



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0037565

(51)⁷ A01N 37/44; A01N 37/42

(13) B

(21) 1-2018-05337

(22) 03/05/2017

(86) PCT/US2017/030726 03/05/2017

(87) WO 2017/192645 09/11/2017

(30) 62/330,999 03/05/2016 US

(45) 27/11/2023 428

(43) 25/02/2019 371A

(73) VALENT BIOSCIENCES LLC (US)

870 Technology Way, Libertyville, IL 60048, United States of America

(72) SILVERMAN, Franklin, Paul (US); SURPIN, Marci Ann (US); WOOLARD, Derek, D. (US).

(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) PHƯƠNG PHÁP CẢI THIỆN SỰ SINH TRƯỞNG VÀ TÍNH CHỊU BẤT LỢI Ở CÂY

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp cải thiện sự sinh trưởng của cây bằng cách cấp lượng hữu hiệu của axit (S)-absxisc và glyxin betain cho cây. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp cải thiện tính chịu bất lợi ở cây bằng cách cấp lượng hữu hiệu của axit (S)-absxisc và glyxin betain cho cây.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Nói chung, sáng chế đề cập đến phương pháp cải thiện sự sinh trưởng của cây và tính chịu bất lợi bao gồm bước phun lượng hữu hiệu của axit (*S*)-absxiscic và glyxin betain vào cây.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Người trồng cây luôn cố gắng trồng các cây có năng suất cao nhất có thể để tối đa hóa sản lượng. Các chất điều hòa sinh trưởng thực vật là một công cụ mà người trồng cây có thể sử dụng để tác động đến sự sinh trưởng cho các cây của họ dựa trên các hạn chế về nước và nhiệt độ. Tác dụng của chất điều hòa sinh trưởng thực vật đến cây trong các điều kiện khác nhau có thể thay đổi nhiều. Ngoài ra, khó dự đoán được tác dụng của việc phun đồng thời nhiều hơn một chất điều hòa sinh trưởng thực vật vào cây.

Axit (*S*)-absxiscic (“(*S*)-ABA”) là chất điều hòa sinh trưởng thực vật nội sinh của cây ngô với nhiều vai trò trong quá trình sinh trưởng và phát triển. Ví dụ, (*S*)-ABA ức chế sự nảy mầm của hạt, do đó đối kháng gibberelin, mà kích thích sự nảy mầm của hạt. (*S*)-ABA thúc đẩy tính chịu bất lợi và duy trì sự sinh trưởng trong các điều kiện bất lợi (xem Sharp RE et al., Root growth maintenance during water deficits: physiology to functional genomics, *J Exp Bot*, 2004 Nov, 55(407), 2343-2351). Thú vị là, một vài nghiên cứu đã chứng minh rằng việc duy trì các mức ABA ‘bình thường’ ở các cây chịu nước tốt là cần thiết để duy trì sự sinh trưởng chồi ở cà chua (Sharp RE et al., Endogenous ABA maintains shoot growth in tomato independently of effects on plant water balance: evidence for an interaction with ethylene, *J Exp Bot*, 2000 Sep, 51(350), 1575-1584) và *Arabidopsis* (LeNoble ME et al., Maintenance of shoot growth by endogenous ABA: genetic assessment of the involvement of ethylene

suppression, *J Exp Bot*, 2004 Jan, 55(395), 237-245). Ngoài ra, (*S*)-ABA có vai trò phát triển và duy trì trạng thái ngủ ở hạt và cây thân gỗ, mà khi thiếu ABA thường có biểu hiện hạt nảy mầm trước thu hoạch do không có sự kích thích trạng thái ngủ.

Ngoài ra, việc phun (*S*)-ABA cũng đã được chứng minh là tạo ra sự bảo vệ khỏi lạnh và hạn hán, cũng như gia tăng sắc đỏ cho nho tươi không hạt. Các ví dụ về chế phẩm (*S*)-ABA hữu hiệu có bán trên thị trường bao gồm ProTone™ và Contego™ (có sẵn từ Valent BioSciences LLC).

Glyxin betain (“GB”) là chất hòa tan tích lũy ở thực vật, vi sinh vật và nấm để đáp ứng với bất lợi phi sinh học. Trong số các cây trồng ngũ cốc chính, chỉ có cây lúa là không tích lũy GB một cách tự nhiên (Shirasawa K. et al., Accumulation of glycine betaine in rice plants that overexpress choline monooxygenase from spinach and evaluation of their tolerance to abiotic stress, *Ann Bot*, 2006 Sep, 98(3), 565-571). Việc biểu hiện quá mức các gen của vi khuẩn hoặc thực vật ở cây lúa để sản xuất GB dẫn đến mức tích lũy GB thấp, song tạo ra tính chịu bất lợi. Việc phun GB ngoại sinh vào cây đã được chứng minh là tạo ra tính chịu bất lợi phi sinh học (Chen and Murata, Glycine betaine: an effective protectant against abiotic stress in plants, *Trends Plant Sci*, 2008 Sep, 13(9), 499-505). Tính chịu bất lợi phi sinh học bao gồm tính chịu bất lợi làm kích thích tính chịu lạnh, đóng băng, và hạn hán qua nhiều loài cây. Tuy nhiên, mức độ bảo vệ khỏi bất lợi quan sát được, mặc dù đáng kể, nhưng không đạt tới ngưỡng chấp nhận được về mặt thương mại.

Do đó, cần có các phương pháp mới trong lĩnh vực này để cải thiện sự sinh trưởng của cây trong các điều kiện bất lợi phi sinh học.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến phương pháp cải thiện sự sinh trưởng của cây bao gồm bước phun lượng hữu hiệu của axit (*S*)-abscisic ((*S*)-

ABA) và glyxin betain (GB) cho cây, trong đó tỷ lệ trọng lượng của (S)-ABA:GB nằm trong khoảng từ khoảng 1:1 đến khoảng 1:33.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp cải thiện tính chịu bất lợi ở cây bao gồm bước phun lượng hữu hiệu của (S)-ABA và GB vào cây, trong đó tỷ lệ trọng lượng của (S)-ABA:GB nằm trong khoảng từ khoảng 1:1 đến khoảng 1:33.

Mô tả chi tiết sáng chế

Chủ đơn bắt ngờ phát hiện ra rằng hỗn hợp chứa axit (S)-abscisic (“(S)-ABA”) và glyxin betain (“GB”) cải thiện tính chịu bất lợi và sự sinh trưởng của cây trong các điều kiện bất lợi.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến phương pháp cải thiện sự sinh trưởng của cây bao gồm bước phun lượng hữu hiệu của (S)-ABA và GB vào cây.

Theo phương án được ưu tiên khác, cây mà trong đó sự sinh trưởng của cây được cải thiện chịu bất lợi phi sinh học.

Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp cải thiện tính chịu bất lợi ở cây bao gồm bước phun lượng hữu hiệu của (S)-ABA và GB vào cây.

Theo phương án được ưu tiên, tính chịu bất lợi được cải thiện là đối với bất lợi phi sinh học.

Theo một phương án được ưu tiên khác, (S)-ABA và GB được phun theo tỷ lệ trọng lượng nằm trong khoảng từ khoảng 1:1 đến khoảng 1:33.

Theo một phương án, cây là cây một lá mầm hoặc cây hai lá mầm. Theo phương án được ưu tiên, cây một lá mầm là cỏ, tốt hơn là cây ngô. Theo một phương án được ưu tiên khác, cây hai lá mầm là cây hai lá mầm dạng cỏ hoặc thân gỗ, tốt hơn là cây dừa chuột hoặc cây húng quế.

Theo một phương án khác, cây được cải biến di truyền. Theo phương án được ưu tiên, cây được cải biến di truyền biểu hiện tính kháng thuốc diệt cỏ, tính kháng côn trùng, tính chịu hạn hán hoặc chức năng sinh lý gia tăng.

Theo một phương án khác, cây chịu bất lợi lạnh. Như được sử dụng trong bản mô tả này, bất lợi lạnh dùng để chỉ các điều kiện nhiệt độ thấp hơn (ví dụ, từ 4 đến 10°C), trong đó sự sinh trưởng của cây bị trì hoãn đáng kể so với các điều kiện nhà kính hỗ trợ cho sự sinh trưởng và phát triển tối ưu.

Theo một phương án khác, cây chịu bất lợi hạn hán. Như được sử dụng trong bản mô tả này, bất lợi hạn hán dùng để chỉ các điều kiện tưới nước trong đó sự sinh trưởng của cây bị kìm hãm đáng kể so với các điều kiện trong đó sự có sẵn của nước là đủ để hỗ trợ cho sự sinh trưởng và phát triển tối ưu.

Theo phương án được ưu tiên, (S)-ABA và GB được phun trước khi gặp bất lợi phi sinh học. Như được sử dụng trong bản mô tả này, bất lợi phi sinh học dùng để chỉ nhiều kiểu bất lợi khác nhau bao gồm lạnh và/hoặc hạn hán. Trong trường hợp bất lợi lạnh, chế phẩm (S)-ABA và GB được phun trước khi gặp nhiệt độ lạnh, như là sự bảo vệ chống lại tác hại của giá lạnh. Khi bất lợi dự tính là hạn hán, thì việc phun (S)-ABA và GB trước khi gặp bất lợi hạn hán cho phép giữ nước trong đất. Bằng cách hạn chế việc sử dụng nước trong quá trình sinh trưởng của pha sinh dưỡng, có nhiều nước hơn để hỗ trợ quá trình sinh trưởng của pha sinh sản, khi năng suất giảm do bất lợi nước là cao hơn.

Theo phương án được ưu tiên, (S)-ABA và GB được phun trong giai đoạn pha sinh trưởng thực vật bắt đầu tại V2 và kết thúc tại VT. Chủ đơn đề cập đến các giai đoạn phát triển của ngô thông qua việc áp dụng dưới dạng các giai đoạn “V”. Các giai đoạn “V” được ký hiệu bằng số là V1, V2, V3, v.v.. Trong hệ thống nhận dạng này của V(n), (n) là số lượng các lá có các cổ nhìn thấy được. Mỗi giai đoạn lá được định nghĩa theo lá cao nhất mà cổ lá của nó nhìn thấy được (xem Corn Growth and Development, 2011. Abendroth, L, Elmore, R, Boyer, M and Marlay, S, Iowa State University Press). “VT” dùng để chỉ giai

đoạn sinh trưởng trở cờ và không phải giai đoạn sinh dưỡng sớm của cây ngô.

Theo một phương án khác, từ khoảng 1 đến khoảng 100 gam (S)-ABA cho mỗi hecta được phun vào cây ngô. Theo phương án được ưu tiên, từ khoảng 2 đến khoảng 75 gam (S)-ABA cho mỗi hecta được phun vào cây ngô.

Theo một phương án khác, từ khoảng 1 đến khoảng 100 gam (S)-ABA cho mỗi hecta được phun vào cây dưa chuột. Theo phương án được ưu tiên, từ khoảng 2 đến khoảng 75 gam (S)-ABA cho mỗi hecta được phun vào cây dưa chuột.

Theo một phương án khác, từ 1 đến 100 gam (S)-ABA cho mỗi hecta được phun vào cây húng quế. Theo phương án được ưu tiên, từ khoảng 2 đến khoảng 75 gam (S)-ABA cho mỗi hecta được phun vào cây húng quế.

Theo một phương án khác, từ khoảng 1 đến khoảng 1.000 gam GB cho mỗi hecta được phun vào cây. Theo phương án được ưu tiên hơn, từ khoảng 2 đến khoảng 800 gam GB cho mỗi hecta được phun vào cây.

Theo một phương án khác, việc phun GB làm tăng hoạt tính của (S)-ABA tạo ra tính chịu bất lợi được cải thiện và sự sinh trưởng của cây được cải thiện.

Theo một phương án khác, (S)-ABA và GB có thể được phun cùng với thuốc diệt cỏ như glyphosat, mesotrion, halosulfuron, saflufenaxil hoặc dicamba.

Theo một phương án khác, (S)-ABA và GB có thể được phun cùng với thuốc diệt nấm như tetraconazol, metconazol, strobilurin, hoặc sản phẩm kết hợp strobilurin-azol.

Theo một phương án khác, (S)-ABA và GB có thể được phun cùng với thuốc trừ sâu như metylparathion, bifenthrin, esfenvalerat, lorsban, carbaryl hoặc lanat.

Theo một phương án khác, (S)-ABA và GB có thể được phun cùng với

phân bón lá như CoRoN (có sẵn từ Helena Chemical), nito giải phóng có kiểm soát, hoặc BioForge (có sẵn từ Stoller USA), phần lớn là N,N'-diformyl ure, hoặc các thuốc phun chứa vi chất khác.

Hỗn hợp gồm (S)-ABA và GB có thể được phun bằng phương tiện thích hợp bất kỳ. Người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực liên quan đã biết đến các chế độ phun bao gồm chế độ phun cho lá như phun, phun mù, và chế độ phun cho hạt; chế độ phun cho đất bao gồm phun, xử lý theo luống, hoặc bón phân cạnh rễ.

Theo một phương án được ưu tiên khác, sáng chế đề cập đến chế phẩm chứa (S)-ABA và GB, trong đó tỷ lệ trọng lượng của (S)-ABA:GB nằm trong khoảng từ khoảng 1:1 đến khoảng 1:33.

Các dung dịch nước phun được sử dụng theo sáng chế thường chứa từ khoảng 0,01% đến khoảng 0,5% (thể tích/thể tích) chất hoạt động bề mặt không ion.

Chất hoạt động bề mặt bao gồm ít nhất một chất hoạt động bề mặt không ion. Nói chung, chất hoạt động bề mặt không ion có thể là chất hoạt động bề mặt không ion bất kỳ đã biết trong lĩnh vực liên quan. Nói chung, các chất hoạt động bề mặt không ion thích hợp là các oligome và polyme. Các polyme thích hợp bao gồm các copolyme ngẫu nhiên và copolyme khối của alkylenoxit như copolyme khối của etylen oxit-propylen oxit (copolyme khối của EO/PO), bao gồm cả copolyme khối của EO-PO-EO và PO-EO-PO; các copolyme ngẫu nhiên và copolyme khối của etylen oxit-butylen oxit, các sản phẩm cộng C2-6 alkyl của copolyme ngẫu nhiên và copolyme khối của etylen oxit-propylen oxit, các sản phẩm cộng C2-6 alkyl của copolyme ngẫu nhiên và copolyme khối của etylen oxit-butylen oxit, polyoxyetylen-polyoxypropylen monoalkylete, như metyl ete, etyl ete, propyl ete, butyl ete hoặc hỗn hợp của chúng; copolyme của vinylaxetat/vinylpyrolidon; copolyme của vinylpyrolidon được alkyl hóa; polyvinylpyrolidon; và polyalkylenglycol, bao gồm polypropylen glycol và

polyetylen glycol. Các chất không ion khác là lexitin; và các chất hoạt động bề mặt silicon (các chất hoạt động bề mặt tan trong nước hoặc phân tán có khung bao gồm mạch siloxan, ví dụ, Silwet L77®). Hỗn hợp thích hợp trong dầu khoáng là ATPLUS® 411.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, “lượng hữu hiệu” dùng để chỉ lượng (*S*)-ABA và/hoặc GB mà sẽ cải thiện sự sinh trưởng, tính chịu bất lợi hạn hán, tính chịu bất lợi lạnh, và/hoặc năng suất. “Lượng hữu hiệu” sẽ thay đổi phụ thuộc vào các nồng độ của (*S*)-ABA và GB, loài hoặc giống cây được xử lý, mức độ nghiêm trọng của bất lợi, kết quả mong muốn, và giai đoạn sống của cây, trong số các yếu tố khác. Do đó, không phải lúc nào cũng chỉ ra được “lượng hữu hiệu” chính xác. Tuy nhiên, “lượng hữu hiệu” thích hợp trong trường hợp cụ thể bất kỳ có thể được xác định bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực liên quan.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, “cải thiện” có nghĩa là cây có chất lượng cao hơn so với cây có thể có nếu nó không được xử lý bằng các phương pháp theo sáng chế.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, tất cả các trị số liên quan đến lượng, tỷ lệ phần trăm trọng lượng và đại lượng tương tự được định nghĩa là “khoảng” hoặc “xấp xỉ” mỗi trị số cụ thể, cụ thể là cộng hoặc trừ 10% ($\pm 10\%$). Ví dụ, cụm từ “ít nhất 5% theo trọng lượng” được hiểu là “ít nhất 4,5% đến 5,5% theo trọng lượng.” Do đó, các lượng nằm trong 10% trị số được yêu cầu bảo hộ là được bao hàm bởi phạm vi của yêu cầu bảo hộ.

Dạng số ít "một" bao gồm cả dạng số nhiều trừ khi ngữ cảnh sử dụng thể hiện rõ ràng theo cách khác.

Các phương án được bộc lộ chỉ là các phương án ví dụ về khái niệm sáng tạo được bộc lộ trong bản mô tả này và không được coi là làm giới hạn, trừ khi được chỉ rõ trong phần yêu cầu bảo hộ.

Các ví dụ sau được dùng để minh họa sáng chế và chỉ dẫn cho người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực liên quan về cách sử dụng chế phẩm theo sáng chế. Chúng không được hiểu là làm giới hạn sáng chế theo cách bất kỳ.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1

Để xác định khả năng glyxin betain (“GB”) tạo ra tính chịu nhiệt, cả một mình và kết hợp với axit (S)-abscisic (“(S)-ABA”), các thử nghiệm về tính chịu giá lạnh (tức là lạnh) được thực hiện bằng cách sử dụng cây húng quế giống lá rộng Ý (*Ocimum basilicum*). Hạt húng được khử trùng trong dung dịch etanol chứa 0,16% thuốc diệt nấm Maxim®XL (Maxim là nhãn hiệu đã đăng ký và có sẵn từ Syngenta Corporation). Các hạt đã khử trùng được nảy mầm trên môi trường ½ x Murashige và Skoog Basal Salt Media, có bổ sung 1x Vitamin Gamborg và 0,6% Phytagar, và phân vào các đĩa 24 lỗ. Các đĩa có hạt đã gieo được bịt kín bằng băng phẫu thuật và đặt vào buồng sinh trưởng có chu kỳ ngày đêm là 12 giờ có ánh sáng ở 24°C và 12 giờ tối ở 19°C. Các cây giống được nảy mầm và sinh trưởng trong năm ngày.

Sau năm ngày, các dung dịch đặc chứa GB và/hoặc (S)-ABA được bổ sung dưới dạng lớp phủ trong 0,4% Phytagar. Các đĩa được bịt lại và đặt trở lại buồng sinh trưởng trong 48 giờ. Sau 48 giờ, các đĩa được chuyển sang buồng có bố trí ánh sáng giống hệt nhau, song có nhiệt độ được đặt ở 6°C vào ban ngày và 2°C vào ban đêm. Các cây giống được tiếp xúc với bất lợi giá lạnh trong sáu ngày, sau thời gian đó chúng được chuyển trở lại buồng có nhiệt độ xung quanh, và được tính điểm sau khoảng thời gian phục hồi sáu ngày.

Các lỗ riêng rẽ chứa các lượng GB và/hoặc (S)-ABA được chỉ rõ. Các dung dịch gốc của (S)-ABA được điều chế trong dimethyl sulfoxit (“DMSO”), và nồng độ cuối của DMSO trong tất cả các lỗ là 0,5%. Các lỗ đối chứng dương tính chứa nồng độ cuối là 20 phần triệu (S)-ABA (~20 mg/l) và 0,5% DMSO; các lỗ đối chứng âm tính chứa 0,5% DMSO. GB được đánh giá riêng rẽ ở các

nồng độ 0, 3.000, 10.000, 30.000, và 100.000 miligam/lít (“mg/l”.) Để kiểm tra liệu có tương tác hiệp đồng giữa GB và (*S*)-ABA hay không, glyxin betain được bổ sung vào môi trường ở nồng độ 0, 1.000, 3.000, 10.000, và 30.000 mg/l, trong khi (*S*)-ABA được giữ ở nồng độ 3 mg/l. Sau sáu ngày bất lợi giá lạnh và sáu ngày phục hồi, các cây giống được tính điểm về lượng mô hoại tử và tổn thương, chỉ báo cơ bản của bất lợi giá lạnh ở cây húng quế giống. Kết quả được tóm tắt trong Bảng 1 dưới đây.

Bảng 1. GB và (*S*)-ABA bảo vệ chống lại tổn thương do giá lạnh ở cây húng quế giống

Chế phẩm	GB (mg/l)	0 mg/l (<i>S</i>)-ABA	3 mg/l (<i>S</i>)-ABA
1	0	—	+
2	1.000	NT	+
3	3.000	—	++
4	10.000	+	++
5	30.000	++	++
6	100.000	+	NT

“NT” biểu thị không có số liệu nào được ghi nhận

“—” biểu thị tổn thương do giá lạnh rộng

“+” biểu thị tổn thương do giá lạnh vừa phải

“++” biểu thị tổn thương do giá lạnh ít hoặc không có; tương đương với 20 phần triệu một mình (*S*)-ABA

Như được chứng minh, 30.000 mg/l GB có khả năng tạo ra mức bảo vệ tương đương với ~20 mg/l (*S*)-ABA cho cây húng quế giống. Tuy nhiên, khi GB và (*S*)-ABA được kết hợp chỉ cần khoảng 1/10 lượng GB và 1/6 lượng (*S*)-ABA để tạo ra mức bảo vệ tương đương so với khi dùng riêng. Mặc dù việc phân tích số liệu cho thấy rằng tác dụng cộng gộp của hỗn hợp GB và (*S*)-ABA có thể lớn hơn, các nghiên cứu tiếp theo đã được thực hiện để thử nghiệm các tương tác bên trong các thành phần này.

Ví dụ 2

Nghiên cứu phòng thí nghiệm được thực hiện tại Long Grove, Illinois.

Hạt dưa chuột (*Cucumis sativa* var. Straight Eight) được gieo trong đất chậu Pro-Mix® BX (Pro-Mix là nhãn hiệu đã đăng ký và có sẵn từ Premier Horticulture Ltd.) và các cây được trồng trong buồng sinh trưởng CONVIRON® ở 25°C theo chu kỳ sáng 16:8 (sáng:tối). Vào 15 ngày sau khi gieo, các cây được phun bằng máy phun sơn xách tay Preval®. Tất cả các dung dịch phun đều được điều chế trong nước đã loại ion và chất hoạt động bề mặt không ion được bổ sung vào tất cả các dung dịch phun ở 0,05% (thể tích/thể tích). Vào 48 giờ sau khi phun, các cây được chuyển đến buồng sinh trưởng CONVIRON® và được tiếp xúc với nhiệt độ 4°C trong 48 giờ theo chu kỳ sáng 12:12 (sáng:tối). Sau khi lấy ra khỏi buồng lạnh, các cây được chuyển trở lại buồng sinh trưởng CONVIRON® được đặt ở 25°C theo chu kỳ sáng 16:8 (sáng:tối). Các cây được tính điểm bằng mắt thường về tổn thương do giá lạnh ở 72 giờ sau khi tiếp xúc với giá lạnh. Mỗi mẫu xử lý được lặp lại bảy lần. Kết quả được tóm tắt trong Bảng 2 dưới đây.

Bảng 2. 72 giờ sau khi tiếp xúc với giá lạnh ở cây dưa chuột sau xử lý phun bằng (S)-ABA, GB, hoặc hỗn hợp của chúng

Xử lý	Tỷ lệ GB:ABA	% diện tích lá bị tổn thương	Hệ số hiệp đồng
Đối chứng	0	76,4	n/a
(S)-ABA 300 mg/l	0:1	52,9	n/a
GB 300 mg/l	1:0	84,3	n/a
GB 1.000 mg/l	1:0	82,1	n/a
GB 3.000 mg/l	1:0	46,4	n/a
GB 300 mg/l + (S)-ABA 300 mg/l	1:1	10,7	3,74
GB 1.000 mg/l + (S)-ABA 300 mg/l	3,3:1	25,0	2,68
GB 3.000 mg/l + (S)-ABA 300 mg/l	10:1	18,6	1,24

Như được chứng minh trong Bảng 2, các hỗn hợp theo sáng chế ở tỷ lệ GB:(S)-ABA nằm trong khoảng từ 1:1 đến 10:1 thể hiện nhiều hơn tác dụng cộng gộp trong việc ngăn ngừa tổn thương do bất lợi lạnh. Bằng cách sử dụng

công thức sau, các tác giả sáng chế có thể xác định được rằng đáp ứng với tỷ lệ GB:(S)-ABA là hiệp đồng, trong đó hệ số hiệp đồng được tính bằng phương pháp Abbott:

$$\%C_{\text{exp}} = A + B - (AB/100),$$

trong đó $\%C_{\text{exp}}$ là hiệu quả mong đợi và “trong đó A và B là các mức gia tăng sinh trưởng (hoặc chống bất lợi) được tạo ra bởi [chất điều hòa sinh trưởng thực vật] riêng. Nếu tỷ lệ giữa hiệu quả quan sát được bằng thực nghiệm của hỗn hợp C_{obs} và hiệu quả mong đợi của hỗn hợp lớn hơn 1, thì các tương tác hiệp đồng có mặt trong hỗn hợp” (Gisi, Synergistic Interaction of Fungicides in Mixtures, The American Phytopathological Society, 86:11, 1273-1279, 1996). Để chắc chắn, chủ đơn đã thiết đặt hệ số hiệp đồng tối thiểu là 1,1 trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế. Các tác giả sáng chế xác định được sự hiệp đồng có mặt ở các tỷ lệ GB:(S)-ABA sau: 1:1 (hệ số hiệp đồng 3,74); 3,3:1 (hệ số hiệp đồng 2,68) và 10:1 (hệ số hiệp đồng 1,24).

Ví dụ 3

Nghiên cứu phòng thí nghiệm được thực hiện tại Long Grove, Illinois. Hạt húng quế Ý được gieo trong đất chậu Pro-Mix® BX và cây được trồng ở nhiệt độ trong phòng dưới ánh sáng huỳnh quang trắng lạnh theo chu kỳ sáng 16:8 (sáng:tối). Ở 22 ngày sau khi gieo, các cây được phun bằng máy phun sơn xách tay Preval®. Ở 48 giờ sau khi phun, các cây được chuyển đến buồng sinh trưởng CONVIRON® và được tiếp xúc với nhiệt độ 4°C trong 72 giờ theo chu kỳ sáng 12:12 (sáng:tối). Sau khi lấy ra khỏi buồng lạnh, các cây được chuyển trở lại phòng thí nghiệm và đặt lại dưới đèn huỳnh quang trắng lạnh cho đến khi chúng được tính điểm bằng mắt thường về tổn thương do giá lạnh ở 24 giờ và 72 giờ sau khi tiếp xúc với giá lạnh. Mỗi mẫu xử lý được lặp lại bảy lần. Kết quả được tóm tắt trong Bảng 3 dưới đây.

Bảng 3. Tổn thương do giá lạnh của cây húng quế Ý sau khi xử lý phun bằng (S)-ABA, GB, hoặc hỗn hợp của chúng

Xử lý	Tỷ lệ GB:AB A	% diện tích lá bị tổn thương		Hệ số hiệp đồng	
		24 giờ sau khi tiếp xúc với giá lạnh	72 giờ sau khi tiếp xúc với giá lạnh	24 giờ	72 giờ
Đối chứng	0	63	73	n/a	n/a
(S)-ABA 300 mg/l	0:1	12	27	n/a	n/a
(S)-ABA 1.000 mg/l	0:1	6	14	n/a	n/a
GB 3.000 mg/l	1:0	67	79	n/a	n/a
GB 20.000 mg/l	1:0	45	65	n/a	n/a
GB 3.000 mg/l + (S)-ABA 300 mg/l	10:1	5	14	1,15	1,26
GB 20.000 mg/l + (S)-ABA 300 mg/l	66,7:1	39	60	0,44	0,32

Như được chứng minh trong Bảng 3, các hỗn hợp theo sáng chế ở tỷ lệ 10:1 của GB:(S)-ABA thể hiện nhiều hơn tác dụng cộng gộp trong việc ngăn ngừa tổn thương do bất lợi lạnh, trong khi tỷ lệ 66,7:1 không tạo ra tác dụng cộng gộp ngang bằng. Bằng cách sử dụng phương pháp Abbot được mô tả trong Ví dụ 2 ở trên, các tác giả sáng chế xác định rằng đáp ứng với tỷ lệ GB:(S)-ABA 10:1 là hiệp đồng (hệ số hiệp đồng 1,15 ở 24 giờ và 1,26 ở 72 giờ), song không hiệp đồng ở tỷ lệ GB:(S)-ABA 66,7:1 (hệ số hiệp đồng 0,44 ở 24 giờ và 0,32 ở 72 giờ).

Ví dụ 4

Nghiên cứu phòng thí nghiệm được thực hiện tại Long Grove, Illinois. Hạt húng quế Ý được gieo trong đất chậu Pro-Mix® BX và cây được trồng ở nhiệt độ trong phòng dưới ánh sáng huỳnh quang trắng lạnh theo chu kỳ sáng 16:8 (sáng:tối). Ở 22 ngày sau khi gieo, các cây được phun bằng máy phun sơn xách tay Preval®. Ở 48 giờ sau khi phun, các cây được chuyển đến buồng sinh

trường CONVIRON® và được tiếp xúc với nhiệt độ 4°C trong 72 giờ theo chu kỳ sáng 12:12 (sáng:tối). Sau khi lấy ra khỏi buồng lạnh, các cây được chuyển trở lại phòng thí nghiệm và lại đặt dưới đèn huỳnh quang trắng lạnh cho đến khi chúng được tính điểm bằng mắt thường về tổn thương do giá lạnh ở 24 giờ và 120 giờ sau khi tiếp xúc với giá lạnh. Mỗi mẫu xử lý được lặp lại bảy lần. Kết quả được tóm tắt trong Bảng 4 dưới đây.

Bảng 4. Tổn thương do giá lạnh của cây húng quế Ý sau khi xử lý phun bằng (S)-ABA, GB, hoặc hỗn hợp của chúng

Xử lý	Tỷ lệ GB:ABA	% diện tích lá bị tổn thương		Hệ số hiệp đồng	
		24 giờ sau khi tiếp xúc với giá lạnh	120 giờ sau khi tiếp xúc với giá lạnh	24 giờ	120 giờ
Đối chứng	0	46,67	65,00	N/A	N/A
(S)-ABA 300 mg/l	0:1	23,00	41,00	N/A	N/A
(S)-ABA 1.000 mg/l	0:1	11,67	21,67	N/A	N/A
GB 10.000 mg/l	1:0	39,17	56,67	N/A	N/A
GB 30.000 mg/l	1:0	40,00	50,00	N/A	N/A
GB 10.000 mg/l + (S)-ABA 300 mg/l	33:1	10,00	20,00	1,34	1,54
GB 30.000 mg/l + (S)-ABA 300 mg/l	100:1	31,67	47,50	0,56	0,52

Như được chứng minh trong Bảng 4, các hỗn hợp theo sáng chế ở tỷ lệ GB:(S)-ABA 33:1 thể hiện nhiều hơn tác dụng cộng gộp trong việc ngăn ngừa tổn thương do bất lợi lạnh, trong khi tỷ lệ 100:1 không tạo ra tác dụng cộng gộp ngang bằng. Bằng cách sử dụng phương pháp Abbot được mô tả trong Ví dụ 2 ở trên, các tác giả sáng chế xác định rằng đáp ứng với tỷ lệ GB:(S)-ABA 33:1 là hiệp đồng (hệ số hiệp đồng 1,34 ở 24 giờ và 1,54 ở 120 giờ), song không hiệp đồng ở tỷ lệ GB:(S)-ABA 100:1 (hệ số hiệp đồng 0,56 ở 24 giờ và 0,52 ở 120 giờ).

Ví dụ 5

Nghiên cứu nhà kính được thực hiện tại Long Grove, Illinois. Hạt của thứ cây lai thương mại được gieo trong chậu ba lít Pro-Mix® BX. Nhà kính được giữ ở $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$ theo chu kỳ sáng 16:8 giờ (sáng:tối), có chiếu sáng ở mức độ che $\sim 250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Ngô thường được tưới phân Peters 21-5-20 + các chất dinh dưỡng vi lượng, canxi amoni nitrat và magie sulfat. Tốc độ sinh trưởng thông thường đối với ngô trong các điều kiện này nằm trong khoảng từ 4 đến 5 xentimet/ngày.

Trong nghiên cứu này, các đợt cấp phun được thực hiện ở giai đoạn V4. Các đợt cấp này được thực hiện bằng máy phun rãnh có trang bị vòi phun 4001E Teejet® (Teejet là có sẵn từ và là nhãn đã đăng ký của Spraying Systems Co., Glendale Heights, IL, USA) và được cấp ở 40 pao/inơ vuông và ở 30 galông/mẫu Anh dung dịch phun. Sau khi cấp phun, cây được chuyển trở lại nhà kính.

Vào 3 và 4 ngày sau khi cấp phun, độ dẫn khí khổng của lá thực thứ 4 được đo bằng cách sử dụng dụng cụ đo quang hợp Licor Model 6400 XT (Licor, Lincoln, Nebraska) được sử dụng theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Để dễ phân tích, các giá trị độ dẫn khí khổng được biểu diễn dưới dạng phần trăm đối chứng trong Bảng 5 dưới đây.

Bảng 5. Độ dẫn khí khổng của ngô sau khi phun

Xử lý	Tỷ lệ GB:ABA	% độ dẫn đối chứng		Hệ số hiệp đồng	
		3 ngày	4 ngày	3 ngày	4 ngày
Ngày say khi phun	n/a	3 ngày	4 ngày	3 ngày	4 ngày
Đối chứng	n/a	100	100	n/a	n/a
ABA 100 mg/l	0:1	81,3	91,8	n/a	n/a
ABA 300 mg/l	0:1	73,6	88,7	n/a	n/a
ABA 1.000 mg/l	0:1	76,5	95,9	n/a	n/a
ABA 3.000 mg/l	0:1	55,3	77,5	n/a	n/a
GB 1.000 mg/l	0:1	86,2	97,9	n/a	n/a
GB 1.000 mg/l + ABA 100 mg/l	10:1	60,2	84,3	1,33	1,54
GB 1.000 mg/l + ABA 300 mg/l	3,3:1	53,1	71,5	1,28	2,17

GB 1.000 mg/l + ABA 1.000 mg/l	1:1	52,7	64,8	1,39	5,72
GB 1.000 mg/l + ABA 3.000 mg/l	0,33:1	47,3	74,5	1,01	1,05

Như được chứng minh trong Bảng 5, các hỗn hợp theo sáng chế ở các tỷ lệ 10:1, 3,3:1 và 1:1 của GB:(S)-ABA thể hiện nhiều hơn tác dụng cộng gộp trong việc làm giảm độ dẫn khí khổng, trong khi tỷ lệ 0,33:1 không tạo ra mức giảm cộng gộp ngang bằng. Bằng cách sử dụng phương pháp Abbot được mô tả trong Ví dụ 2 ở trên, chủ đơn đã xác định được sự hiệp đồng có mặt ở các tỷ lệ sau đây của GB:(S)-ABA: 10:1 (hệ số hiệp đồng 1,33 ở 3 ngày sau khi phun (“DPS”) và 1,54 ở 4 DPS); 3,3:1 (hệ số hiệp đồng 1,28 ở 3 DPS và 2,17 ở 4 DPS); và 1:1 (hệ số hiệp đồng 1,39 ở 3 DPS và 5,72 ở 4 DPS), song không có hiệp đồng ở tỷ lệ 0,33:1 (hệ số hiệp đồng 1,01 ở 3 DPS và 1,05 ở 4 DPS). Do đó, tỷ lệ GB:(S)-ABA ít nhất 1:1 là cần có để hỗn hợp có tính hiệp đồng trong việc làm giảm độ dẫn khí khổng.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp cải thiện sự sinh trưởng của cây bao gồm bước phun lượng hữu hiệu của axit (S)-abscisic ((S)-ABA) và glyxin betain (GB) vào cây, trong đó tỷ lệ trọng lượng của (S)-ABA:GB nằm trong khoảng từ khoảng 1:1 đến khoảng 1:33.
2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó cây chịu bất lợi phi sinh học.
3. Phương pháp theo điểm 2, trong đó bất lợi phi sinh học là bất lợi lạnh.
4. Phương pháp theo điểm 2, trong đó bất lợi phi sinh học xuất hiện trước khi phun (S)-ABA và GB.
5. Phương pháp theo điểm 2, trong đó bất lợi phi sinh học xuất hiện sau khi phun (S)-ABA và GB.
6. Phương pháp theo điểm 1, trong đó cây là cây một lá mầm.
7. Phương pháp theo điểm 6, trong đó cây một lá mầm là cây ngô.
8. Phương pháp theo điểm 1, trong đó cây là cây hai lá mầm.
9. Phương pháp theo điểm 8, trong đó cây hai lá mầm được chọn từ nhóm bao gồm cây dưa chuột và cây húng quế.
10. Phương pháp theo điểm 1, trong đó (S)-ABA được phun ở tỷ lệ nằm trong khoảng từ khoảng 1 đến khoảng 100 gam/hecta và GB được phun ở tỷ lệ nằm trong khoảng từ khoảng 1 đến khoảng 1.000 gam/hecta.
11. Phương pháp cải thiện tính chịu bất lợi ở cây bao gồm bước phun lượng hữu hiệu của axit (S)-abscisic ((S)-ABA) và glyxin betain (GB) vào cây, trong đó tỷ lệ trọng lượng của (S)-ABA:GB nằm trong khoảng từ khoảng 1:1 đến khoảng 1:33.
12. Phương pháp theo điểm 11, trong đó bất lợi là bất lợi phi sinh học.

13. Phương pháp theo điểm 12, trong đó bất lợi phi sinh học là bất lợi lạnh.
14. Phương pháp theo điểm 11, trong đó bất lợi xuất hiện trước khi phun (S)-ABA và GB.
15. Phương pháp theo điểm 11, trong đó bất lợi xuất hiện sau khi phun (S)-ABA và GB.
16. Phương pháp theo điểm 11, trong đó cây là cây một lá mầm.
17. Phương pháp theo điểm 16, trong đó cây một lá mầm là cây ngô.
18. Phương pháp theo điểm 11, trong đó cây là cây hai lá mầm.
19. Phương pháp theo điểm 18, trong đó cây hai lá mầm được chọn từ nhóm bao gồm cây dưa chuột và cây húng quế.
20. Chế phẩm chứa axit (S)-abscisic ((S)-ABA) và glyxin betain (GB), trong đó tỷ lệ trọng lượng của (S)-ABA:GB nằm trong khoảng từ khoảng 1:1 đến khoảng 1:33.