32 lần; biến tính trong 20 giây ở 95°C, ghép trong 45 giây ở 55°C, và kéo dài trong 20 giây ở 72°C, với bước kéo dài cuối cùng trong 5 phút ở 72°C. Sau đó, một microlit sản phẩm PCR này được lấy và được dùng làm mẫu cho bước thứ hai của PCR sử dụng GDI39F và GDI916R. Các thông số biến đổi trong lần hai bao gồm tăng nhiệt độ ghép đến 62°C trong 15 giây, và tăng số chu kỳ lên 39. Sản phẩm sao chép PCR được phân tích trên gel agarosa 1% được nhuộm với ethidi bromua cũng như được giải trình tự để xác nhận danh tính của sản phẩm (Fig. 4.).

Đáng ngạc nhiên rằng, AzGd không được phát hiện ở phần 4 của chè cắt gợi ý rằng AzGd di chuyển hướng gốc từ vị trí vết thương sau khi cấy, được phát hiện lần lượt ở phần 5 và 6.

Các kết quả giải trình tự và BLAST sau đó xác nhận rằng các băng nhìn thấy ở phần 1 của cây đối chứng là kết quả của liên kết không đặc hiệu của bộ môi đã sử dụng, với các băng 4 nhìn thấy ở phần 2 và 3 của mô được cấy được nhận diện là *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 (nhận diện 100%, độ che phủ trình tự truy vấn 86% và giá trị E là $7e-04$). Các kết quả gợi ý rằng mặc dù AzGd có số bản sao thấp trong mô được cấy, đã hình thành khuẩn lạc thành công ở *Camellia sinensis* sau khi cấy vị trí vết thương. Đây có thể là ví dụ đầu tiên về sự hình thành khuẩn lạc bởi Gd ở cây lâu năm.

Ví dụ 3

Nghiên cứu ảnh hưởng của hỗn hợp xử lý lên sinh khối cỏ

Cỏ được trồng trong buồng sinh trưởng của cây (Fitotron®) ($23^{\circ}\text{C}/15^{\circ}\text{C}$ ở độ ẩm 65%) trong các khay hạt sử dụng phân trộn John Innes số 1, trong 2 tuần. Sau đó nó được cắt với độ cao 8cm và được phun ngay với 10ml của hỗn hợp xử lý như được thiết lập bên dưới sử dụng máy phun nước.

Hỗn hợp xử lý

1. Nước
2. 3% sucroza + 0,1% Tween + 0,3% Gôm Arabic
3. Nước + Gd ($2,5 \times 10^5$ cfu/ml)
4. Nước + 3% sucroza + 0,1% Tween + 0,3% Gôm Arabic + Gd ($2,5 \times 10^3$ cfu/ml)
5. Nước + 3% sucroza + 0,1% Tween + 0,3% Gôm Arabic + Gd ($2,5 \times 10^4$ cfu/ml)
6. Nước + 3% sucroza + 0,1% Tween + 0,3% Gôm Arabic + Gd ($2,5 \times 10^5$ cfu/ml)
7. Nước + 3% sucroza + 0,1% Tween + 0,3% Gôm Arabic + Gd ($2,5 \times 10^6$ cfu/ml)
8. Nước + 3% sucroza + 0,1% Tween + 0,3% Gôm Arabic + Gd ($2,5 \times 10^7$ cfu/ml)

Cỏ được đưa lại Fitotron thêm 2 tuần dưới các điều kiện sinh trưởng tương tự. 5 cây, được chọn ngẫu nhiên, được cắt ở mặt đất để tạo ra một mẫu và được cân. Điều này được lặp lại thêm năm lần để tạo ra tổng số sáu mẫu cho mỗi cách xử lý.

Những mẫu này được làm khô trong lò nướng trong 48 giờ và được cân.

Các kết quả được thể hiện trên Fig. 5. Các kết quả này thể hiện rằng, có một ít sucroza để hỗ trợ sinh trưởng của Gd, sinh khối của cỏ tăng lên với sự thêm vào của Gd phụ thuộc vào chế phẩm. Hơn nữa, sự tăng lên này phụ thuộc liều, với sinh trưởng tối ưu quan sát được với $2,5 \times 10^6$ cfu/ml. Do đó nếu cỏ được xử lý là cỏ đồng cỏ trong đó việc tối đa hóa sinh khối là có lợi, thì liều này có thể là có lợi. Tuy nhiên, nếu cỏ được xử lý là cỏ sân vườn hoặc cỏ bãi cỏ, sinh khối thấp hơn với độ xanh được tăng cường có thể là có lợi trong đó nó có thể cải thiện về bề ngoài mà không làm tăng nhu cầu cắt hoặc xén hơn nữa. Trong trường hợp này, liều ít hơn hoặc nhiều hơn $2,5 \times 10^6$ cfu/ml có thể được sử dụng.

Ví dụ 4

Thử nghiệm thực tế

Chế phẩm chứa nước + 3% sucroza + 0,1% Tween + 0,3% gồm Arabic + Gd ($2,5 \times 10^5$ cfu/ml) được áp dụng cho một mảnh cỏ cắt 1m^2 (thiết lập bãi cỏ *Lolium perenne*) tương ứng với mảnh cỏ cắt không được cấy 1m^2 chỉ được xử lý với nước (đối chứng).

Chế phẩm và nước được áp dụng, trong 30 phút lên cỏ mới được cắt, sử dụng máy phun ẩm gia đình để so sánh mảnh đối chứng được cách ly với mảnh được xử lý bằng màn nhựa. Việc áp dụng này được tạo ra cuối buổi chiều khi đứng gió.

Các mảnh 1m^2 được chia mẫu sử dụng dây góc vuông phân tư 20cm bằng cách đếm số lượng hoa được kéo dài hoàn toàn và hình thành hoàn toàn.

Các kết quả từ mỗi 20cm vuông trong mỗi mảnh được lấy trung bình và các kết quả được thể hiện trên Fig. 6. Rõ ràng rằng xử lý Gd, được áp dụng theo cách này, có ảnh hưởng đáng kể lên hoa sinh trưởng.

Ví dụ 5

So sánh các thành phần của chế phẩm

Phương pháp của ví dụ 3 được lặp lại sử dụng các chế phẩm khác nhau chứa các thành phần riêng rẽ của chế phẩm được sử dụng trong thử nghiệm đó. Cụ thể là, các chế phẩm được sử dụng trong thử nghiệm này như sau:

Hỗn hợp xử lý

1. Nước

2. Nước + Gd ($2,5 \times 10^5$ cfu/ml)
3. Nước + 3% sucroza + 0,1% Tween + 0,3% Gôm Arabic + Gd ($2,5 \times 10^5$ cfu/ml)
4. 0,3% Gôm Arabic + Gd ($2,5 \times 10^5$ cfu/ml)
5. 3% Sucroza + Gd ($2,5 \times 10^5$ cfu/ml)
6. 0,1% Tween + Gd ($2,5 \times 10^5$ cfu/ml)

Cỏ AberGlyn cỏ được trồng trong 2 tuần trong đất John Innes số 1 trong buồng sinh trưởng của cây (Fitotron®) ở 23/15°C, độ ẩm 80%. Cỏ được cắt tới độ cao 8cm với kéo, các phần cắt được loại bỏ và cỏ được phun ngay với 10ml hỗn hợp xử lý sử dụng máy phun nước. Cỏ được đưa lại buồng sinh trưởng của cây thêm hai tuần.

Năm cây được chọn ngẫu nhiên từ khay và gom chung để tạo ra một mẫu và được cân. Điều này được lặp lại thêm năm lần do đó tổng số sáu mẫu được lấy cho mỗi xử lý. Cỏ được làm khô trong 48 giờ ở 80°C và sau đó được cân.

Các kết quả được thể hiện trên Fig. 7. Thử nghiệm này thể hiện rằng thành phần được sử dụng có ảnh hưởng lên sinh trưởng của cỏ. Trong ví dụ này, chất hoạt động bề mặt làm tăng trọng lượng khô nhiều nhất. Gôm Arabic thể hiện cải thiện ở rìa chỉ so với đối chứng, có thể do thực tế là chất hoạt động bề mặt có thể là cần thiết để hỗ trợ sự lan ra của Gd trên cây và giúp chất lỏng đi vào vết thương của cỏ (mặc dù trong trường hợp này, hỗn hợp không thể hiện cải thiện mong muốn). Một lần nữa hỗn hợp xử lý nước + Gd tương tự với đối chứng do đó chỉ ra rằng Gd cần bổ sung ít nhất một số thành phần trong các thành phần này để hình thành khuẩn lạc ở vết thương.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp cấy vi khuẩn cố định nitơ vào cây, phương pháp này bao gồm tạo vết thương cho cây đang sinh trưởng trên mặt đất ở bước đầu tiên mà không bao gồm việc đưa vi khuẩn cố định nitơ vào cây và sau bước đầu tiên này, sử dụng vi khuẩn cố định nitơ cho vết thương của cây được tạo ra bằng cách tạo vết thương.
2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó việc tạo vết thương cho cây bao gồm tạo vết thương cho thân hoặc lá của cây.
3. Phương pháp theo điểm 1, trong đó việc tạo vết thương cho cây là do xén, cắt, tỉa, do gia súc tiêu thụ hoặc do thu hoạch.
4. Phương pháp theo điểm 1, trong đó việc sử dụng vi khuẩn cố định nitơ cho cây là thông qua chế phẩm hoặc kit mà, ngoài vi khuẩn cố định nitơ, chứa polysacarit và/hoặc chất hoạt động bề mặt.
5. Phương pháp theo điểm 4, trong đó polysacarit là polysacarit hydrocoloit.
6. Phương pháp theo điểm 4, trong đó polysacarit là dịch tiết gồm polysacarit.
7. Phương pháp theo điểm 1, trong đó việc sử dụng vi khuẩn cố định nitơ cho cây xảy ra trong khoảng từ 1 đến 48 giờ sau khi tạo vết thương cho cây.
8. Phương pháp theo điểm 1, trong đó cây có mức diệp lục tăng tương ứng với mức của cây trước khi phương pháp này được áp dụng cho cây.
9. Phương pháp theo điểm 1, trong đó vi khuẩn cố định nitơ chứa *Gluconacetobacter diazotrophicus*.
10. Phương pháp theo điểm 1, trong đó vi khuẩn cố định nitơ chứa chủng *Gluconacetobacter diazotrophicus* được nộp lưu tại CABI ở Anh với số tiếp cận IMI 504998.
11. Phương pháp theo điểm 1, trong đó vi khuẩn cố định nitơ chứa chủng *Gluconacetobacter diazotrophicus* được nộp lưu tại CABI ở Anh với số tiếp cận IMI 504958.
12. Phương pháp theo điểm 1, trong đó vi khuẩn cố định nitơ cung cấp thành phần có hoạt tính duy nhất của chế phẩm mà được sử dụng cho cây.
13. Phương pháp theo điểm 1, trong đó cây là cây lâu năm, cây 1 năm không rụng lá, hoặc cây hai năm.

14. Phương pháp theo điểm 1, trong đó cây là cây nông nghiệp, cây trồng, cây lâm nghiệp, hoặc cây làm vườn.

15. Phương pháp theo điểm 1, trong đó cây là cây có quả, cây bụi, cây nho, cây làm thức ăn gia súc, cây thảo mộc, hoặc cây cỏ.

16. Phương pháp theo điểm 15, trong đó cây cỏ là cây cỏ sân vườn, cây cỏ đồng cỏ, hoặc cây cỏ bãi cỏ.

17. Phương pháp cấy vi khuẩn cố định nitơ vào cây, phương pháp này bao gồm, ở bước đầu tiên, tạo vết thương cho cây đang sinh trưởng và sau đó, sử dụng vi khuẩn cố định nitơ cho vết thương đã tạo ra, trong đó cây là cây cỏ sân vườn, cây cỏ bãi cỏ, hoặc cây cỏ đồng cỏ.

Fig. 1

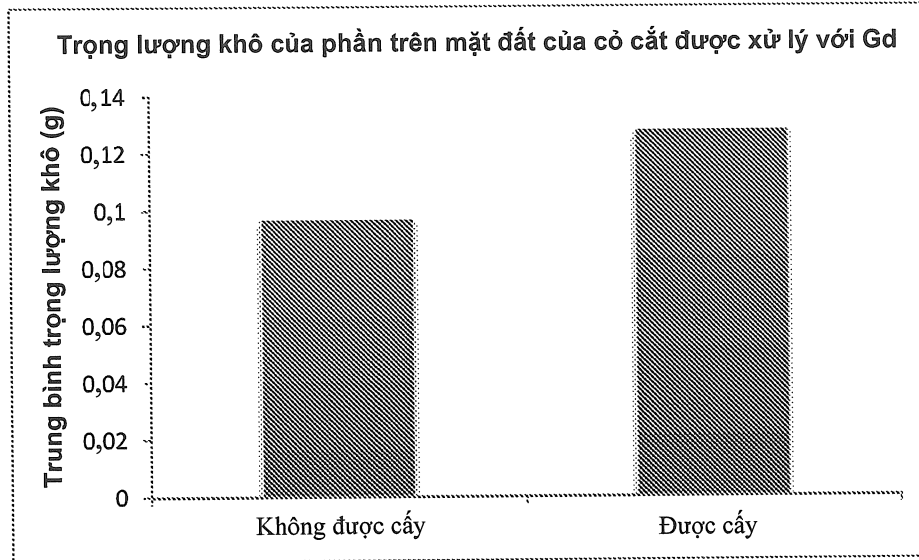


Fig. 2

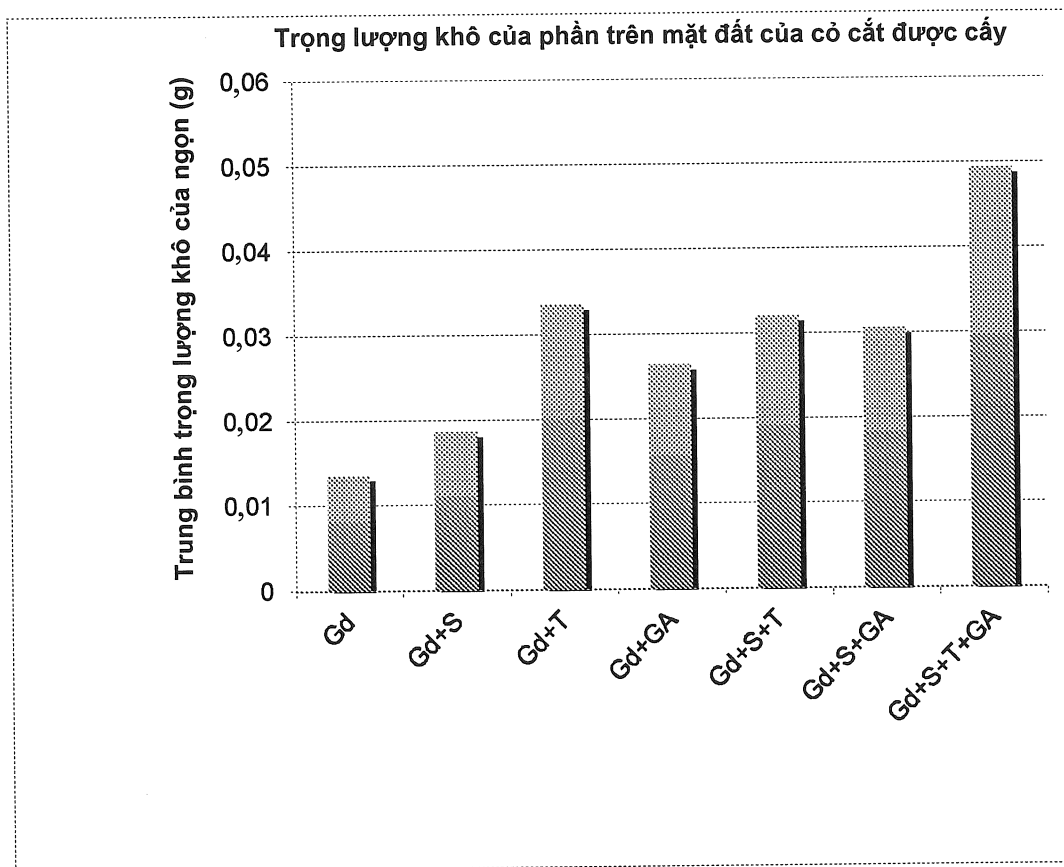
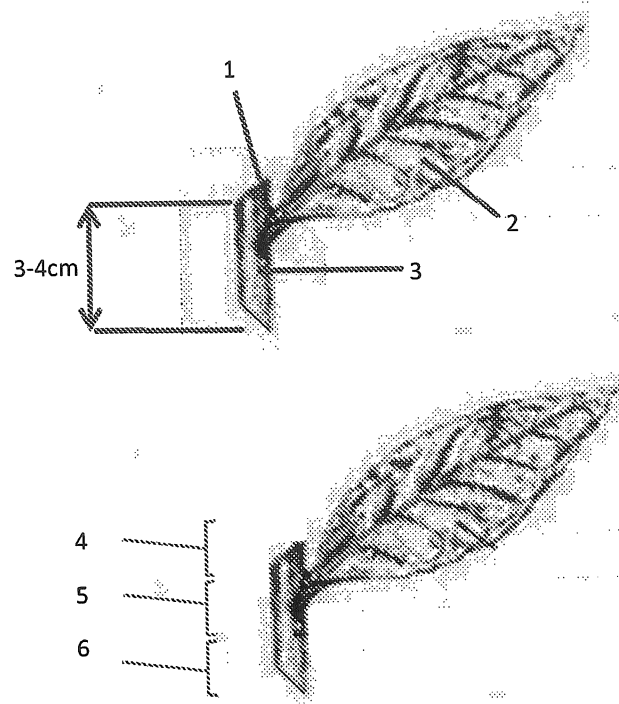


Fig. 3



B

Fig. 4

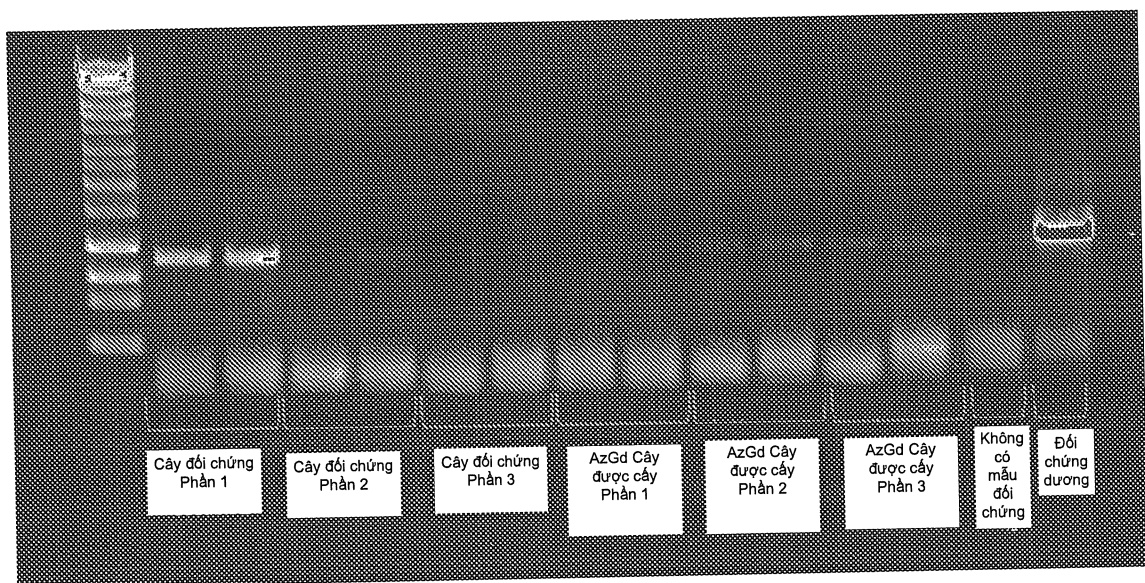


Fig. 5

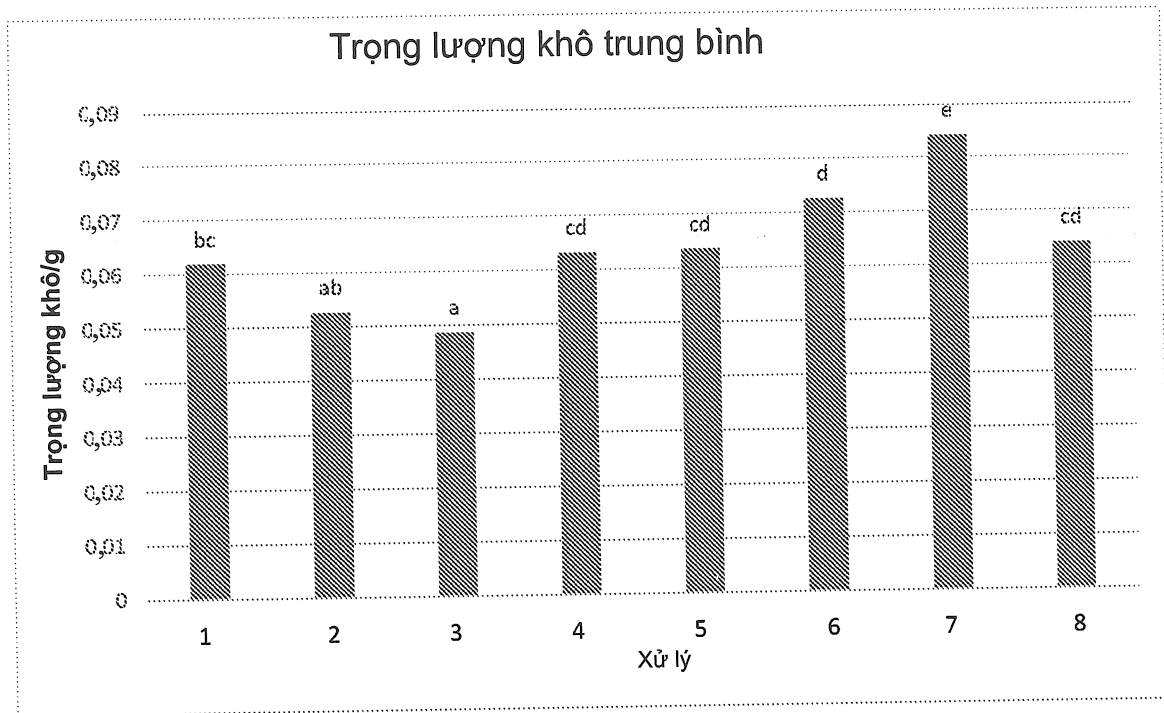


Fig. 6

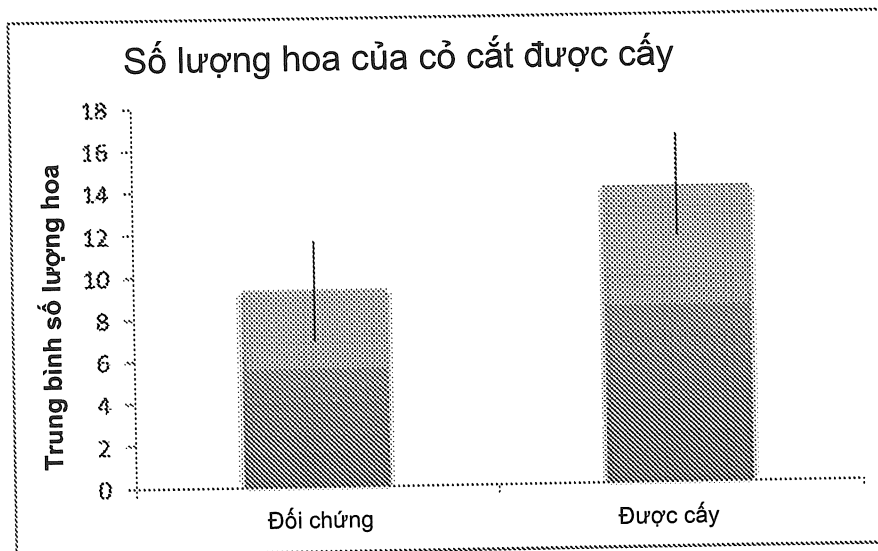


Fig. 7

