



(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)



1-0038816

(51)^{2020.01} A01N 63/27; A01N 57/20; C12N 1/20; (13) B
A01P 3/00; C12N 1/00; A01N 25/00

-
- (21) 1-2016-03188 (22) 29/01/2015
(86) PCT/US2015/013564 29/01/2015 (87) WO 2015/116838 06/08/2015
(30) 61/933,954 31/01/2014 US; 62/104,122 16/01/2015 US
(45) 26/02/2024 431 (43) 27/02/2017 347A
(73) AGBIOME, INC. (US)
104 T.W. Alexander Drive, Building 1, Research Triangle Park, North Carolina
27709, United States of America
(72) JONES, Janice C. (US); KOZIEL, Michael G. (US); UKNES, Scott Joseph (US);
SHEKITA, Amy Elizabeth (US); Philip E. HAMMER (US).
(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)
-

(54) HỢP PHẦN VÀ CHẾ PHẨM CHỨA CHỦNG SINH VẬT CÓ SỐ NỘP LƯU LÀ
NRRL NO. B-50897 HOẶC CHỦNG LIÊN QUAN, HẠT ĐƯỢC PHỦ CHỨA HẠT
VÀ LỚP PHỦ TRÊN HẠT, VÀ PHƯƠNG PHÁP KIỂM SOÁT NGUỒN GÂY
BỆNH CHO THỰC VẬT

(57) Sáng chế đề cập đến hợp phần và chế phẩm chứa chủng sinh vật có số nộp lưu là NRRL No. B-50897 hoặc chủng liên quan có cùng đặc điểm nhận diện như chủng nhảy ban đầu có số nộp lưu là NRRL No. B-50897 trừ khi chúng dung chịu tốt hơn đáng kể với thuốc diệt cỏ, thuốc diệt nấm, thuốc trừ loài gây hại cụ thể, hoặc hóa chất bảo vệ thực vật khác. Sáng chế cũng đề cập đến hợp phần chứa chủng sinh vật có số nộp lưu là NRRL No. B-50897 hoặc chủng liên quan và thuốc diệt nấm, thuốc diệt cỏ, thuốc trừ loài gây hại hóa học, hoặc hóa chất bảo vệ thực vật khác, bao gồm ví dụ, prothioconazol hoặc azoxystrobin. Sáng chế đề cập đến hạt được bọc bằng chủng sinh vật có số nộp lưu là NRRL No. B-50897 hoặc chủng liên quan. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp kiểm soát mầm bệnh thực vật bao gồm bước đưa lên cây trồng, hạt, hoặc vùng canh tác lượng hữu hiệu của các hợp phần theo sáng chế.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến tác nhân và quần thể kiểm soát sinh học được cải biến mang những đặc tính đã cải tiến.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các loại bệnh và vật gây hại trên cây cần được kiểm soát để đảm bảo chất lượng lẫn số lượng thực phẩm cho con người, thức ăn cho súc vật và xơ sợi được sản xuất bởi cây trồng trên khắp thế giới. Các bệnh trên cây phần lớn là do nấm, vi khuẩn, virus và giun đất. Các vật gây hại cho cây bao gồm các côn trùng nhai, hút và chích từ các bộ cánh vảy (Lepidoptera), bộ cánh cứng (Coleoptera), bộ cánh nửa (Hemiptera) và các bộ khác. Các thuốc diệt vật gây hại hóa học đã được sử dụng rộng rãi trong trồng trọt để bảo vệ cây trồng khỏi những vật gây hại và bệnh trên cây đó. Các sản phẩm hóa học này kháng với các vật gây hại cho cây, bệnh trên cây và cỏ dại, dẫn tới tăng sản lượng trồng trọt. Nếu thiếu hoạt động bảo vệ cây trồng và kiểm soát vật gây hại thì việc sản xuất thực phẩm và chất lượng của thực phẩm được sản xuất ra sẽ bị giảm sút. Tuy nhiên, việc sử dụng thuốc diệt vật gây hại hóa học lại tiềm ẩn mối nguy hiểm bởi nhiều loại thuốc mang các đặc tính có thể gây hại cho sức khỏe và môi trường nếu không được sử dụng hợp lý.

Một vấn đề do sử dụng liên tục các loại thuốc diệt vật gây hại, thuốc diệt cỏ hoặc hóa chất bảo vệ cây trồng khác là sự gia tăng tính kháng với tác nhân kiểm soát. Tính kháng thuốc diệt vật gây hại là tính nhạy cảm đã bị suy yếu của một quần thể vật gây hại với một tác nhân kiểm soát ở một liều lượng đã từng tiêu diệt gần như toàn bộ các cá thể của loài đó. Do vậy, vẫn cần có những sản phẩm mới với những cách tác động khác nhằm hỗ trợ quản lý vấn đề kháng thuốc.

Từ lâu đã biết rằng các vi sinh vật biến đổi trong quá trình phát sinh chủng loại có thể hoạt động như vật đối kháng tự nhiên của các nguồn gây bệnh và vật gây hại trên cây khác nhau. Sự tương tác giữa cây chủ và vi sinh vật dẫn tới hiện tượng kiểm soát

sinh học bao gồm kháng sinh, cạnh tranh, cảm ứng tính kháng của cây chủ và quan hệ vật ăn thịt. Việc sàng lọc và thử nghiệm các mẫu được phân lập đã thu được nhiều loài vi sinh vật có tiềm năng thương mại hóa. Các thuốc diệt vật gây hại sinh học từ vi khuẩn là một chọn lọc quan trọng trong việc kiểm soát các bệnh và vật gây hại trên thực vật. Hiện nay vẫn có nhu cầu sử dụng các tác nhân kiểm soát sinh học có khả năng cạnh tranh trong điều kiện ngoài trời, đặc biệt với sự có mặt của thuốc diệt cỏ và thuốc diệt nấm đang được sử dụng rộng rãi trong canh tác thương mại và có hiệu quả kháng sinh trên vi sinh vật.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Các chế phẩm và phương pháp nhằm tăng cường khả năng của một quần thể tác nhân sinh học hoặc tác nhân kiểm soát sinh học nhằm cạnh tranh và sống sót được ngoài thiên nhiên đã được đưa ra. Bằng việc cải tiến quần thể tác nhân sinh học này, quần thể tác nhân đã được cải biến có thể sinh trưởng, cạnh tranh với các chủng vi khuẩn khác và nấm, đồng thời bảo vệ cây khỏi các nguồn gây bệnh. Thêm vào đó, các tác nhân kiểm soát sinh học được cải biến sẽ thúc đẩy sự sinh trưởng và sản lượng của cây trồng. Cụ thể là, các tác nhân sinh học được cải biến và các quần thể được cải biến của những tác nhân đó, có khả năng kháng hoặc dung nhận thuốc diệt sinh vật, thuốc diệt cỏ, thuốc diệt nấm, thuốc diệt vật gây hại hoặc hóa chất bảo vệ cây trồng khác, đã được chọn lọc hoặc tạo ra bằng kỹ thuật gen. Theo cách này, việc bảo vệ mùa màng khỏi các tác nhân gây bệnh hoặc vật gây hại sẽ được tăng cường.

Các tác nhân sinh học được cải biến có thể sinh trưởng khi có mặt ít nhất là một loại thuốc diệt cỏ, diệt nấm, diệt vật gây hại hoặc hóa chất bảo vệ cây trồng khác đã được sử dụng trong canh tác thương mại. Các tác nhân sinh học được cải biến như vậy có thể sinh trưởng và sinh sản trong đất trồng đã có thuốc diệt cỏ, diệt nấm, diệt vật gây hại hoặc hóa chất bảo vệ cây trồng khác. Các tác nhân sinh học được cải biến này đem lại cho đất đai khả năng tiêu diệt hoặc kháng các nguồn gây bệnh hoặc vật gây hại. Các quần thể tác nhân sinh học được cải biến như vậy có thể đưa vào đất trồng nhằm ngăn ngừa các nguồn gây bệnh do nấm và các bệnh do chúng gây ra, hoặc chặn nguồn thức ăn của côn trùng gây hại hoặc giun đất, thúc đẩy sự sinh trưởng của cây trồng và tăng sản lượng mùa màng. Do vậy, chế phẩm theo sáng chế là hữu ích trong việc tăng cường tính cạnh tranh của các tác nhân sinh học được cải biến, đặc biệt so với các tác nhân từ

vi khuẩn khác mà không có khả năng kháng thuốc diệt cỏ, thuốc diệt nấm, thuốc diệt vật gây hại hoặc các hóa chất bảo vệ cây trồng khác. Các chế phẩm theo sáng chế bao gồm các tác nhân sinh học được chọn lọc hoặc tạo ra bằng kỹ thuật gen và những quần thể tác nhân kiểm soát sinh học được cải biến. Các tác nhân sinh học được cải biến này có thể được sử dụng như một chất để chủng hoặc chế phẩm phủ cho cây trồng và hạt. Chúng cũng có thể được dùng ở dạng phun trực tiếp lên các phần ngoài không khí của cây và có thể trộn với thuốc diệt cỏ hoặc hóa chất khác mà chúng đã được cải biến để trở nên dung nhận. Như đã nêu, sự có mặt của các tác nhân sinh học được cải biến trong điều kiện tự nhiên làm tăng cường tính kháng của cây trồng với các nguồn gây bệnh và thúc đẩy sự sinh trưởng của cây trồng. Các tác nhân sinh học được cải biến trong sáng chế có thể được dùng với các tác nhân khác nhằm thúc đẩy sự sinh trưởng và sản lượng cây trồng.

Các phương án của sáng chế bao gồm:

1. Phương pháp cải tiến tác nhân kiểm soát sinh học, phương pháp này bao gồm bước cải biến tác nhân kiểm soát sinh học để tác nhân đó có khả năng kháng ít nhất một loại thuốc diệt cỏ, thuốc diệt nấm, thuốc diệt vật gây hại hoặc hóa chất bảo vệ cây trồng khác.

2. Phương pháp theo phương án 1, trong đó tác nhân kiểm soát sinh học nói trên được cải biến bằng cách cho sinh trưởng trong điều kiện có thuốc diệt cỏ, thuốc diệt nấm, thuốc diệt vật gây hại hoặc hóa chất bảo vệ cây trồng khác để chọn lọc ra một chủng mang tính kháng.

3. Phương pháp theo phương án 1, trong đó tác nhân kiểm soát sinh học này được cải biến bằng cách biến nạp tác nhân kiểm soát sinh học này với gen đem lại tính kháng các loại thuốc diệt cỏ, thuốc diệt nấm, thuốc diệt vật gây hại hoặc hóa chất bảo vệ cây trồng khác.

4. Phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 3, trong đó tác nhân kiểm soát sinh học này là tác nhân kiểm soát sinh học thuộc nhóm vi khuẩn.

5. Phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 3, trong đó tác nhân kiểm soát sinh học nói trên được chọn từ nhóm bao gồm giống *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Agrobacterium*, *Lysobacter*, *Trichoderma*, *Paecilomyces*, *Gliocladium*, *Ampelomyces*, *Pythium*, *Metschnikowia*, *Chromobacterium*, *Penicillium*,

Coniothyrium, Chaetomium, Myrothecium, Aureobasidium, Pantoea, Burkholderia, Streptomyces, Variovorax, Pasteuria, Lactobacillus, Paenibacillus và Xanthomonas.

6. Phương pháp theo phương án 5, trong đó tác nhân kiểm soát sinh học này là vi khuẩn *Pseudomonas*.

7. Phương pháp theo phương án 6, trong đó *Pseudomonas* này là *Pseudomonas fluorescens* hoặc *Pseudomonas chlororaphis*.

8. Phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 7, trong đó các thuốc diệt cỏ này được chọn từ nhóm bao gồm thuốc diệt cỏ glyphosat, glufosinat (chất ức chế tổng hợp glutamin), sulfonyleure và imidazolinon (các chất ức chế tổng hợp axit amin mạch nhánh).

9. Tác nhân kiểm soát sinh học được cải biến trong đó tác nhân kiểm soát sinh học này đã được chọn lọc dưới tác động của thuốc diệt cỏ, thuốc diệt nấm, thuốc diệt vật gây hại hoặc hóa chất bảo vệ cây trồng khác và có khả năng kháng thuốc diệt cỏ, thuốc diệt nấm, thuốc diệt vật gây hại hoặc hóa chất bảo vệ cây trồng khác nói trên.

10. Tác nhân kiểm soát sinh học được cải biến theo phương án 9, trong đó tác nhân kiểm soát sinh học được cải biến này là tác nhân kiểm soát sinh học thuộc nhóm vi khuẩn.

11. Tác nhân kiểm soát sinh học được cải biến theo phương án 9, trong đó tác nhân kiểm soát sinh học này được chọn từ nhóm bao gồm các giống *Pseudomonas, Bacillus, Agrobacterium, Lysobacter, Trichoderma, Paecilomyces, Gliocladium, Ampelomyces, Pythium, Metschnikowia, Chromobacterium, Penicillium, Coniothyrium, Chaetomium, Myrothecium, Aureobasidium, Pantoea, Burkholderia, Streptomyces, Variovorax, Pasteuria, và Xanthomonas*.

12. Tác nhân kiểm soát sinh học được cải biến theo phương án 10, trong đó tác nhân kiểm soát sinh học thuộc nhóm vi khuẩn này là vi khuẩn *Pseudomonas*.

13. Tác nhân kiểm soát sinh học được cải biến theo phương án 12, trong đó *Pseudomonas* là *Pseudomonas fluorescens* hoặc *Pseudomonas chlororaphis*.

14. Tác nhân kiểm soát sinh học được cải biến theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 9 đến 13, trong đó các thuốc diệt cỏ này được chọn lọc từ nhóm bao gồm thuốc diệt cỏ glyphosat, glufosinat (chất ức chế tổng hợp glutamin), sulfonyleure và imidazolinon (các chất ức chế tổng hợp axit amin mạch nhánh).

15. Tác nhân kiểm soát sinh học tái tổ hợp trong đó tác nhân kiểm soát sinh học

này đã được biến nạp với một gen có khả năng kháng thuốc diệt cỏ nhằm đem lại khả năng kháng thuốc diệt cỏ cho tác nhân kiểm soát sinh học đó.

16. Tác nhân kiểm soát sinh học tái tổ hợp theophương án 15, trong đó tác nhân kiểm soát sinh học được cải biến này là tác nhân kiểm soát sinh học thuộc nhóm vi khuẩn.

17. Tác nhân kiểm soát sinh học tái tổ hợp theophương án 16, trong đó tác nhân kiểm soát sinh học thuộc nhóm vi khuẩn này được chọn từ nhóm bao gồm các giống *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Agrobacterium*, *Lysobacter*, *Gliocladium*, *Pythium*, *Chromobacterium*, *Penicillium*, *Pantoea*, *Burkholderia*, *Streptomyces*, *Variovorax*, *Pasteuria*, và *Xanthomonas*.

18. Tác nhân kiểm soát sinh học tái tổ hợp theo phương án 17, trong đó tác nhân kiểm soát sinh học thuộc nhóm vi khuẩn là vi khuẩn *Pseudomonas*.

19. Tác nhân kiểm soát sinh học tái tổ hợp theo phương án 18, trong đó *Pseudomonas* này là *Pseudomonas fluorescens* hoặc *Pseudomonas chlororaphis*.

20. Tác nhân kiểm soát sinh học tái tổ hợp theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 15 đến 19, trong đó thuốc diệt cỏ này được chọn từ nhóm bao gồm thuốc diệt cỏ glyphosat, glufosinat (chất ức chế tổng hợp glutamin), sulfonylure và imidazolinon (các chất ức chế tổng hợp axit amin mạch nhánh).

21. Quần thể các tác nhân kiểm soát sinh học được cải biến trong đó quần thể này về căn bản bao gồm tác nhân kiểm soát sinh học theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 20.

22. Chế phẩm kiểm soát nguồn gây bệnh cho thực vật, chế phẩm này bao gồm quần thể các tác nhân kiểm soát sinh học được cải biến, trong đó các tác nhân kiểm soát sinh học này có khả năng kháng thuốc diệt cỏ và vật mang phù hợp.

23. Chế phẩm theo phương án 22, trong đó quần thể này bao gồm các tác nhân kiểm soát sinh học được cải biến thuộc nhóm vi khuẩn.

24. Chế phẩm theo phương án 22, trong đó quần thể này bao gồm các tác nhân kiểm soát sinh học tái tổ hợp.

25. Chế phẩm theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 22 đến 24, trong đó tác nhân kiểm soát sinh học này có mặt với lượng hữu hiệu đủ để tăng cường sức khỏe, sự sinh trưởng hoặc sản lượng cây trồng khi đã có tỉ lệ thuốc diệt sinh vật trên vùng trồng cây nông nghiệp.

26. Chế phẩm theo phương án 25, trong đó tác nhân kiểm soát sinh học bao gồm

chúng được nộp lưu mang mã số NRRL No. B-50897 và thuốc diệt sinh vật là glyphosat.

27. Chế phẩm theo phương án 25, trong đó tác nhân kiểm soát sinh học bao gồm chủng AIP050999 được nộp lưu mang mã số NRRL No. B-50999 và thuốc diệt sinh vật là glufosinat.

28. Phương pháp cải thiện khả năng cạnh tranh của tác nhân kiểm soát sinh học trong môi trường tự nhiên, phương pháp này bao gồm bước cải biến tác nhân sinh học đến mức tác nhân kiểm soát sinh học được cải biến này có thể sinh trưởng trong điều kiện có thuốc diệt cỏ.

29. Phương pháp thúc đẩy sinh trưởng của cây trồng, phương pháp này bao gồm bước cấp hợp phần chứa quần thể tác nhân kiểm soát sinh học được cải biến vào đất trồng có cây đang sinh trưởng.

30. Phương pháp theo phương án 29, trong đó các tác nhân kiểm soát sinh học này được cải biến để có khả năng kháng glyphosat hoặc glufosinat.

31. Phương pháp trồng cây bao gồm bước sử dụng cho cây trồng, hạt hoặc khu vực canh tác hỗn hợp chứa thuốc diệt sinh vật với lượng hữu hiệu và tác nhân kiểm soát sinh học được cải biến với lượng hữu hiệu trong đó

(a) lượng hữu hiệu của thuốc diệt sinh vật là liều lượng để kiểm soát một cách chọn lọc một sinh vật mong muốn mà không gây tổn hại đáng kể cho cây trồng; và,

(b) lượng hữu hiệu của tác nhân kiểm soát sinh học được cải biến là lượng vừa đủ để dẫn đến sự gia tăng đáng kể về mặt thống kê đối với sức khỏe cây trồng, sản lượng và/hoặc sự sinh trưởng so với sức khỏe, sản lượng và/hoặc sự sinh trưởng của cây ghi nhận được khi nồng độ tương tự của tác nhân kiểm soát sinh học không được cải biến được sử dụng trong tổ hợp với lượng hữu hiệu của thuốc diệt sinh vật.

32. Phương pháp theo phương án 31, trong đó tác nhân kiểm soát sinh học được cải biến và thuốc diệt sinh vật được dùng đồng thời.

33. Phương pháp theo phương án 32, trong đó tác nhân kiểm soát sinh học được cải biến và thuốc diệt sinh vật được dùng lần lượt.

34. Phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 31 đến 33, trong đó tác nhân kiểm soát sinh học nói trên bao gồm chủng nộp lưu mang mã số NRRL No. B-50897.

35. Phương pháp theo phương án 34, trong đó thuốc diệt sinh vật là glyphosat, và trong đó một lượng hữu hiệu của glyphosat là lượng kiểm soát cỏ dại một cách chọn lọc

mà không gây tổn hại đáng kể đến cây trồng.

36. Phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 31 đến 33, trong đó tác nhân kiểm soát sinh học là chủng AIP050999 được nộp lưu mang mã số NRRL No. B-50999 và thuốc diệt sinh vật là glufosinat.

37. Phương pháp theo phương án 36, trong đó thuốc diệt sinh vật là glufosinat, và trong đó lượng hữu hiệu của glufosinat là lượng kiểm soát cỏ dại một cách chọn lọc mà không gây tổn hại đáng kể đến cây trồng.

38. Quần thể tác nhân kiểm soát sinh học được nuôi cấy trong đó quần thể được nuôi cấy này được tạo ra bằng cách cho một quần thể các tác nhân sinh trưởng trong điều kiện có thuốc diệt cỏ, thuốc diệt nấm, thuốc diệt vật gây hại hoặc các hóa chất bảo vệ cây trồng khác để chọn lọc một giống cây thuần chủng của tác nhân kiểm soát sinh học có khả năng kháng thuốc diệt cỏ, thuốc diệt nấm, thuốc diệt vật gây hại hoặc hóa chất bảo vệ cây trồng khác.

39. Quần thể tác nhân kiểm soát sinh học được nuôi cấy theo phương án 38, trong đó tác nhân kiểm soát sinh học này được dùng với lượng hữu hiệu đủ để tăng cường sức khỏe, sinh trưởng hoặc sản lượng cây trồng khi đã có một tỉ lệ thuốc diệt sinh vật trên vùng trồng cây nông nghiệp.

40. Giống cây tác nhân kiểm soát sinh học thuần chủng về mặt sinh học đã được phân lập trong đó tác nhân kiểm soát sinh học này có khả năng kháng thuốc diệt sinh vật được chọn từ thuốc diệt cỏ, thuốc diệt nấm, thuốc diệt vật gây hại hoặc hóa chất bảo vệ cây trồng khác trong đó giống cây này được tạo ra bằng cách sinh trưởng trong điều kiện có mặt thuốc diệt sinh vật đó.

41. Giống cây tác nhân kiểm soát sinh học thuần chủng về mặt sinh học phân lập được theo phương án 40, trong đó tác nhân kiểm soát sinh học này được sử dụng với lượng hữu hiệu đủ để tăng cường sức khỏe, sinh trưởng hoặc sản lượng cây trồng khi đã có một tỉ lệ thuốc diệt sinh vật trên vùng trồng cây nông nghiệp.

42. Phương pháp theo phương án 38, trong đó chế phẩm bao gồm vật mang phù hợp.

43. Giống cây vi khuẩn phát triển từ chủng được nộp lưu mang mã số NRRL No. B-50897, trong đó giống cây vi khuẩn này có hoạt tính kháng nấm và có thể sinh trưởng trong điều kiện có glyphosat.

44. Giống cây vi khuẩn theo điểm 43, trong đó chủng nộ lưu mang mã số NRRL No. B-50897 được sử dụng với lượng hữu hiệu đủ để tăng cường sức khỏe, sinh trưởng hoặc sản lượng cây trồng khi đã có một tỉ lệ glyphosat trên vùng trồng cây nông nghiệp.

45. Giống cây vi khuẩn phát triển từ chủng AIP050999 được nộ lưu mang mã số NRRL No. B-50999, trong đó giống cây vi khuẩn này có hoạt tính kháng nấm và có khả năng sinh trưởng trong điều kiện có glufosinat.

46. Giống cây vi khuẩn theo điểm 45, trong đó chủng AIP050999 nộ lưu mang mã số NRRL No. B-50999 được sử dụng với lượng hữu hiệu đủ để tăng cường sức khỏe, sinh trưởng hoặc sản lượng cây trồng khi đã có một tỉ lệ glufosinat trên vùng trồng cây nông nghiệp.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1: thể hiện đường cong sinh trưởng của các chủng khác nhau trong điều kiện có glyphosat.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến chế phẩm và phương pháp nhằm cải tiến tác nhân kiểm soát sinh học. Thuật ngữ tác nhân sinh học hoặc tác nhân kiểm soát sinh học theo các mục đích của sáng chế được sử dụng để mô tả vi sinh vật dùng để kiểm soát nguồn gây bệnh hoặc vật gây hại cây trồng. Các tác nhân kiểm soát sinh học theo sáng chế được cải biến đến mức chúng có thể sinh trưởng trong điều kiện có ít nhất một loại thuốc diệt sinh vật. Thuốc diệt sinh vật là chất hóa học có thể mang lại tác dụng kiểm soát trên sinh vật bằng con đường hóa học hoặc sinh học. Thuốc diệt sinh vật bao gồm thuốc diệt vật gây hại, như thuốc diệt nấm, thuốc diệt cỏ, thuốc diệt côn trùng hoặc các loại thuốc hóa học bảo vệ mùa màng khác, và các loại tương tự. Các chế phẩm theo sáng chế bao gồm một hoặc nhiều tác nhân kiểm soát sinh học được phân lập mà đã được chọn lọc về tính kháng với thuốc diệt sinh vật như thuốc diệt cỏ, thuốc diệt nấm, thuốc diệt vật gây hại, hoặc các hóa chất bảo vệ cây trồng khác; tác nhân kiểm soát sinh học tái tổ hợp đã được chuyển gen để có được gen kháng thuốc diệt cỏ, thuốc diệt nấm, thuốc diệt vật gây hại, hoặc các hóa chất bảo vệ cây trồng khác; quần thể tác nhân kiểm soát sinh học được cải biến trong đó quần thể này có khả năng kháng ít nhất một loại thuốc diệt cỏ, thuốc diệt nấm, thuốc diệt vật gây hại, hoặc các hóa chất bảo vệ cây trồng khác; và các chế phẩm bao gồm các quần thể tác nhân kiểm soát sinh học được cải biến này. Quần thể được cải biến có thể

bao gồm các vi sinh vật được chọn lọc về tính kháng với thuốc diệt cỏ, thuốc diệt nấm, thuốc diệt vật gây hại, hoặc các hóa chất bảo vệ cây trồng khác, hoặc đã được chuyển vào gen quy định tính kháng hoặc dung nhận loại thuốc diệt cỏ, thuốc diệt nấm, thuốc diệt vật gây hại, hoặc các hóa chất bảo vệ cây trồng khác. Do đó, sáng chế bao gồm các giống cây hầu như thuần chủng, hoặc các giống cây thuần chủng về mặt sinh học, của các tác nhân kiểm soát sinh học hoặc tác nhân sinh học được cải biến. Một “giống cây vi khuẩn thuần chủng về mặt sinh học” là một giống cây của một loài vi khuẩn mà không có bất kỳ một loài vi khuẩn nào khác trong số lượng được phát hiện bởi các kỹ thuật vi khuẩn học thông thường. Nói một cách khác, đó là giống cây mà trong đó tất cả tế bào vi khuẩn nhìn thấy được đều thuộc chủng được chọn lọc. Tác nhân kiểm soát sinh học được cải biến gồm các tác nhân kiểm soát sinh học đã có được một đặc điểm do áp lực chọn lọc và các tác nhân kiểm soát sinh học tái tổ hợp đã được biến nạp bằng gen quy định tính kháng hoặc dung nhận với ít nhất một loại thuốc diệt cỏ, thuốc diệt nấm, thuốc diệt vật gây hại, hoặc các hóa chất bảo vệ cây trồng khác.

Sáng chế còn bao gồm một tác nhân kiểm soát sinh học được cải biến cụ thể. Tác nhân này bao gồm AIP1620. AIP1620 là một chủng *Pseudomonas* được chọn lọc vì khả năng dung nhận glyphosat. Tác nhân bổ sung là AIP050999. AIP050999 là một chủng *Pseudomonas* đã được chọn lọc vì khả năng dung nhận glufosinat.

AIP1620 đã được nộp lưu tại Kho Patent của Trung tâm Nghiên cứu Ứng dụng Nông nghiệp Quốc gia, Bộ Nông nghiệp Hoa Kỳ, 1815 đường North University, Peoria, Illinois 61604 U.S.A. vào ngày 31 tháng 1 năm 2014 và đã được dùng mã số là NRRL No. B-50897. AIP050999 đã được nộp lưu tại Kho Patent của Trung tâm Nghiên cứu Ứng dụng Nông nghiệp Quốc gia, Bộ Nông nghiệp Hoa Kỳ, 1815 đường North University, Peoria, Illinois 61604 U.S.A. vào ngày 23 tháng 1 năm 2015 và đã được dùng mã số là NRRL No. B-50999. Mỗi chủng nộp lưu này sẽ được lưu giữ theo các điều khoản của Hiệp ước Budapest về sự công nhận quốc tế đối với việc nộp lưu chủng vi sinh nhằm tiến tới các thủ tục patent. Việc nộp lưu này được thực hiện đơn thuần như một sự thuận tiện cho những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này và không phải là sự thừa nhận rằng việc nộp lưu được quy định theo Điều 112 Luật Patent của Hoa Kỳ (35 U.S.C. §112).

Cụm từ “khả năng dung nhận thuốc diệt cỏ, thuốc diệt nấm, thuốc diệt vật gây

hại, hoặc hóa chất bảo vệ cây trồng khác hoặc khả năng kháng thuốc diệt cỏ, thuốc diệt nấm, thuốc diệt vật gây hại, hoặc các hóa chất bảo vệ cây trồng khác” là nhắc đến khả năng của một sinh vật (ví dụ cây trồng, tác nhân kiểm soát sinh học, tác nhân kiểm soát sinh học thuộc nhóm vi khuẩn...) có thể tồn tại và sinh sản sau khi tiếp xúc với một liều lượng thuốc diệt cỏ, thuốc diệt nấm, thuốc diệt vật gây hại, hoặc các hóa chất bảo vệ cây trồng khác mà thường gây chết đối với sinh vật kiểu dại.

Các tác nhân sinh học hoặc tác nhân kiểm soát sinh học theo sáng chế bao gồm các vi sinh vật và nấm có thể kiểm soát các nguồn gây bệnh cho thực vật và tăng cường sức khỏe, sinh trưởng và sản lượng cây trồng. Tác nhân sinh học hoặc tác nhân kiểm soát sinh học bất kỳ trong số các tác nhân sinh học hoặc tác nhân kiểm soát sinh học này có thể được cải biến bằng cách chọn lọc hoặc biến nạp và tạo ra một tác nhân sinh học hoặc tác nhân kiểm soát sinh học được cải biến, hoặc tác nhân sinh học hoặc tác nhân kiểm soát sinh học tái tổ hợp. Theo cách này, sáng chế bao gồm tác nhân kiểm soát sinh học được cải biến đã được phân lập. Các tác nhân kiểm soát sinh học được cải biến này có thể sinh trưởng để tạo ra một quần thể các tác nhân kiểm soát sinh học. Cụm từ “quần thể tác nhân sinh học hoặc kiểm soát sinh học được cải biến” được dự định để chỉ một quần thể các tác nhân mà về cơ bản bao gồm một giống cây của tác nhân đã được chọn lọc hoặc tác nhân tái tổ hợp có tính trạng quan tâm như tính kháng thuốc diệt cỏ, thuốc diệt nấm, thuốc diệt vật gây hại hoặc các hóa chất bảo vệ cây trồng khác. Cụm từ “về cơ bản bao gồm” là nói đến quần thể đã được sinh trưởng và tạo ra từ tác nhân kiểm soát sinh học được cải biến hoặc tái tổ hợp. Nghĩa là, các tác nhân kiểm soát sinh học được cải biến hoặc tái tổ hợp này có thể được sinh trưởng để tạo ra một giống cây thuần chủng về mặt sinh học. Các tác giả sáng chế nhận thấy rằng các giống cây thuần chủng về mặt sinh học như vậy có thể được sử dụng cùng nhau để tăng cường sức khỏe, sinh trưởng hoặc sản lượng cây trồng.

Bất kỳ tác nhân sinh học hay kiểm soát sinh học nào cũng có thể được sử dụng theo các phương pháp của sáng chế. Các vi sinh vật được quan tâm cụ thể bao gồm các chủng vi khuẩn thuộc giống *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Agrobacterium*, *Lysobacter*, *Gliocladium*, *Pythium*, *Chromobacterium*, *Penicillium*, *Pantoea*, *Lactobacillus*, *Paenibacillus*, *Burkholderia*, *Streptomyces*, *Variovorax*, *Pasteuria*, *Xanthomonas*,... Các loài nấm được quan tâm bao gồm *Aureobasidium*, *Ampelomyces*, *Beauveria*, *Metarhizium*, *Metschnikowia*, *Myrothecium*, *Lecanicillium*, *Chaetomium*, *Cordyceps*,

Coniothyrium, *Dactylella*, *Gliocladium*, *Aspergillus*, *Paecilomyces*, *Trichoderma*, *Pisolithus*, *Glomus*,.... Xem, ví dụ, patent Mỹ số 5,348,742; 5,496,547; 5,756,087; 5,955,348; 6,060,051; 6,635,425; và công báo sáng chế Mỹ số 20130142759; tất cả tài liệu này được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn. Nhiều tác nhân kiểm soát sinh học hiện có bán trên thị trường và tác nhân bất kỳ trong số các tác nhân này đều có thể được cải biến theo sáng chế. Những tác nhân như vậy bao gồm: *Agrobacterium radiobacter* K84; *Trichoderma atroviride*; *Bacillus subtilis* GB03; *Bacillus firmus* I-1582; *Trichoderma asperellum* (ICC 012); *T. gamsii* (ICC 080); *Bacillus pumilus* chủng QST 2808; *Bacillus subtilis* chủng QST 713; *B. subtilis* chủng MBI 600; *Paecilomyces fumosoroseus*; *Gliocladium catenulatum*; *Trichoderma harzianum* rifai chủng KRL-AG2; *Trichoderma harzianum* T-22; *Trichoderma harzianum* T-22; *Trichoderma virens* chủng G-41; *Trichoderma harzianum* T-22; *Bacillus subtilis* QST 713; *Bacillus amyloliquefaciens* chủng D747; *Trichoderma* (*Gliocladium*) *virens* GL-21; *Paecilomyces lilacinus*; *Paecilomyces fumosoroseus*; *Ampelomyces quisqualis*; *B. subtilis* DSM 17231; *B. licheniformis* DSM 17236; *Pythium oligandrum* DV 74; *Bacillus subtilis* GB03; *Trichoderma asperellum*; *T. gamsii*; *Pseudomonas syringae* ESC-10; *Metschnikowia fructicola*; *Trichoderma harzianum* T-22; *Pseudomonas chlororaphis* MA 342; *B. amyloliquefaciens*; *Chromobacterium subtsugae* strain PRAA4-1; *B. subtilis amyloliquefaciens* FZB24; *Penicillium bilaii*; *Paecilomyces fumosoroseus* FE 9901; *Streptomyces lydicus* WYEC 108; *P. syringae* A506; *Coniothyrium minitans*; *Paecilomyces lilacinus* strain 251; *Streptomyces lydicus* WYEC-108; *Bacillus amyloliquefaciens*; *Trichoderma virens*; *Trichoderma viride*; *Ampelomyces quisqualis*; *Chaetomium globosum*; *Pseudomonas fluorescens*; *Bacillus subtilis*; *Bacillus pumilis*; *Myrothecium verrucaria* AARC-0255; *Streptomyces actinobacterium* chủng K61; *Gliocladium catenulatum* J1446; *Aureobasidium pullulans* chủng DSM 14940; và *A. Pullulans* chủng DSM 14941. Các sản phẩm sinh học kiểm soát bệnh hại cây trồng khác có thể tìm thấy trên website tại địa chỉ: nevegetable.org/table-22-biological-disease-control-products.

Các loại nguồn gây bệnh bao gồm nấm, vi khuẩn, virus và giun đất. Các tác nhân kiểm soát sinh học của sáng chế là những tác nhân nhắm tới bất kỳ loại nguồn gây bệnh cho thực vật nào. Các nguồn gây bệnh đích bao gồm nhưng không giới hạn tới các loài thuộc *Alternaria*, *Botrytis*, *Fusarium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*,

Cercospora, Colletotrichum, Cladosporium, -Erisyphae spp., Microsphaera syringae, Peronospora spp., Plasmopara spp., Phytophthora, Pythium, Rhizoctonia, Diplocarpon, Venturia, Mycosphaerella, Phomopsis, Taphrina, Elsinoe, Sclerotinia, Verticillium, Gnomonia, Fusicladium, Nectria, Phyllosticta, Diplocarpon, Albugo, Guignardia, Botrytis, Exobasidium, Entomosporium, Exobasidium, Pestalotia, Phoma, Cristulariella, Phakopsora, Thelaviopsis, Puccinia, Peronospora, Bremia, Pantoa, Clavibacter.

Tính kháng thuốc diệt cỏ, thuốc diệt nấm, thuốc diệt vật gây hại hoặc các hóa chất bảo vệ cây trồng khác là khả năng của một sinh vật có thể tồn tại và sinh sản được trong điều kiện tiếp xúc với một liều lượng thuốc diệt cỏ, thuốc diệt nấm, thuốc diệt vật gây hại hoặc các hóa chất bảo vệ cây trồng khác mà thường gây chết sinh vật kiểu dại hoặc làm giảm đáng kể sự sinh trưởng của sinh vật kiểu dại đó. Tính kháng có thể được đưa vào hoặc được phát hiện trong quá trình chọn lọc hoặc có thể được đưa vào thông qua kỹ thuật gen. Để phát hiện và tạo ra một quần thể các tác nhân kiểm soát sinh học được cải biến thông qua chọn lọc, các tác nhân kiểm soát sinh học phải được sinh trưởng trong điều kiện có thuốc diệt cỏ, thuốc diệt nấm, thuốc diệt vật gây hại hoặc các hóa chất bảo vệ cây trồng khác như áp lực chọn lọc. Các tác nhân nhạy cảm sẽ bị tiêu diệt, còn các tác nhân có khả năng kháng sẽ tồn tại để sinh sản khi không còn sự cạnh tranh nào. Khi các tác nhân kiểm soát sinh học đã sinh trưởng trong điều kiện có thuốc diệt cỏ, thuốc diệt nấm, thuốc diệt vật gây hại hoặc các hóa chất bảo vệ cây trồng khác, các tác nhân kiểm soát sinh học có khả năng kháng sẽ sinh sản thành công và trở nên ưu thế trong quần thể, trở thành một quần thể tác nhân kiểm soát sinh học được cải biến. Các phương pháp chọn lọc các chủng có khả năng kháng đã được biết đến và nêu trong patent Mỹ số 4.306.027 và 4.094.097, đã được viện dẫn vào bản mô tả này. Do vậy, sáng chế bao gồm một giống cây thuần chủng về mặt sinh học của một chủng kiểm soát sinh học có khả năng kháng. Các chủng có khả năng kháng trong sáng chế đều có những đặc trưng giống với chủng nhạy ban đầu ngoại trừ việc chúng có khả năng dung hòa lớn hơn đáng kể với một loại thuốc diệt cỏ, thuốc diệt nấm, thuốc diệt vật gây hại hoặc hóa chất bảo vệ mùa màng cụ thể. Theo đó, việc nhận dạng chúng có thể dễ dàng thực hiện bằng cách so sánh với những đặc trưng của chủng nhạy đã biết.

Các loại thuốc diệt cỏ bao gồm glyphosat, chất ức chế ACCaza (Arloxyphenoxy propionat (FOPS)); chất ức chế ALS (Sulfonylure (SU)), Imidazonlinon (IMI),

Pyrimidin (PM)); chất ức chế vi ống (Dinitroanilin (DNA)); auxin tổng hợp (Phenoxy (P)), Axit Benzoic (BA), Axit Cacboxylic (CA)); chất ức chế phức hệ quang hợp II (Triazin (TZ)), Triazinon (TN), Nitril (NT), Benzothiadiazinon (BZ), Ure (US)); chất ức chế tổng hợp EPSP (glyxin (GC)); chất ức chế tổng hợp glutamin (Axit Phosphinic (PA)); chất ức chế tổng hợp DOXP (Isoxazolidinon (IA)); chất ức chế HPPD (Pyrazol (PA)), Triketon(TE)); các chất ức chế PPO (Diphenylete (DE), N-phenylphthalimide (NP) (Ary triazinon (AT)); các chất ức chế VLFA (cloroaxetamit (CA)), Oxyaxetamit (OA)); chất ức chế phức hệ quang hợp I (Bipyridyliums (BP)); và các chất tương tự.

Các thuốc diệt vật gây hại bao gồm imidacloprit clothianidin, các hợp chất arylpyrazol (WO2007103076); photphat hữu cơ, phenyl pyrazol, pyrethoit caramoyloxim, pyrazol, amidin, hydrocacbon được halogen hóa, cacbamat và các dẫn xuất, terbufos, cloropyrifos, fipronil, cloretoxyfos, telfuthrin, cacbofuran, imidacloprit, tebupirimfos (5.849.320).

Các thuốc diệt nấm bao gồm thuốc diệt nấm nitơ béo (butylamin, xymoxanil, dodixin, dodin, guazatin, iminoctadin); các thuốc diệt nấm amit (benzovindiflupyr, carpropamit, cloraniformetan, xyflufenamit, dicloxymet, dicloxymet, dimoxystrobin, fenaminstrobin, fenoxanil, flumetover, furametpyr, isofetamit, isopyrazam, mandestrobin, mandipropamit, metominostrobin, orysastrobin, penthiopyrat, prochlora, quinazamit, silthiofam, triforin); các thuốc diệt nấm axit axylamino (benalaxyl, benalaxyl-M, furalaxyl, metalaxyl, metalaxyl-M, pefurazoat, valifenalat); các thuốc diệt nấm anilit (benalaxyl, benalaxyl-M, bixafen, boscalit, cacboxin, fenhexamit, fluxapyroxat, isotianil, metalaxyl, metalaxyl-M, metsulfovax, ofuraxe, oxadixyl, oxycacboxin, penflufen, pyracacbolit, sedaxan, thifluzamit, tiadinil, vanguard); các thuốc diệt nấm benzanilit (benodanil, flutolanil, mebenil, mepronil, salixylanilit, tecloftalam); các thuốc diệt nấm furanilit (fenfuram, furalaxyl, furcacbanil, methfuroxam); các thuốc diệt nấm sulfonanilit (flusulfamit); các thuốc diệt nấm benzamit (axit benzohydroxamic, flocipolit, flopyram, tioxymit, triclamil, zarilamit, zoxamit); các thuốc diệt nấm furamit (xyclafuramit, furmexyclox); các thuốc diệt nấm phenylsulfamit (dichlofluanit, tolylfluanit); các thuốc diệt nấm sulfonamit (amisulbrom, xyazofamit); các thuốc diệt nấm valinamit (benthiavalicarb, iprovalicarb); các thuốc diệt nấm dạng kháng sinh (aureofungin, blastixidin-S, xycloheximit, griseofulvin, kasugamycin, moroxydin, natamycin, polyoxin, polyoxorim, streptomycin,

validamycin); các thuốc diệt nấm strobilurin (floxastrobin, mandestrobin); các thuốc diệt nấm metoxyacrylat strobilurin (azoxystrobin, bifujunzhi, coumoxystrobin, enoxastrobin, flufenoxystrobin, jiaxiangjunzhi, picoxystrobin, pyraoxystrobin); các thuốc diệt nấm metoxycacbanilat strobilurin (pyraclostrobin, pyrametostrobin, triclopyricarb); các thuốc diệt nấm metoxyiminoaxetamid strobilurin (dimoxystrobin, fenaminstrobin, metominostrobin, orysastrobin); các thuốc diệt nấm metoxyiminoaxetat strobilurin (kresoxim-metyl, trifloxystrobin); các thuốc diệt nấm aromatic (biphenyl, clorodinitronaphtalen, cloroneb, clorothalonil, cresol, dicloran, fenjuntong, hexaclorobenzen, pentaclorophenol, quintozen, natri pentaclorophenoxit, tecnazen, triclotrinitrobenzen); các thuốc diệt nấm chứa asen (asomat, urbacit); các thuốc diệt nấm aryl phenyl keton (metrafenon, pyriofenon); các thuốc diệt nấm benzimidazol (albendazol, benomyl, cacbendazim, clorfenazol, cypendazol, debacarb, fuberidazol, mecarbinzit, rabenzazol, thiabendazol); các thuốc diệt nấm benzimidazol precursor (furophanat, thiophanat, thiophanat-metyl); các thuốc diệt nấm benzothiazol (bentaluron, benthiavalicarb, benthiazol, clobenthiazon, probenazol); các thuốc diệt nấm từ thực vật (alixin, becberin, cacvacrol, cacvon, osthol, sanguinarin, santonin); các thuốc diệt nấm diphenyl được tạo cầu nối (bithionol, diclorophen, diphenylamin, hexaclorophen, parinol); các thuốc diệt nấm cacbamat (benthiavalicarb, furophanat, iodocarb, iprovalicarb, picarbutrazox, propamocarb, pyribencarb, thiophanat, thiophanat-metyl, tolprocarb); các thuốc diệt nấm benzimidazolylcacbamat (anbendazol, benomyl, cacbendazim, xypendazol, debacarb, mecarbinzit); các thuốc diệt nấm carbanilat (diethofencarb, pyraclostrobin, pyrametostrobin, triclopyricarb); các thuốc diệt nấm conazol(imidazol) (climbazol, clotrimazol, imazalil, oxpoconazol, prochlora, triflumizol); các thuốc diệt nấm conazol (triazol) (azaconazol, bromuconazol, xyproconazol, diclobutrazol, difenoconazol, diniconazol, diniconazol-M, epoxiconazol, etaconazol, fenbuconazol, fluquinconazol, flusilazol, flutriafol, furconazol, furconazol-cis, hexaconazol, imibenconazol, ipconazol, metconazol, myclobutanil, penconazol, propiconazol, prothioconazol, quinconazol, simeconazol, tebuconazol, tetraconazol, triadimefon, triadimenol, triticonazol, uniconazol, uniconazol-P); các thuốc diệt nấm chứa đồng (axypetac-đồng, hỗn hợp Bordeaux, hỗn hợp Burgundy, hỗn hợp Cheshunt, đồng axetat, đồng cacbonat, bazơ, đồng hydroxit, đồng naphtenat, đồng oleat, đồng oxyclorea, đồng silicat, đồng sulfat, đồng sulfat, bazơ, đồng kẽm cromat, cufraneb,

cuprobam, đồng oxit, hợp chất chứa đồng và mangan (mancopper), oxin-đồng, saientong, thiodiazol-đồng); các thuốc diệt nấm xyanoacrylat (benzamacril, phenamacril); các thuốc diệt nấm dicacboximit (famoxadon, floroimit); các thuốc diệt nấm diclorophenyl dicacboximit (clozolinat, diclozolin, iprodion, isovalledion, myclozolin, proxymidon, vinclozolin); các thuốc diệt nấm phtalimit (captafol, captan, ditalimfos, folpet, thioclorfenphim); các thuốc diệt nấm dinitrophenol (binapacryl, dinobuton, dinocap, dinocap-4, dinocap-6, meptyldinocap, dinoceton, dinopenton, dinosulfon, dinoterbon, DNOC); các thuốc diệt nấm dithiocacbammat (amobam, asomat, azithiram, carbamorph, cufraneb, cuprobam, disulfiram, ferbam, metam, nabam, tecoram, thiram, urbaxit, ziram); các thuốc diệt nấm xyclic dithiocacbammat (dazomet, etem, milneb); các thuốc diệt nấm polymeric dithiocacbammat (mancopper, mancozeb, maneb, metiram, polycarbamat, propineb, zinb); các thuốc diệt nấm dithiolan (isoprothiolan, saijunmao); các thuốc diệt nấm fumigant (cacbon disulfit, xyanogen, dithioete, metyl bromua, metyl iodua, natri tetrathiocacbonat); các thuốc diệt nấm hydrazit (benquinox, saijunmao); các thuốc diệt nấm imidazol (xyazofamit, fenamidon, fenapanil, glyodin, iprodion, isovalledion, pefurazoat, triazoxit); các thuốc diệt nấm conazol (imidazol) (climbazol, clotrimazol, imazalil, oxpoconazol, prochloraz, triflumizol); các thuốc diệt nấm vô cơ (kali azit, kali thioxyanat, natri azit, lưu huỳnh, tham khảo thêm thuốc diệt nấm chứa đồng và thuốc diệt nấm thủy ngân vô cơ); thuốc diệt nấm thủy ngân; thuốc diệt nấm thủy ngân vô cơ (thủy ngân (hóa trị II) clorua, thủy ngân oxit, thủy ngân (hóa trị I) clorua); thuốc diệt nấm thủy ngân hữu cơ ((3-etoxypropyl)Hg bromua, etylHg axetat, etylHg bromua, etylHg clorua, etylHg 2,3-dihydroxypropyl mercaptit, etylHg photphat, *N*-(etylHg)-*p*-toluensulphonanilit, hydrargaphen, 2-metoxyetylHg clorua, metylHg benzoat, metylHg dixyandiamit, metylHg pentaclorophenoxit, 8-phenylmercurioxyquinolin, phenylHg, phenylHg axetat, phenylHg clorua, dẫn xuất phenylHg của pyrocatechol, phenylHg nitrat, phenylHg salixylat, thiomersal, tolylHg axetat); thuốc diệt nấm morpholin (aldimorph, benzamorf, cacbamorph, dimethomorph, dodemorph, fenpropimorph, flumorph, tridemorph); thuốc diệt nấm photpho hữu cơ (ampropylfos, ditalimfos, EBP, edifenphos, fosetyl, hexylthiofos, inezin, iprobenfos, izopamfos, kejunlin, phosdiphen, pyrazophos, tolclofos-metyl, triamiphos); thuốc diệt nấm chứa thiếc hữu cơ (decafentin, fentin, tributyltin oxit); thuốc diệt nấm oxathiin (cacboxin, oxycacboxin); thuốc diệt nấm

oxazol (clozolinat, diclozolin, drazoxolon, famoxadon, hymexazol, metazoxolon, myclozolin, oxadixyl, oxathiapiprolin, pyrisoxazol, vinclozolin); thuốc diệt nấm polysulfit (bari polysulfit, canxi polysulfit, kali polysulfit, natri polysulfit); thuốc diệt nấm pyrazol (benzovindiflupyr, bixafen, fenpyrazamin, fluxapyroxad, furametpyr, isopyrazam, oxathiapiprolin, penflufen, penthiopyrad, pyraclostrobin, pyrametostrobin, pyraoxystrobin, rabenzazol, sedaxan); thuốc diệt nấm pyridin (boscalit, buthiobat, dipyrithion, fluazinam, flociclit, flopyram, parinol, picarbutrazox, pyribencarb, pyridinitril, pyrifenox, pyrisoxazol, pyroxychlor, pyroxyfur, triclopyricarb); thuốc diệt nấm pyrimidin (bupirimat, diflumentorim, dimethirimol, ethirimol, fenarimol, ferimzon, nuarimol, triarimol); thuốc diệt nấm anilinopyrimidin (xyprodinil, mepanipyrim, pyrimethanil); thuốc diệt nấm pyrrol (dimetaclon, fenciclonil, fludioxonil, floroimit); thuốc diệt nấm chứa amoni bậc bốn (becberin, sanguinarin); thuốc diệt nấm quinolin (etoxyquin, halacrinat, 8-hydroxyquinolin sulfat, quinaxetol, quinoxifen, tebufloquin); thuốc diệt nấm quinon (cloranil, diclon, dithianon); thuốc diệt nấm quinoxalin (chinomethionat, clorquinox, thioquinox); thuốc diệt nấm thiadiazol (etridiazol, saisentong, thiodiazol-đồng, kẽmthiazol); thuốc diệt nấm thiazol (ethaboxam, isotianil, metsulfovax, octhilinon, oxathiapiprolin, thiabendazol, thifluzamit); thuốc diệt nấm thiazolidin (flutianil, thiadiflo); thuốc diệt nấm thiocacbammat (methasulfocarb, prothiocarb); thuốc diệt nấm thiophen (ethaboxam, isofetamit, silthiofam); thuốc diệt nấm triazin (anilazin); thuốc diệt nấm triazol (amisulbrom, bitertanol, flotrimazol, triazbutil); thuốc diệt nấm conazol(triazol) (azaconazol, bromuconazol, cyproconazol, diclobutrazol, difenoconazol, diniconazol, diniconazol-M, epoxiconazol, etaconazol, fenbuconazol, fluquinconazol, flusilazol, flutriafol, furconazol, furconazol-cis, hexaconazol, huanjunzuo, imibenconazol, ipconazol, metconazol, myclobutanil, penconazol, propiconazol, prothioconazol, quinconazol, simeconazol, tebuconazol, tetraconazol, triadimefon, triadimenol, triticonazol, uniconazol, uniconazol-P); thuốc diệt nấm triazolopyrimidin(ametocetradin); thuốc diệt nấm chứa ure(bentaluron, pencycuron, quinazamit); thuốc diệt nấm chứa kẽm (axypetacs-kẽm, đồng kẽm cromat, cufraneb, mancozeb, metiram, polycacbammat, polyoxorim-kẽm, propineb, kẽm naphthenat, kẽm thiazol, kẽm triclophenoxit, zinb, ziram); thuốc diệt nấm chưa được phân loại (axibenzolar, axypetac, rượu anlylic, benzalkoni clorua, bethoxazin, bromothalonil, chitosan, cloropicrin, DBCP, axitdehydroaxetic, diclomezin, dietyl pyrocacbonat,

etylixin, fenaminosulf, fenitropan, fenpropidin, formaldehyt, furfural, hexaclorobutadien, metyl isothioxyanat, nitrostyren, nitrothal-isopropyl, OCH, pentaclorophenyl laurat, 2-phenylphenol, phtalit, piperalin, propamidin, proquinazit, pyroquilon, natri octhophenylphenoxit, spiroxamin, sultropen, thixyofen, trixyclozolol hoặc mefenoxam.

Như đã nêu, các tác nhân kiểm soát sinh học tái tổ hợp có khả năng kháng thuốc diệt cỏ, thuốc diệt nấm, thuốc diệt vật gây hại, hoặc các hóa chất bảo vệ cây trồng khác có thể tạo ra bằng kỹ thuật gen và những tác nhân kiểm soát sinh học tái tổ hợp hoặc được cải biến nhân tạo như vậy đã phát triển thành một quần thể tác nhân kiểm soát sinh học được cải biến. Một tác nhân kiểm soát sinh học tái tổ hợp được tạo ra bằng cách đưa các chuỗi nucleotit vào tế bào chủ kiểm soát sinh học bằng biến nạp. Các phương pháp tạo ra vi sinh vật chuyển gen đã được biết đến trong tình trạng kỹ thuật. Xem, tổng quát, Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids *J. Mol. Biol.* 166, 557–77; Seidman, C.E. (1994) trong: *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel, F.M. *et al.* eds., John Wiley and Sons, NY; Choi *et al.* (2006) *J. Microbiol. Methods* 64:391-397; Wang *et al.* 2010. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 85:775–778. Biến nạp có thể xảy ra bởi sự dung nạp tự nhiên của ADN trần thông qua những tế bào khả biến từ môi trường của chúng trong phòng thí nghiệm. Một cách khác là các tế bào có thể trở nên khả biến bằng các cách như phơi nhiễm với ion dương hóa trị hai trong điều kiện lạnh, dùng xung điện, cho phơi nhiễm với polyetylen glycol, xử lý với các hạt nano dạng sợi, hoặc các phương pháp khác trong tình trạng kỹ thuật đã biết.

Các gen quy định khả năng kháng thuốc diệt cỏ được sử dụng trong biến nạp một tác nhân kiểm soát sinh học tái tổ hợp bao gồm, nhưng không bị giới hạn bởi các gen giải độc fumonisin (Patent Mỹ số 5.792.931); các đột biến tổng hợp axetolactat (ALS) dẫn tới tính kháng thuốc diệt cỏ, đặc biệt thuốc diệt cỏ loại sulfonylure, như là đột biến S4 và/hoặc Hra; các chất ức chế tổng hợp glutamin như photphinothrixin hoặc basta (ví dụ gen bar); và kháng glyphosat (gen EPSPS)); và kháng HPPD (WO 96/38576, Patent Mỹ số 6.758.044; 7.250.561; 7.935.869; và 8.124.846), hoặc các gen tương tự trong tình trạng kỹ thuật đã biết. Những nội dung đã biết đó đều được viện dẫn trong bản mô tả này. Gen bar mã hóa tính kháng thuốc diệt cỏ basta, gen nptII mã hóa tính kháng các chất kháng sinh kanamycin và genetixin, và các đột biến gen ALS mã hóa tính kháng

thuốc diệt cỏ sulfonylure bao gồm clorosulfuron, metsulfuron, sulfometuron, nicosulfuron, rimsulfuron, flazasulfuron, sulfosulfuron, và triasulfuron, thuốc diệt cỏ imadizolinone bao gồm imazethapyr, imazaquin, imazapyr, và imazamethabenz.

Các quần thể tác nhân kiểm soát sinh học đã cải biến trong sáng chế có thể được hình thành ở dạng bột ướt, bụi, hạt nhỏ, các sản phẩm dạng lỏng chứa nước hoặc dầu và những dạng tương tự. Những chế phẩm như vậy sẽ bao gồm các tác nhân kiểm soát sinh học được cải biến cộng thêm các vật mang và các tác nhân khác. Những chế phẩm này có thể được sử dụng như chất chủng để kiểm soát sinh học ngoài thiên nhiên, chế phẩm bao ngoài hạt, v.v.. Nghĩa là các quần thể kiểm soát sinh học được cải biến có thể được sử dụng theo bất kỳ cách nào trong tình trạng kỹ thuật đã biết, bao gồm việc bao phủ các hạt với một lượng hữu hiệu của các tác nhân được cải biến, đưa các quần thể kiểm soát sinh học đã được cải biến trực tiếp vào đất trồng trong từng đường cây, đưa vào lá, trộn vào một hỗn hợp đất trồng trong chậu, và trong việc kiểm soát dịch bệnh sau thu hoạch. Những phương pháp này là đã biết trong tình trạng kỹ thuật và đã được mô tả, ví dụ, trong patent Mỹ số 5.348.742 và trong đơn đăng ký patent tại châu Âu số EP0472494 A2 đã được công bố, cả hai tài liệu đều được viện dẫn trong bản mô tả này. Kiểm soát sinh học gồm việc quản lý các quần thể sinh vật sẵn có và đưa vào các sinh vật đặc trưng nhằm làm giảm bệnh trên cây.

Tác nhân kiểm soát sinh học được giới thiệu trong tài liệu này có thể trộn với thuốc diệt nấm, thuốc diệt côn trùng hoặc thuốc diệt cỏ để tăng cường hoạt tính của nó hoặc hoạt tính của chất hóa học mà nó đã được thêm vào. Trong một số trường hợp, sự kết hợp của tác nhân kiểm soát sinh học và chất hóa học có thể gây ra tác dụng hiệp đồng, nghĩa là sự pha trộn hai thứ đem lại kết quả vượt xa mong đợi so với việc cộng đơn thuần hoạt tính của chúng.

Các tác nhân kiểm soát sinh học được cải biến của sáng chế có thể được dùng để làm giảm một cách đáng kể bệnh trên cây, thúc đẩy sinh trưởng và sản lượng cây trồng, cũng như làm giảm sự phụ thuộc vào thuốc diệt vật gây hại truyền thống. Các tác nhân được cải biến trong sáng chế có thể được dùng với các thuốc diệt vật gây hại khác để có một chương trình quản lý sâu bệnh tích hợp hiệu quả. Theo một phương án, các quần thể kiểm soát sinh học được cải biến có thể được trộn vào chế phẩm với các thuốc diệt

vật gây hại đã biết theo kỹ thuật được mô tả trong WO 94/10845, đã được viện dẫn trong bản mô tả này.

Các quần thể kiểm soát sinh học được cải biến được sử dụng với một lượng hữu hiệu. Một lượng hữu hiệu của một quần thể kiểm soát sinh học được cải biến là liều lượng đủ để kiểm soát hoặc ngăn chặn nguồn gây bệnh. Theo các phương án khác, lượng hữu hiệu của tác nhân kiểm soát sinh học được cải biến là một liều lượng đủ để thúc đẩy hoặc tăng cường sức khỏe, sinh trưởng hoặc sản lượng cây trồng khi đã có một tỉ lệ thuốc diệt sinh vật trên vùng trồng cây nông nghiệp. Tỉ lệ sử dụng tác nhân kiểm soát sinh học được cải biến và/hoặc thuốc diệt sinh vật có thể khác nhau tùy thuộc vào nguồn gây bệnh đích, mùa vụ cần bảo vệ, hiệu lực của các quần thể kiểm soát sinh học được cải biến, tính nghiêm trọng của dịch bệnh, điều kiện khí hậu và những yếu tố tương tự. Nhìn chung, với một chất đưa vào môi trường tự nhiên, tỉ lệ sử dụng tác nhân kiểm soát sinh học được cải biến là 10^{12} đến 10^{16} đơn vị hình thành khuẩn lạc (CFU) trên một hecta. (Tỉ lệ này tương ứng với khoảng 10 g đến 10 kg hoạt chất trên một hecta nếu hoạt chất là 100 tỷ CFU trên một gam). Theo các phương án khác, với một chất đưa vào môi trường tự nhiên, tỉ lệ sử dụng tác nhân kiểm soát sinh học được cải biến là 3×10^{15} đến 1×10^{17} đơn vị hình thành khuẩn lạc (CFU) trên một hecta. (Tỉ lệ này tương ứng với khoảng 30 kg đến 1000 kg hoạt chất trên một hecta nếu hoạt chất là 100 tỷ CFU trên một gam). Theo các phương án khác, với một chất đưa vào môi trường tự nhiên, tỉ lệ sử dụng tác nhân kiểm soát sinh học được cải biến là 3×10^{15} đến 1×10^{17} đơn vị hình thành khuẩn lạc (CFU) trên một hecta; khoảng 1×10^{12} đến khoảng 1×10^{13} đơn vị hình thành khuẩn lạc (CFU) trên một hecta, khoảng 1×10^{13} đến khoảng 1×10^{14} đơn vị hình thành khuẩn lạc (CFU) trên một hecta, khoảng 1×10^{14} đến khoảng 1×10^{15} đơn vị hình thành khuẩn lạc (CFU) trên một hecta, khoảng 1×10^{15} đến khoảng 1×10^{16} đơn vị hình thành khuẩn lạc (CFU) trên một hecta hoặc khoảng 1×10^{16} đến khoảng 1×10^{17} đơn vị hình thành khuẩn lạc (CFU) trên một hecta. Theo các phương án khác, với một chất đưa vào môi trường tự nhiên, tỉ lệ sử dụng tác nhân kiểm soát được cải biến là ít nhất khoảng 1×10^{13} , khoảng 1×10^{14} , 1×10^{15} , khoảng 1×10^{16} hoặc khoảng 1×10^{17} đơn vị hình thành khuẩn lạc (CFU) trên một hecta. Theo các phương án khác nữa, tỉ lệ sử dụng tác nhân kiểm soát sinh học được cải biến là 10g đến 50kg, 50kg đến 100kg, 100kg đến 200kg, 200kg đến 300kg, 300kg đến 400kg, 400kg đến 500kg, 500kg đến 600kg, 600kg đến 700kg, 700kg đến 800kg, 800kg đến 900kg, 900kg đến 1000kg hoạt chất trên một hecta

nếu hoạt chất là 100 tỷ CFU trên một g. Vẫn theo các phương án khác, tỉ lệ sử dụng tác nhân kiểm soát sinh học ít nhất là 10g, 50kg, 100kg, 200kg, 300kg, 400kg, 500kg, 600kg, 700kg, 800kg, 900kg, 1000kg của hoạt chất trên một hecta nếu hoạt chất là 100 tỷ CFU trên một g. Theo các phương án cụ thể, tác nhân kiểm soát sinh học cải biến được sử dụng bao gồm chủng nột lưu mang mã số NRRL No. B-50897 và/hoặc chủng AIP050999 nột lưu mang mã số NRRL No. B-50999.

Bất kỳ tỉ lệ sử dụng hợp lý thuốc diệt sinh vật nào trong nông nghiệp cũng có thể được sử dụng cho cây trồng, ví dụ, một lượng hữu hiệu thuốc diệt sinh vật để kiểm soát một sinh vật nhất định (là loài sinh vật gây hại quan tâm, như nấm, côn trùng, cỏ dại, bệnh trên cây, v.v.) đều có thể sử dụng. Các phương pháp để phân tích lượng hữu hiệu của tác nhân kiểm soát sinh học bao gồm, ví dụ, bất kỳ sự gia tăng đáng kể nào về mặt thống kê đối với sức khỏe, sản lượng và/hoặc sinh trưởng của cây trồng sau khi sử dụng một lượng hữu hiệu của tác nhân kiểm soát sinh học và một tỉ lệ sử dụng thuốc diệt sinh vật ngoài tự nhiên khi so sánh với số liệu về sức khỏe, sản lượng và/hoặc sinh trưởng của cây trồng khi sử dụng liều lượng tương tự tác nhân kiểm soát sinh học không được cải biến kết hợp với một lượng hữu hiệu của thuốc diệt sinh vật.

Do đó, phương án khác theo sáng chế đề xuất phương pháp kiểm soát hoặc ức chế sự sinh trưởng của nguồn gây bệnh cho thực vật bằng cách cấp quần thể tác nhân kiểm soát sinh học được cải biến theo sáng chế vào môi trường mà nguồn gây bệnh cho thực vật có thể sinh trưởng. Việc cấp có thể trên toàn bộ cây, các phần của cây, các hạt của các cây cần được bảo vệ, hoặc vào đất trồng có cây cần được bảo vệ đang hoặc sẽ sinh trưởng. Việc cấp cho cây hoặc các phần của cây có thể vào thời điểm trước hoặc sau khi thu hoạch. Việc sử dụng cho hạt sẽ phải diễn ra trước khi gieo trồng các hạt đó.

Theo các phương án khác, cây trồng, khu vực trồng trọt, hạt và/hoặc cỏ dại có thể được xử lý bằng một tổ hợp lượng hữu hiệu của tác nhân kiểm soát sinh học được cải biến và một lượng hữu hiệu thuốc diệt sinh vật. Cụm từ “xử lý bằng hỗn hợp của” hoặc “sử dụng hỗn hợp của” tác nhân kiểm soát sinh học được cải biến và một thuốc diệt sinh vật với cây trồng, khu vực trồng trọt được hiểu là một hoặc nhiều cánh đồng, cây trồng, hạt hoặc/và cỏ dại cụ thể được xử lý với một hoặc nhiều tác nhân kiểm soát sinh học được cải biến và một hoặc nhiều thuốc diệt sinh vật để đạt được hiệu quả mong đợi. Hơn nữa, việc cấp một hoặc cả hai loại tác nhân kiểm soát sinh học và thuốc diệt

sinh vật có thể xảy ra trước khi bắt đầu trồng cây (ví dụ, vào đất trồng, hạt hoặc cây). Ngoài ra, việc cấp tác nhân kiểm soát sinh học và thuốc diệt sinh vật có thể đồng thời hoặc ở các thời điểm khác nhau (lần lượt), miễn là đạt được hiệu quả mong đợi.

Trong một phương án không giới hạn, tác nhân kiểm soát sinh học được cải biến có khả năng kháng glyphosat và làm tăng cường sức khỏe, sự sinh trưởng hoặc sản lượng cây trồng khi được sử dụng với lượng hữu hiệu, và thuốc diệt sinh vật bao gồm glyphosat hoặc một gốc hoạt tính của nó. Theo những phương pháp này, hạt, cây trồng hoặc khu vực trồng trọt được xử lý bằng một tổ hợp gồm một lượng hữu hiệu tác nhân kiểm soát sinh học được cải biến có khả năng kháng glyphosat và một lượng hữu hiệu của glyphosat, trong đó lượng hữu hiệu của glyphosat để kiểm soát cỏ dại một cách chọn lọc mà không gây tổn hại nghiêm trọng đến cây trồng. Theo các phương án này, lượng hữu hiệu của tác nhân kiểm soát sinh học được cải biến là vừa đủ để dẫn đến sự gia tăng đáng kể về mặt thống kê đối với sức khỏe của cây trồng, sản lượng và/hoặc sự sinh trưởng khi so sánh với sức khỏe cây trồng, sản lượng và/hoặc sự sinh trưởng xảy ra khi một nồng độ tương tự của tác nhân kiểm soát sinh học không được cải biến được sử dụng trong tổ hợp với lượng hữu hiệu của glyphosat hoặc dẫn xuất của nó. Theo phương án khác, tác nhân kiểm soát sinh học bao gồm một lượng hữu hiệu của AIP1620.

Trong một phương án không giới hạn khác, tác nhân kiểm soát sinh học được cải biến có khả năng kháng glufosinat và do đó làm tăng cường sức khỏe, sản lượng hoặc sự sinh trưởng cây trồng khi được dùng một lượng hữu hiệu, và thuốc diệt sinh vật gồm glufosinat hoặc dẫn xuất của nó. Theo những phương pháp đó, hạt, cây trồng hoặc khu vực trồng trọt được xử lý với một tổ hợp gồm một lượng hữu hiệu tác nhân kiểm soát sinh học được cải biến có khả năng kháng glufosinat và lượng hữu hiệu của glufosinat, trong đó lượng hữu hiệu của glufosinat để kiểm soát cỏ dại một cách chọn lọc mà không gây tổn hại nghiêm trọng đến cây trồng. Theo các phương án đó, lượng hữu hiệu của tác nhân kiểm soát sinh học được cải biến là vừa đủ để dẫn đến một sự tăng đáng kể về mặt thống kê đối với sức khỏe, sản lượng và/hoặc sự sinh trưởng của cây trồng khi so sánh với sức khỏe, sản lượng và/hoặc sự sinh trưởng của cây trồng xảy ra khi một nồng độ tương tự của tác nhân kiểm soát sinh học không được cải biến được sử dụng trong một tổ hợp với lượng hữu hiệu của glufosinat hoặc dẫn xuất của nó. Theo phương án khác, tác nhân kiểm soát sinh học bao gồm một lượng hữu hiệu của AIP050999.

Như đã được sử dụng trong tài liệu này, thuật ngữ “thực vật” bao gồm các tế bào thực vật, tế bào thực vật trần, mô tế bào thực vật nuôi cấy mà từ đó các cây trồng có thể sinh sôi, các mầm trên cây, các khóm cây và các tế bào thực vật còn nguyên vẹn trong cây trồng hoặc các phần của cây trồng như phôi, hạt phấn, noãn, hạt, lá, hoa, cành cây, quả, hạt, tai, lõi, vỏ hạt, thân cây, rễ, đầu rễ, bao phấn và những phần tương tự. Hạt được hiểu là hạt trưởng thành được tạo ra bởi những nhà trồng trọt quy mô thương mại vì mục đích không phải để sinh trưởng hay sinh sản loài đó. Cây con, các biến thể và các đột biến của các cây thế hệ sau cũng được tính trong phạm vi của sáng chế, miễn là những phần đó chứa chuỗi nucleotit được chuyển vào.

Tác nhân kiểm soát sinh học được cải biến có thể được sử dụng với bất cứ loại cây trồng nào, bao gồm, nhưng không giới hạn tới, cây một lá mầm và hai lá mầm. Những ví dụ của các loài cây được quan tâm bao gồm, nhưng không giới hạn tới, cây ngô (*Zea mays*), *Brassica* sp. (ví dụ *B. napus*, *B. rapa*, *B. juncea*), đặc biệt những loài *Brassica* này rất hữu ích vì là nguồn cung cấp dầu thực vật từ hạt, cây cỏ linh lăng (*Medicago sativa*), lúa (*Oryza sativa*), lúa mạch đen (*Secale cereale*), cây cao lương (*Sorghum bicolor*, *Sorghum vulgare*), cây kê (ví dụ: kê ngọc trai (*Pennisetum glaucum*), kê proso (*Panicum miliaceum*), kê đuôi cáo (*Setaria italica*), kê ngón tay (*Eleusine coracana*)), cây hướng dương (*Helianthus annuus*), cây rum (*Carthamus tinctorius*), lúa mì (*Triticum aestivum*), đậu tương (*Glycine max*), thuốc lá (*Nicotiana tabacum*), khoai tây (*Solanum tuberosum*), lạc (*Arachis hypogaea*), cây bông (*Gossypium barbadense*, *Gossypium hirsutum*), khoai lang (*Ipomoea batatas*), sắn (*Manihot esculenta*), cà phê (*Coffea* spp.), dừa (*Cocos nucifera*), dứa (*Ananas comosus*), cây cam chanh (*Citrus* spp.), cây ca cao (*Theobroma cacao*), cây chè (*Camellia sinensis*), chuối (*Musa* spp.), bơ (*Persea americana*), sung Mỹ (*Ficus casica*), ổi (*Psidium guajava*), xoài (*Mangifera indica*), ô liu (*Olea europaea*), đu đủ (*Carica papaya*), điều (*Anacardium occidentale*), mắc-ca (*Macadamia integrifolia*), hạnh nhân (*Prunus amygdalus*), củ cải đường (*Beta vulgaris*), mía (*Saccharum* spp.), lúa mạch, cây lúa mạch barley, các loại rau, cây cảnh và cây lá kim.

Các loại rau bao gồm cà chua (*Lycopersicon esculentum*), xà lách (ví dụ, *Lactuca sativa*), đậu xanh (*Phaseolus vulgaris*), đậu ngự (*Phaseolus limensis*), đậu (*Lathyrus* spp.), và các loài cây thuộc chi *Cucumis* như dưa chuột (*C. sativus*), dưa vàng (*C. cantalupensis*), và cây dưa hương (*C. melo*). Các loại cây cảnh bao gồm cây đỗ quyên (*Rhododendron* spp.), tú cầu (*Macrophylla hydrangea*), dâm bụt (*Hibiscus rosasanensis*), hoa hồng (*Rosa*

spp.), tu-lip (*Tulipa* spp.), thủy tiên (*Narcissus* spp.), dạ yên thảo (*Petunia hybrida*), cẩm chướng (*Dianthus caryophyllus*), trạng nguyên (*Euphorbia pulcherrima*), và các loài hoa cúc.

Các cây lá kim có thể được sử dụng trong thí nghiệm theo sáng chế bao gồm, ví dụ, các loài thông như thông loblolly (*Pinus taeda*), thông slash (*Pinus elliotii*), thông ponderosa (*Pinus ponderosa*), thông lodgepole (*Pinus contorta*), và thông Monterey (*Pinus radiata*); Linh sam (*Pseudotsuga menziesii*); cây độc cần (*Tsuga canadensis*); Sitka spruce (*Picea glauca*); cây cù tùng (*Sequoia sempervirens*); các loài linh sam như linh sam bạc (*Abies amabilis*) và linh sam balsam (*Abies balsamea*); và các cây tuyết tùng như tuyết tùng đỏ (*Thuja plicata*) và tuyết tùng vàng Alaska (*Chamaecyparis nootkatensis*). Theo các phương án cụ thể, các loài cây của sáng chế là các loại cây trồng nông nghiệp (ví dụ, ngô, cỏ linh lăng, hướng dương, *Brassica*, đậu tương, bông, cây rum, lạc, lúa miến, lúa mì, kê, thuốc lá,...). Theo các phương án khác, cây ngô hoặc đậu tương đã được sử dụng.

Những ví dụ dưới đây được đưa ra để minh họa, nhưng không giới hạn việc thực hiện sáng chế trong những ví dụ này.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Tạo ra các đột biến có khả năng kháng glyphosat từ AIP0069.

Giới thiệu

Các tác nhân sinh học đang được sử dụng trong nông nghiệp để giảm rủi ro và tăng sản lượng mùa màng. Một đặc tính quan trọng của những tác nhân sinh học này là chúng phải tương thích với các chất hóa học cũng có thể được sử dụng trong trồng trọt quy mô thương mại. Glyphosat là một loại thuốc diệt cỏ hóa học chiếm tới khoảng 25% thị trường thuốc diệt cỏ toàn cầu và được sử dụng khoảng 200 triệu pao mỗi năm. Loại thuốc diệt cỏ này ngăn cản hoạt động của enzym tổng hợp 5-enolpyruvylshikimat-3-phosphat (EPSPS) xúc tác cho một bước trong quá trình sinh tổng hợp axit amin aromatic trong các cây trồng và nhiều loại vi khuẩn. Theo cách này, glyphosat làm giảm khả năng sống sót của các sinh vật gồm bất kỳ tác nhân kiểm soát sinh học nào phụ thuộc vào EPSPS, và điều này đã được ghi lại để cải biến quần xã vi sinh vật trong thực vật. Báo cáo này mô tả việc đưa thành công khả năng dung hòa glyphosat vào chủng *Pseudomonas fluorescens*, một chủng đã được sử dụng trong kiểm soát sinh học đối với một vài nguồn gây bệnh cho thực vật quan trọng từ nấm, gồm *Pythium* và *Rhizoctonia*,

các tác nhân gây bệnh trong tổ hợp bệnh “chết rạp cây con” rất nghiêm trọng trong nông nghiệp. Ngoài việc tăng cường tính tương thích với các chất hóa học của tác nhân kiểm soát sinh học này, việc đưa vào đặc tính dung hòa với glyphosat sẽ mang lại thêm nhiều thuận lợi cho việc sản xuất thương mại.

Bên cạnh ví dụ về glyphosat được đưa ra ở đây, các chất hóa học khác sử dụng trong nông nghiệp có thể ngăn chặn sự sinh trưởng của tác nhân kiểm soát sinh học mong đợi hoặc của loài vi khuẩn thúc đẩy sinh trưởng cây trồng. Các ví dụ bao gồm thuốc diệt cỏ glufosinat (chất ức chế tổng hợp glutamin), thuốc diệt cỏ sulfonylure và imidazolinon (các chất ức chế tổng hợp axit amin mạch nhánh) và các chất kháng sinh streptomycin, oxytetracyclin và kasugamycin.

Vật liệu, phương pháp và kết quả

Chủng vi khuẩn kiểm soát sinh học *Pseudomonas fluorescens* AIP0069 được đánh dấu vào các đĩa thạch chứa glyphosat 0 hoặc 5 mM. Môi trường cơ bản gồm 11,3 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3 g KH_2PO_4 , 1 g NH_4Cl , 10 g mononatri glutamat, 31 g mật rỉ đường, 493 mg $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 50 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, và 0,3 g thiamin trong một lít nước khử ion. Khi không có glyphosat, rất nhiều khuẩn lạc có thể nhìn thấy được sau khi ủ qua đêm ở nhiệt độ 25°C . Khi thêm vào glyphosat 5 mM, không nhìn thấy khuẩn lạc nào sau quá trình ủ tương tự, tuy nhiên sau khi ủ thêm vài ngày thì có thể thấy một vài khuẩn lạc xuất hiện. Những khuẩn lạc này được phân lập và sinh trưởng trong môi trường chất lỏng ở các nồng độ glyphosat khác nhau. Một khuẩn lạc phân lập, tên là GlyphR1, có khả năng kháng glyphosat cao hơn mười lần so với chủng bố mẹ là AIP0069 (Fig. 1). Chủng cải tiến này được mong đợi là sẽ có khả năng cạnh tranh cao hơn, và do đó hiệu quả hơn như một chất kiểm soát sinh học, so với AIP0069 hoặc các chủng nhạy với glyphosat tương tự trong các hệ thống nông nghiệp mà glyphosat có trong đất và các cây trồng. Tương tự, glyphosat cũng có thể được sử dụng như một tác nhân chọn lọc trong quá trình sản xuất, tạo chế phẩm và/hoặc lưu trữ chủng này để ngăn ngừa quá trình nhiễm các vi khuẩn khác.

Ví dụ 2: Hoạt tính kiểm soát sinh học của các đột biến kháng glyphosat

Các vi khuẩn đã được tiêm vào 50 ml môi trường nước thịt gồm 11,3 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3 g KH_2PO_4 , 1 g NH_4Cl , 10 g mononatri glutamat, 30 g mật rỉ đường, 493 mg $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 50 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, và 5 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ trong một lít nước khử

ion. Các giống cây được sinh trưởng trong các bình có vách ngăn 250 ml trong một máy ủ lắc ở 28C, 250 vòng/phút trong 2 ngày. Các tế bào được thu lại bằng máy ly tâm ở 3500 xg trong 10 phút. Những tạp chất nổi trên bề mặt nuôi cấy bị loại bỏ và các tế bào được cho lơ lửng trở lại trong nước khử ion vô trùng đến dung tích của các giống cây ban đầu. AIP0323, một đột biến của AIP0069 không có hoạt tính kháng nấm, đã được đưa vào như một tác nhân kiểm soát âm tính.

Hạt lúa nhiễm *Rhizoctonia solani* được tạo ra như mô tả trước đây (K.A. Holmes và D.M. Benson, 1994. *Evaluation of Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* as a biocontrol for *Phytophthora parasitica* on *Catharanthus roseus*. Plant Disease 78:193-199.) Hạt lúa nhiễm bệnh được nghiền nhỏ trong một hỗn hợp và được sàng lọc qua rây #10 (rây có lỗ 2 mm). Hạt đã nghiền nhỏ được trộn vào môi trường nảy mầm ở tỉ lệ 2g trên 1 lít nước.

Các hạt bóng nước được trồng trong môi trường nảy mầm nhiễm bệnh trong các khay có nút cỡ 402, được xử lý với 0,3 ml vi khuẩn được tạo huyền phù lại trong một nút và sinh trưởng trong điều kiện nhà kính tiêu chuẩn. Có hai mẫu cho mỗi thí nghiệm với 20 nút trong một mẫu. Số lượng cây giống con khỏe mạnh được đánh giá sau hai tuần. Dữ liệu ở bảng 1 dưới đây biểu thị các nhóm kháng glyphosat khác nhau AIP0404 và AIP1620 có hoạt tính kháng nấm mạnh, so sánh với chủng gốc ban đầu là AIP0069.

Bảng 1

Kiểu xử lý	% cây giống con khỏe mạnh		
	Mẫu 1	Mẫu 2	Trung bình
Đối chứng không tiêm	90	90	90
Đối chứng có tiêm	15	20	17,5
Có tiêm + AIP0069	75	80	77,5
Có tiêm + AIP0323	10	15	12,5
Có tiêm + AIP0404	75	80	77,5
Có tiêm + AIP1620	80	75	77,5

Chủng kiểm soát sinh học có thể được sử dụng để kiểm soát bệnh đốm ngọn *Fusarium*, bệnh rỉ sắt đậu nành (Asian soybean rust), *Rhizoctonia*, *Botrytis*, *Pythium*, bệnh turf, và những bệnh tương tự.

Ví dụ 3

Các gen mã hóa enzym EPSPS có khả năng dung hòa glyphosat có thể thu được từ các loại vi khuẩn khác nhau (A. Schulz et al, 1985. Differential sensitivity of bacterial 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase to the herbicide glyphosate. FEMS Microbiology Letters, 28:297-301). Đặc biệt, các gen EPSPS từ *Agrobacterium tumefaciens* CP4 (G.F. Barry et al, 1992. Inhibitors of amino acid biosynthesis: Strategies for imparting glyphosate tolerance to crop plants. p. 139–145. In B.K. Singh et al. (e.) Biosynthesis and molecular regulation of amino acids in plants. Am. Soc. Plant Physiologists, Rockville, MD), và *Arthrobacter globiformis* (C.L. Peters et al, 2010, GRG23 và GRG51 genes conferring herbicide resistance. US patent 7,674,958), là đều có tính kháng cao.

Một gen phù hợp được nhân lên bằng kỹ thuật PCR hoặc tổng hợp nhân tạo dùng các kỹ thuật trong tình trạng kỹ thuật đã biết. Khung đọc mở được tạo dòng vào vector plasmid pKK223-3 (Pharmacia) giữa điểm khởi đầu *tacI* và điểm kết thúc phiên mã *rrnB*. Điểm khởi đầu *tacI* biểu thị cơ bản của các gen trong giống *Pseudomonas*. Các chuỗi ADN thuộc bộ gen của chủng AIP0069 được gắn vào mỗi bên của cat-xet trình tự khởi đầu – gen – điểm kết thúc để tái tổ hợp tương ứng trực tiếp vào nhiễm sắc thể AIP0069.

Plasmid thu được được chuyển từ *E. coli* vào *Pseudomonas fluorescens* AIP0069 bằng cách tiếp hợp, một công nghệ được biết rõ trong tình trạng kỹ thuật, và chọn lọc trong môi trường xác định chứa glyphosat 100 mM. Plasmid chứa điểm khởi đầu sao chép *colE1* của loại vật chủ giới hạn và do đó không thể sao chép trong *Pseudomonas*. Các khuẩn lạc kháng glyphosat sẽ thu được khi cat-xet trình tự khởi đầu – gen – trình tự kết thúc được gắn vào nhiễm sắc thể của *Pseudomonas* bằng cách tái tổ hợp tương đồng. Các trao đổi chéo đơn (trong trường hợp toàn bộ plasmid được đưa vào nhiễm sắc thể) được phân biệt với các trao đổi chéo kép (trong trường hợp chỉ có cat-xet mong muốn gồm trình tự khởi đầu – gen – trình tự kết thúc được đưa vào) bằng kỹ thuật PCR, phương pháp thấm tách Southern, hoặc các kỹ thuật khác đã được biết đến trong tình trạng kỹ thuật. Một hiện tượng trao đổi chéo kép đã được chọn lọc để sử dụng.

Ví dụ 4

Giống cấy khởi động AIP1620 được tiêm từ các khuẩn lạc trên các đĩa thạch Luria và được sinh trưởng trong môi trường nước thịt NBY 0,1X (0,8 g bột thịt dinh

đường Difco và 0,5 g bột chiết xuất nấm men trên một lít nước khử ion) và sinh trưởng ở 28°C, 250 vòng/phút. Giống cây được sinh trưởng trong môi trường nước thịt chứa, trong một lít nước khử ion: 11,3 g Na₂HPO₄·7H₂O, 3,0 g KH₂PO₄, 1,0 g NH₄Cl, 10 g mononatri glutamat, 3,0 g mật rỉ đường, 0,49 g MgSO₄·7H₂O, 50 mg ZnSO₄·7H₂O, 5 mg FeSO₄·7H₂O và axit hydrocloric vừa đủ để điều chỉnh độ pH đến khoảng 6,2. Năm mươi ml nước thịt được đưa vào bình nuôi cấy có vách ngăn 250 ml, tiêm 0,5 ml giống cây khởi động và ủ ở 28°C, 250 vòng/phút. Giống cây được tiêm vào ở nhiều thời điểm khác nhau và sau đó được thu hoạch đồng thời với giống cây thu hoạch được từ các lần ủ ở 15, 24, 33, và 43 giờ. Bốn mươi ml mỗi giống cây được thu hoạch bằng ly tâm. Môi trường nước thịt nuôi cấy từng được sử dụng đã bị loại bỏ và các tế bào được cho được tạo huyền phù lại trong nước khử ion ở nồi hấp đến 40 ml thể tích cuối cùng.

Chất chủng có nấm được điều chế bằng phương pháp hạt lúa đã được Holmes và Benson mô tả (K.A. Holmes and D.M. Benson, 1994. Evaluation of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* for biocontrol of *Phytophthora parasitica* on *Catharanthus roseus*. Plant Disease, 78:193-199.). Hạt lúa nhiễm bệnh được nghiền nhỏ trong một hỗn hợp và được sàng lọc qua rây #10. Chất chủng này được trộn vào hỗn hợp nảy mầm siêu mịn Fafard ở tỉ lệ 1,0 g trên 1 lít.

Hỗn hợp nảy mầm đã tiêm được cho vào 392 khay cắm trong nhà kính (Landmark Plastic Corporation, Akron, OH) và một hạt bóng nước được trồng vào mỗi ô. Huyền phù tế bào AIP1620 được sử dụng ở tỉ lệ 0,3 ml trên mỗi tế bào. Các hạt được cho nảy mầm trong điều kiện nhà kính tiêu chuẩn. Có 3 mẫu của mỗi kiểu xử lý với 20 tế bào trên một mẫu. Sau 10 đến 14 ngày, các thí nghiệm được tính điểm bằng cách đếm số lượng các cây con khỏe mạnh trong mỗi kiểu xử lý. Kết quả được tóm tắt trong bảng 2 dưới đây.

Bảng 2. Biểu hiện của các tế bào AIP1620 trong thí nghiệm cho hạt nảy mầm trong nhà kính

Kiểu xử lý	Thời gian nuôi cấy	Số cây con sống sót (trong số 20 cây)	
		Giá trị trung bình	Độ lệch chuẩn
Đối chứng không tiêm	không xác định	15,0	0,0
Đối chứng có tiêm	không xác định	2,7	1,2
AIP1620	15 giờ	6,3	1,2
AIP1620	24 giờ	13,3	4,6
AIP1620	33 giờ	15,0	0,0

AIP1620	44 giờ	14,7	2,5
---------	--------	------	-----

Ví dụ 5

Các thí nghiệm trong nhà kính với tế bào AIP1620 được thực hiện trong vòng 10 tháng. Với mỗi thí nghiệm, giống cây AIP1620 được sinh trưởng, thu hoạch và cho được tạo huyền phù lại trong nước khử ion ở nồi hấp như được mô tả trong ví dụ 4 trong thời gian nuôi cấy khoảng 24 giờ. Các thí nghiệm này mầm trong nhà kính cũng được thực hiện theo mô tả trong ví dụ 4, nhưng tỉ lệ chất chủng *R. solani* khác nhau từ 0,25 đến 1,0 g hạt lúa được nghiền nhỏ trên một lít hỗn hợp nảy mầm, tùy thuộc vào thí nghiệm. Kết quả thu được từ 17 thí nghiệm được nêu trong bảng 3 dưới đây và minh họa sự biểu hiện thống nhất của AIP1620 trong kiểm soát bệnh chết rạp cây con.

Bảng 3. Biểu hiện của các tế bào AIP1620 trong các thí nghiệm cho hạt nảy mầm trong nhà kính

Thí nghiệm	Số cây con sống sót (trong số 20 cây)					
	Đôi chứng không tiêm		Đôi chứng được tiêm		Được tiêm và có AIP1620	
	Trung bình	SD	Trung bình	SD	Trung bình	SD
1	17,0	1,0	1,3	0,6	11,3	2,5
2	17,3	2,5	9,0	1,0	17,3	2,1
3	14,0	0,0	2,0	1,0	16,7	2,3
4	12,3	1,5	1,7	1,5	13,3	3,1
5	18,4	1,1	3,8	1,8	16,8	1,3
6	16,4	1,7	2,6	2,1	13,6	2,5
7	16,6	1,1	2,8	1,3	15,8	1,3
8	19,7	0,6	3,0	1,0	17,3	0,6
9	19,0	1,0	3,7	1,5	15,7	1,2
10	16,3	0,6	1,7	2,1	15,7	0,6
11	18,5	0,7	2,0	0,0	14,5	0,7
12	18,0	1,0	3,0	3,0	16,3	0,6
13	18,8	1,9	3,8	2,1	17,0	0,8
14	17,0	0,0	3,5	0,7	15,5	0,7
15	18,6	1,1	4,8	1,3	14,8	2,8
16	19,5	0,6	3,5	2,5	18,5	1,5
17	18,0	0,0	1,0	1,7	15,3	0,6

Ví dụ 6

Năm mươi gam hỗn hợp nhão của tế bào AIP1620 được trộn với 50 g bột đất sét atapungit Min-U-Gel 400 hoặc Min-U-Gel 200 (Active Minerals International, LLC, Sparks, MD) được làm khô tới mức hoạt tính của nước thấp hơn 0,3. Một phần của mỗi

chế phẩm được giữ ở 4°C và phần khác được giữ ở 22°C. Khả năng sống sót của những chế phẩm này được kiểm tra tại nhiều thời điểm khác nhau bằng cách làm loãng và kết quả được nêu trong bảng 4 dưới đây. Sau 21 ngày cất giữ, các mẫu từng được giữ ở 4°C được kiểm tra trong thí nghiệm cho hạt nảy mầm trong nhà kính và thấy có hoạt tính kháng nấm chống lại *Rhizoctonia solani*.

Bảng 4: Sự tồn tại của các tế bào AIP1620 trong chế phẩm khi giữ ở nhiệt độ 4°C hoặc 22°C

Chế phẩm	Các đơn vị hình thành khuẩn lạc trên 1 gam AIP1620 sau khi bảo quản trong thời gian		
	2 tuần	4 tuần	20 tuần
Min-U-Gel 400 giữ ở 22°C	$5,4 \times 10^7$	$2,0 \times 10^6$	$< 2,0 \times 10^4$
Min-U-Gel 400 giữ ở 4°C	$1,3 \times 10^8$	$3,5 \times 10^8$	Không kiểm tra
Min-U-Gel 200 giữ ở 22°C	$8,2 \times 10^8$	$3,7 \times 10^8$	$7,2 \times 10^5$
Min-U-Gel 200 giữ ở 4°C	$1,8 \times 10^{10}$	$9,0 \times 10^9$	Không kiểm tra

Ví dụ 7

Một trăm gam hỗn hợp nhão của tế bào AIP1620 được trộn với 20 g canxi silicat tổng hợp (MicroCel E, Imerys Filtration Minerals, Lompoc, CA) sử dụng máy chế biến thực phẩm. Nguyên liệu thu được chứa $2,7 \times 10^{10}$ đơn vị hình thành khuẩn lạc trên 1 gam (CFU/g) AIP1620, như được xác định bằng cách pha loãng. Nguyên liệu này được làm khô ở 40°C tới mức hoạt tính của nước thấp hơn 0,30 ở thời điểm chứa $1,4 \times 10^9$ CFU/g AIP1620. Chế phẩm dạng bột khô được bảo quản trong các túi nhỏ có hút chân không ở 22°C. Sau 85 ngày, bột chứa $1,1 \times 10^6$ CFU/g AIP1620 và có hoạt tính kháng nấm với *Rhizoctonia solani* như được xác định qua thí nghiệm cho hạt nảy mầm trong nhà kính.

Ví dụ 8

Một trăm gam hỗn hợp nhão của tế bào AIP1620 được trộn với 5g glyxerol và 20 g canxi silicat tổng hợp sử dụng máy chế biến thực phẩm. Nguyên liệu thu được chứa $5,7 \times 10^{11}$ CFU/g AIP1620, như được xác định bằng cách pha loãng. Nguyên liệu này đã được làm khô ở 40°C tới mức hoạt tính của nước thấp hơn 0,30 ở thời điểm chứa $3,1 \times 10^9$ CFU/g AIP1620. Chế phẩm dạng bột khô được bảo quản trong các túi nhỏ có hút chân không ở 22°C. Sau 61 ngày, bột chứa $6,2 \times 10^8$ CFU/g AIP1620 và có hoạt tính kháng nấm với *Rhizoctonia solani* như được xác định qua thí nghiệm cho hạt nảy mầm trong nhà kính.

Ví dụ 9

Một trăm gam hỗn hợp nhão của tế bào AIP1620 được trộn với 5 g đường trehalosa và 20 g canxi silicat tổng hợp sử dụng một máy chế biến thực phẩm. Nguyên liệu thu được chứa $5,7 \times 10^{11}$ CFU/g AIP1620, như được xác định bằng cách pha loãng. Nguyên liệu này đã được làm khô ở 40°C tới mức hoạt tính của nước thấp hơn 0,30 ở thời điểm chứa $4,0 \times 10^8$ CFU/g AIP1620. Chế phẩm dạng bột khô được bảo quản trong các túi nhỏ có hút chân không ở 22°C . Sau 54 ngày, bột chứa $2,7 \times 10^7$ CFU/g AIP1620.

Ví dụ 10

Bốn gam gồm xanthan được cho phân tán vào 4 g dầu đậu nành. Hỗn hợp thu được kết hợp với 100 g hỗn hợp nhão của tế bào AIP1620 và cho đặc lại trong khoảng 5 phút ở nhiệt độ phòng. Hỗn hợp đặc này được pha trộn vào 20g canxi silicat tổng hợp sử dụng máy chế biến thực phẩm. Nguyên liệu thu được chứa $9,4 \times 10^{11}$ CFU/g AIP1620 và được chia thành hai phần 50 g. Một phần được làm khô ở 40°C tới mức hoạt tính của nước thấp hơn 0,30 ở thời điểm chứa $7,0 \times 10^8$ CFU/g AIP1620.

Phần còn lại được làm khô với gel silica ở nhiệt độ phòng tới mức hoạt tính của nước $<0,10$ ở thời điểm chứa $1,18 \times 10^{10}$ CFU/g AIP1620.

Ví dụ 11

Năm chế phẩm khác nhau được điều chế đặc biệt như mô tả trong ví dụ 4, trên đây, sử dụng các tá dược và tỉ lệ như được nêu trong bảng 5, dưới đây. Những chế phẩm này được làm khô ở 40°C tới mức hoạt tính của nước nhỏ hơn 0,30 và được giữ ở 4°C .

Chất chủng bao gồm nấm được điều chế bằng phương pháp hạt lúa đã được Holmes và Benson mô tả (K.A. Holmes and D.M. Benson, 1994. Evaluation of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* for biocontrol of *Phytophthora parasitica* on *Catharanthus roseus*. Plant Disease, 78:193-199.). Hạt lúa nhiễm bệnh được nghiền nhỏ trong một hỗn hợp và được sàng lọc qua rây #10. Chất chủng này được trộn vào hỗn hợp nảy mầm siêu mịn Fafard ở tỉ lệ 0,25 g trên 1 lít.

Hỗn hợp đã tiêm được phân chia ra và AIP1620 trong chế phẩm được bổ sung vào ở tỉ lệ 5 g trên một lít. Hạt bóng nước được trồng vào các hỗn hợp được tiêm và xử lý. Các hạt này được nảy mầm trong điều kiện nhà kính tiêu chuẩn. Sau 10 ngày, các thí

nghiệm được tính điểm bằng cách đếm số lượng các cây con sống sót trong mỗi kiểu xử lý. Các kết quả được tóm tắt trong bảng 6 dưới đây.

Bảng 5. Thành phần của các chế phẩm

Chế phẩm	Hỗn hợp nhão của tế bào AIP1620	Tá được	Hoạt tính của nước cuối cùng
A	50 g	50 g bột đất sét atapungit Minugel 400	0,29
B	50 g	50 g bột đất sét atapungit Minugel 200	0,28
C	50 g	50g bột đất sét atapungit Agsorb 325 RVM	0,24
D	100 g	15 g silic oxit ưa nước Sipernat 22S	0,26
E	100 g	15 g silic oxit Aerosil 200F	0,29

Bảng 6. Biểu hiện của AIP1620 trong chế phẩm trong thí nghiệm cho hạt nảy mầm trong nhà kính

Xử lý	Thời gian bảo quản	Cây con sống sót (trong số 20 cây)	
		Giá trị trung bình	Độ lệch chuẩn
Đối chứng không tiêm	không xác định	19,7	0,6
Đối chứng được tiêm	không xác định	3,0	1,0
Chế phẩm A	45 ngày	12,7	4,9
Chế phẩm B	45 ngày	9,0	6,2
Chế phẩm C	45 ngày	17,3	1,2
Chế phẩm D	45 ngày	17,3	0,6
Chế phẩm F	45 ngày	11,7	2,1

Ví dụ 12

Một số chế phẩm đã được điều chế như mô tả trong ví dụ 4 đến 8, trên đây, ở các thời điểm khác nhau. Thành phần của các chế phẩm khác nhau được chỉ ra trong bảng 7, dưới đây. Sau khi làm khô đến mức hoạt tính nước bằng 0,30 hoặc thấp hơn, các nguyên liệu chế phẩm được giữ trong túi nhỏ có hút chân không và giữ ở nhiệt độ 22°C.

Chất chủng bao gồm nấm được điều chế bằng phương pháp hạt lúa đã được Holmes và Benson mô tả (K.A. Holmes and D.M. Benson, 1994. Evaluation of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* for biocontrol of *Phytophthora parasitica* on *Catharanthus roseus*. Plant Disease, 78:193-199.). Hạt lúa nhiễm bệnh được nghiền nhỏ trong một hỗn hợp và được sàng lọc qua rây #10. Chất chủng này được trộn vào hỗn hợp nảy mầm siêu mịn Fafard ở tỉ lệ 0,25 g trên 1 lít.

Hỗn hợp đã tiêm được phân chia ra và AIP1620 trong chế phẩm được bổ sung vào ở tỉ lệ 5 g trên một lít. Vào cùng ngày, một mẫu phụ của mỗi chế phẩm đã được pha loãng để xác định CFU/g AIP1620. Hạt bóng nước được trồng vào các hỗn hợp được tiêm và xử lý. Các hạt này được nảy mầm trong điều kiện khí nhà kính tiêu chuẩn. Sau 10 đến 14 ngày, các thí nghiệm được tính điểm bằng cách đếm số lượng các cây con khỏe mạnh trong mỗi kiểu xử lý. Các kết quả được tóm tắt trong bảng 8 dưới đây.

Bảng 7. Thành phần của chế phẩm

Chế phẩm	Hỗn hợp nhão của tế bào AIP1620	Chất phụ gia	Tá được	Phương pháp làm khô
F	100 g	Không	20 g canxi silicat	Lò 40°C
G	100 g	5 g glyxerol	20 g canxi silicat	Lò 40°C
H	100 g	Không	50 g MinuGel 200	Lò 40°C
I	100 g	4 g gồm xanthan, 4 g dầu đậu nành	20 g canxi silicat	Nhiệt độ phòng, gel silica
J	100 g	4 g gồm xanthan, 4 g dầu đậu nành	20 g canxi silicat	Lò 40°C
K	100 g	4 g gồm xanthan, 4 g dầu ôliu	20 g canxi silicat	Lò 40°C

Bảng 8. Biểu hiện của AIP1620 trong chế phẩm trong thí nghiệm cho hạt nảy mầm trong nhà kính

Xử lý	Thời gian bảo quản	CFU AIP1620 trên gam	Cây con sống sót (trong số 20 cây)	
			Giá trị trung bình	Độ lệch chuẩn
Đối chứng không được tiêm	không xác định		18,3	0,6
Đối chứng được tiêm	không xác định		2,3	3,2
Chế phẩm F	12 ngày	$5,2 \times 10^6$	5,7	2,5
Chế phẩm G	12 ngày	$8,3 \times 10^6$	10,3	3,2
Chế phẩm F	18 ngày	$8,0 \times 10^5$	16,7	1,5
Chế phẩm G	18 ngày	$3,4 \times 10^9$	16,7	1,1
Chế phẩm H	25 ngày	$5,7 \times 10^9$	4,7	0,7
Chế phẩm I	39 ngày	$7,7 \times 10^9$	16,7	1,5
Chế phẩm J	39 ngày	$1,3 \times 10^7$	8,0	1,7
Chế phẩm K	39 ngày	$3,6 \times 10^8$	5,3	1,5

Các kết quả này cho thấy rằng AIP1620 trong chế phẩm duy trì khả năng sống sót và hoạt tính, tức là khả năng bảo vệ cây giống con chống lại bệnh chết rạp cây con.

Ví dụ 13

Năm mươi gam hỗn hợp nhão của tế bào AIP1620 được trộn với 50 g bột đất sét atapungit Min-U-Gel 400 hoặc Min-U-Gel 200 (Active Minerals International, LLC, Sparks, MD) được làm khô tới mức hoạt tính nước thấp hơn 0,2, và giữ ở 22°C. Khả năng sống sót của những chế phẩm này được kiểm tra ở nhiều thời điểm khác nhau bằng cách pha loãng và các kết quả được chỉ ra trong bảng 9 dưới đây. Sau 21 ngày, cả hai chế phẩm được kiểm tra trong thí nghiệm cho hạt nảy mầm ở nhà kính và thấy có hoạt tính kháng nấm với *Rhizoctonia solani*.

Bảng 9

Chế phẩm	Đơn vị hình thành khuẩn lạc trên 1 gam AIP1620 sau khi giữ ở 22°C trong thời gian		
	14 ngày	30 ngày	141 ngày
A: Min-U-Gel 400	$1,3 \times 10^6$	$3,5 \times 10^6$	$< 2,0 \times 10^4$
B: Min-U-Gel 200	$1,8 \times 10^8$	$9,0 \times 10^7$	$7,2 \times 10^5$

Ví dụ 14

Các thí nghiệm trong nhà kính được thực hiện để minh họa hiệu lực của AIP1620 trong việc kiểm soát *Botrytis cinerea*.

Giống cây khởi động AIP1620 được tiêm từ các khuẩn lạc trên các đĩa thạch Luria và được sinh trưởng trong môi trường nước thịt 0,1X NBY (0,8 g bột thịt dinh dưỡng Difco và 0,5 g bột chiết xuất nấm men trên một lít nước khử ion) và sinh trưởng ở 28°C, 250 vòng/phút. Các giống cây thu được sinh trưởng trong môi trường nước thịt chứa, trên một lít nước khử ion: 11,3 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3,0 g KH_2PO_4 , 1,0 g NH_4Cl , 10 g mononatri glutamat, 3,0 g mật rỉ đường, 0,49 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 50 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ và axit hydrocloric vừa đủ để điều chỉnh pH đến mức xấp xỉ 6,2. Năm mươi ml môi trường nước thịt được đưa vào bình nuôi cấy có vách ngăn 250 ml, được tiêm vào 0,5 ml giống cây khởi động và ủ ở 28°C, 250 vòng/phút. Các giống cây được tiêm ở các thời điểm khác nhau và sau đó được thu hoạch đồng thời với các giống cây thu hoạch ở các thời điểm ủ 15, 24, 33 và 43 giờ. Bốn mươi ml giống cây được thu hoạch bằng ly tâm. Môi trường nước thịt nuôi cấy từng được sử dụng đã bị loại bỏ và các tế bào được cho được tạo huyền phù lại trong nước khử ion ở nồi hấp đến 40 ml thể tích cuối cùng.

Botrytis cinerea được sinh trưởng trong môi trường nước thịt có đường dextroza khoai tây trong 1 đến 2 tuần mà không lắ. Lóp sợi nấm thu được bị loại bỏ ra khỏi môi trường nước thịt và làm cho đồng nhất trong nước khử ion ở nồi hấp để tạo thành chất chủng dạng lỏng.

Dâu tây trồng theo phương pháp hữu cơ được mua từ chợ địa phương. Những quả sạch được chọn lọc và ngâm vào chất chủng chứa *B. cinerea* trong 2 đến 3 giây, sau đó để khô trong 60 phút trước khi xử lý. Xử lý AIP1620 được áp dụng bằng cách ngâm quả được tiêm vào huyền phù tế bào trong thời gian từ 2 đến 3 giây. Quả sau đó được đưa vào các thùng chứa bằng nhựa với khăn giấy ẩm để duy trì độ ẩm và giữ ở nhiệt độ phòng trong 72 đến 84 giờ. Có 14 mẫu (dạng quả mọng) trong mỗi kiểu xử lý. Mỗi loại quả mọng được ước lượng tỉ lệ theo thang đánh giá mức độ nguy hại nhìn thấy được gồm 0 = không gây hại, 1 = 25%, 2 = 50% nguy hại, 3 = 75% nguy hại, và 4 = 100% (tức là, độ bao phủ hoàn toàn của nấm trên quả mọng). Các kết quả được tóm tắt trong bảng 10 dưới đây.

Bảng 10. Kiểm soát sau thu hoạch với bệnh Rêu Xám trên cây dâu tây bằng các tế bào AIP1620

Xử lý	Mức độ nguy hại nhìn thấy được
Đối chứng không tiêm	3,1
Đối chứng được tiêm	3,3
Tiêm bổ sung AIP1620	0,7

Ví dụ 15

Các thí nghiệm trong nhà kính được thực hiện để minh họa tính hiệu quả của AIP1620 trong việc kiểm soát bệnh chết rạp cây con gây ra bởi một loại nguồn gây bệnh cây là mốc nước *Pythium aphanadermatum*.

Giống cây khởi động AIP1620 được tiêm từ các khuẩn lạc trên các đĩa thạch Luria và được sinh trưởng trong môi trường nước thịt 0,1X NBY (0,8 g bột thịt dinh dưỡng Difco và 0,5 g bột chiết xuất nấm men trên một lít nước khử ion) và sinh trưởng ở 28°C, 250 vòng/phút. Giống cây được sinh trưởng trong môi trường nước thịt chứa, trong một lít nước khử ion: 11,3 g Na₂HPO₄·7H₂O, 3,0 g KH₂PO₄, 1,0 g NH₄Cl, 10 g mononatri glutamat, 3,0 g mật rỉ đường, 0,49 g MgSO₄·7H₂O, 50 mg ZnSO₄·7H₂O, 5 mg FeSO₄·7H₂O và axit hydrocloric vừa đủ để điều chỉnh độ pH đến khoảng 6,2. Năm mươi ml môi trường nước thịt được đưa vào bình nuôi cấy có vách ngăn 250 ml, tiêm 0,5 ml

giống cây khởi động và ủ ở 28°C, 250 vòng/phút. Giống cây được tiêm vào ở nhiều thời điểm khác nhau và sau đó được thu hoạch đồng thời với giống cây thu hoạch được với các lần ủ ở 15, 24, 33, và 43 giờ. Bốn mươi ml mỗi giống cây được thu hoạch bằng ly tâm. Môi trường nước thịt từng được sử dụng đã bị loại bỏ và các tế bào được cho được tạo huyền phù lại trong nước khử ion ở nồng độ đến 40 ml thể tích cuối cùng.

Chất chủng *P. aphanadermatum* được điều chế bằng phương pháp hạt lúa đã được Holmes và Benson mô tả (K.A. Holmes and D.M. Benson, 1994. Evaluation of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* for biocontrol of *Phytophthora parasitica* on *Catharanthus roseus*. Plant Disease, 78:193-199.). Hạt lúa nhiễm bệnh được nghiền nhỏ trong một hỗn hợp và được sàng lọc qua rây #10. Chất chủng này được trộn vào hỗn hợp nảy mầm siêu mịn Fafard ở tỉ lệ 6,0 g trên 1 lít. (thí nghiệm 1 – 4) hoặc 7,0 g trên một lít (thí nghiệm 5).

Hỗn hợp nảy mầm đã tiêm được cho vào 392 khay cắm trong nhà kính (Landmark Plastic Corporation, Akron, OH) và một hạt bóng nước được trồng vào mỗi ô. Huyền phù tế bào AIP1620 được sử dụng ở tỉ lệ 0,3 ml trên mỗi tế bào. Các hạt được cho nảy mầm trong điều kiện nhà kính tiêu chuẩn. Có 2 hoặc 3 mẫu của mỗi kiểu xử lý với 20 tế bào trên một mẫu. Sau 7 đến 17 ngày, các thí nghiệm được tính điểm bằng cách đếm số lượng các cây con khỏe mạnh trong mỗi kiểu xử lý. Kết quả được tóm tắt trong bảng 11 dưới đây.

Bảng 11. Kiểm soát bệnh chết rạp cây con *Pythium* bằng các tế bào AIP1620 trong thí nghiệm cho hạt nảy mầm trong nhà kính.

Các giá trị có độ lệch chuẩn +/- trung bình.

Kiểu xử lý	Cây con sống sót (trong số 20 cây)				
	Thí nghiệm 1	Thí nghiệm 2	Thí nghiệm 3	Thí nghiệm 4	Thí nghiệm 5
Đối chứng không tiêm	18,0± 1,4	18,5± 0,7	17,5± 0,7	16,5± 0,7	17,3± 0,0
Đối chứng được tiêm	12,0± 0,0	10,5± 0,7	9,0± 1,4	8,5± 0,7	10,7± 0,7
Tiêm bổ sung AIP1620	17,0± 1,4	15,5± 2,1	13,5± 2,1	12,5± 0,7	16,3± 0,7

Ví dụ 16. Kiểm soát bệnh rỉ sắt bằng AIP1620

Các tế bào AIP1620 được tạo ra như mô tả trong các ví dụ trước. *Phakopsora*

pachyrhizi được sinh trưởng trên các cây đậu nành dễ bị tổn thương và bào tử rỉ được thu hoạch bằng cách hút chân không từ các lá bị nhiễm bệnh mà các nốt mụn mới nhú lên rõ ràng (Twizeyimana, M., and Hartman, G. L. 2010. Culturing *Phakopsora pachyrhizi* on detached leaves and urediniospore survival at different temperatures and relative humidities. *Plant Disease* 94:1453-1460).

Các cây đậu nành Williams 82 được sinh trưởng trong các khoang sinh trưởng thực vật sử dụng các kỹ thuật đã biết trong tình trạng kỹ thuật. Khi các cây ở giai đoạn V3, ba lá chết đầu tiên mở rộng hoàn toàn được phun các tế bào AIP1620 dạng huyền phù, thuốc diệt nấm hóa học chuẩn, hoặc nước khử ion (đối chứng được tiêm). Một ngày sau các lá được tiêm với huyền phù bào tử rỉ *P.pachyrhizi* (1×10^5 /ml). Cả chất để chủng và chủng/thuốc diệt nấm đều được sử dụng nhờ máy phun gắn với máy nén khí. Các cây được duy trì trong khoang sinh trưởng ở độ ẩm tương đối 95% với chu kỳ hàng ngày gồm 12 giờ sáng và 12 giờ tối tương ứng ở 21°C và 23°C. Sau hai tuần, mức độ nghiêm trọng của bệnh được đánh giá bằng cách đếm số lượng bào tử hình thành trong phạm vi vòng có đường kính 1 cm được chọn lọc ngẫu nhiên trên các lá được tiêm. Có 3 mẫu (cây) cho mỗi kiểu xử lý và 3 bào tử được đếm trong mỗi mẫu. Các kết quả được nêu trong bảng 12, dưới đây và chứng minh rằng việc cấp AIP1620 đã kiểm soát một cách hiệu quả bệnh rỉ sắt gây ra bởi *Phakopsora pachyrhizi*.

Bảng 12

Kiểu xử lý	Bào tử đang hình thành trong vòng có đường kính 1cm
Đối chứng được tiêm	22,1
Hóa chất chuẩn	0,0
AIP1620	1,8

Ví dụ 17. AIP1620 tương thích với thuốc diệt nấm thương mại

Khả năng sống sót của AIP1620 được đánh giá sau khi trộn với thuốc diệt nấm thương mại chủng 3, mỗi chủng chứa một thành phần hoạt tính khác nhau (bảng 13). Nồng độ thuốc diệt nấm đã được chọn lọc để tái tạo những chủng này trong hỗn hợp điển hình cho ứng dụng ngoài tự nhiên.

AIP1620 được sinh trưởng trong 3 mL môi trường LB trong ống 10 mL trong vòng 24 giờ ở 28°C, 250 vòng/phút. Các khối tế bào được thu hoạch bằng cách ly tâm và cho lơ lửng trong 3 mL dH₂O. Chín trăm microlit huyền phù tế bào được trộn với 100 microlit 10X thuốc diệt nấm và ủ ở 28°C trong 5 phút hoặc 120 phút.

Bảng 13. Thuốc diệt nấm hóa học trong chế phẩm

Nhãn hiệu	Thành phần hoạt tính	Nồng độ sản phẩm trên 100 mL)
Quadris	Azoxystrobin	936 μ L
Spectator Ultra 1,3	Propiconazol	1,87 mL
Subdue Maxx	Mefenoxam	78,1 μ L

Sau khi ủ với thuốc diệt nấm, các tế bào được thu hoạch bằng ly tâm như được mô tả trên đây, cho được tạo huyền phù lại trong nước khử ion. Các phần mẫu đại diện được pha loãng ra từng kỳ trong nước khử ion, đặt vào thạch LB và ủ ở 28°C trong 2 ngày dùng các kỹ thuật đã biết trong tình trạng kỹ thuật. Khuẩn lạc được đếm và số lượng đơn vị hình thành khuẩn lạc trên ml (CFU/ml) trong các dung dịch ban đầu đã đếm được. Dữ liệu được chỉ ra trong bảng 14 dưới đây và minh họa rằng khả năng sống sót của AIP1620 không bị ảnh hưởng nghiêm trọng từ việc trộn với những loại thuốc diệt nấm chế phẩm này.

Bảng 14. Độ sống sót của các tế bào AIP1620 sau khi ủ với các chế phẩm thuộc nấm trong hỗn hợp mô hình

Thuốc diệt nấm	CFU/mL sau thời gian ủ	
	5 phút	120 phút
Nước (đối chứng)	$3,70 \times 10^9$	$8,67 \times 10^8$
Quadris	$4,50 \times 10^9$	$4,87 \times 10^9$
Spectator	$2,33 \times 10^9$	$2,17 \times 10^9$
Subdue	$4,67 \times 10^9$	$3,63 \times 10^9$

Ví dụ 18. Đánh giá hoạt tính bảo vệ của hỗn hợp AIP1620 và thuốc diệt nấm chống lại bệnh rỉ sắt gây ra bởi *Phakopsora pachyrhizi*.

Vi khuẩn được tiêm vào 50 ml môi trường nước thịt chứa 11,3 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3 g KH_2PO_4 , 1 g NH_4Cl , 10 g mononatri glutamat, 30 g mật rỉ đường, 493 mg $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 50 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, and 5 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ trên một lít nước khử ion. Các giống cây được sinh trưởng trong các bình có vách ngăn 250 ml trong máy ủ lắc ở 28°C, 250 vòng/phút trong 2 ngày. Các tế bào thu được bằng ly tâm ở 3500 xg trong 10 phút. Những chất nổi trên mặt bị loại bỏ và các tế bào được cho được tạo huyền phù lại trong nước khử ion vô trùng đến thể tích của các giống cây ban đầu. AIP0323, đột biến của AIP0069 không có hoạt tính kháng nấm, được đưa vào làm đối chứng âm.

Bào tử rỉ của *Phakopsora pachyrhizi* được thu hoạch bằng cách hút chân không từ các lá nhiễm nấm có các đốm mụn mới nhú lên rõ ràng. Các bào tử được tạo huyền

phù lại trong nước ở nồng độ $10^5/\text{mL}$ và tiêm vào các lá đậu nành đã được tách rời như sol khí sử dụng bình phun sơn dùng các phương pháp đã biết trong tình trạng kỹ thuật (Twizeyimana, M., and Hartman, G. L. 2010. Culturing *Phakopsora pachyrhizi* on detached leaves and urediniospore survival at different temperatures and relative humidities. *Plant Disease* 94:1453-1460).

Các hỗn hợp của các tế bào AIP1620 đã được tạo huyền phù lại trong nước và các thành phần hoạt tính kháng nấm được điều chế với các tỉ lệ khác nhau gồm 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 hoặc 10^{10} AIP1620 tế bào/mL, được trộn với thành phần hoạt tính kháng nấm ở tỉ lệ sử dụng ngoài tự nhiên bình thường 1/10X, 1/3X, 1/2X, hoặc 1X, được tính toán bằng cách chuyển đổi tỉ lệ ngoài tự nhiên từ nhân được công bố thành g/mL, dựa vào giả định về nồng độ xịt trên một hecta hoặc mẫu Anh.

Các lá đậu nành đã tiêm được xử lý tác nhân kiểm soát sinh học ở các độ chuẩn trên đây, và với thuốc diệt nấm ở các tỉ lệ trên đây, cũng như với các hỗn hợp của tác nhân kiểm soát sinh học và thuốc diệt nấm trong các hỗn hợp khác nhau ở các độ chuẩn và tỉ lệ đặc trưng trên đây. Thêm vào đó, một số lá được tách rời được tiêm vào đã không được xử lý, hoặc xử lý với AIP0323 như các đối chứng. Ít nhất 3 lá nguyên vẹn (hoặc mảnh lá) đã được sử dụng cho mỗi kiểu xử lý tác nhân kiểm soát sinh học, hóa học, hoặc cả hai. Các lá tách rời được ủ trong độ ẩm cao ở các khoang sinh trưởng trong chu kỳ 12 giờ sáng, $21^\circ\text{C}/12$ giờ tối, 23°C . Sau thời gian từ 10 đến 14 ngày, các lá được quan sát và tính điểm theo số lượng bào tử quan sát được trên 1 cm^2 .

Phương trình Colby được sử dụng để xác định các hiệu quả kháng nấm mong đợi từ các hỗn hợp. (Xem Colby, S. R., Calculation of the synergistic and antagonistic response of herbicides combinations. *Weeds* 1967, 15, 20-22, toàn bộ nội dung đã được viện dẫn).

Phương trình dưới đây được sử dụng để tính toán hoạt tính mong đợi của các hỗn hợp chứa các thành phần hoạt tính, A và B:

$$\text{Hoạt tính mong đợi} = A + B - (A \times B / 100)$$

A = hiệu lực quan sát được của thành phần hoạt tính A ở cùng nồng độ khi được sử dụng trong hỗn hợp;

B= hiệu lực quan sát được của thành phần hoạt tính A ở cùng nồng độ khi được sử dụng trong hỗn hợp.

Các tương tác hiệp đồng đại diện, bao gồm các tỉ lệ áp dụng được sử dụng và dẫn tới việc kiểm soát bệnh được quan sát và ghi lại như sau:

% DC=Phần trăm kiểm soát bệnh

% DC Obs=Phần trăm kiểm soát bệnh quan sát được

% DC Exp=Phần trăm kiểm soát bệnh mong đợi

Hệ số hiệp đồng=% DC Obs/% DC Exp

Ví dụ 19. Chọn lọc quần thể chủng kiểm soát sinh học *Pseudomonas fluorescens* AIP000069 có tính kháng glufosinat diệt cỏ.

50 microlit giống cấy AIP000069, được sinh trưởng trong 0,5X LB trong 24 giờ ở 28°C, được trải trên các đĩa chứa môi trường M63 Bổ sung với 0 hoặc 100 mM glufosinat. Môi trường M63 bổ sung chứa 13,6 g KH₂PO₄, 9,92g C₆H₁₂O₆, 2g (NH₄)₂SO₄, 5,5 mg CaCl₂, 0,278mg FeSO₄·7H₂O, và 10,16 mg MgCl₂·6H₂O trên một lít nước khử ion. Khi không có glufosinat nhiều khuẩn lạc quan sát được sau khi ủ các đĩa trong 2 ngày ở 28°C. Khi có glufosinat 100 mM không có khuẩn lạc nào quan sát được sau khi được ủ tương tự, tuy nhiên, sau khi ủ thêm vài ngày thì một khuẩn lạc đơn đã phát triển. Khuẩn lạc này đánh dấu để phân lập vào đĩa thạch M63 chứa glufosinat 100 mM. Khuẩn lạc được phân lập được đặt tên là AIP050999. Sinh trưởng của AIP050999 được so sánh với chủng bố mẹ, AIP000069, và phiên bản kháng glyphosat của chủng AIP001620. Các kết quả được tóm tắt trong bảng 15 dưới đây.

Bảng 15. Sinh trưởng của các chủng trong môi trường thạch M63 Bổ sung với sự có mặt hoặc không của glufosinat

Chủng	Glufosinat 0 mM	Glufosinat 100 mM
AIP000069	+++	-
AIP001620	+++	-
AIP050999	+++	+++

Tất cả các tài liệu công bố và đơn xin cấp patent được đề cập đến trong bản mô tả này được trình bày ở mức độ người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật liên quan tới sáng chế có thể hiểu được. Tất cả các công bố đơn và đơn xin cấp patent được kết hợp vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn ở phạm vi giống như mỗi tài liệu hoặc đơn xin cấp patent độc lập được chỉ ra một cách cụ thể và riêng lẻ để viện dẫn.

Mặc dù sáng chế đề cập ở trên đã được mô tả ở một mức độ cụ thể nhất định bằng các minh họa và ví dụ nhằm mục đích làm rõ sự hiểu biết, rõ ràng là những thay đổi và cải biến chắc chắn có thể được thực hành trong phạm vi yêu cầu bảo hộ kèm theo.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp phần chứa lượng hữu hiệu của (a) tác nhân kiểm soát sinh học bao gồm chủng sinh vật có số nộ lưu là NRRL No. B-50897, (b) chất diệt nấm; trong đó hợp phần này kiểm soát nguồn gây bệnh cho thực vật.
2. Hợp phần theo điểm 1, chứa lượng hữu hiệu của (a) tác nhân kiểm soát sinh học bao gồm chủng sinh vật có số nộ lưu là NRRL No. B-50897 và (b) prothioconazol, azoxystrobin, fluopicolit, clorothalonil, hoặc fosetyl; trong đó hợp phần này kiểm soát nguồn gây bệnh cho thực vật.
3. Hợp phần theo điểm 1 hoặc 2, trong đó nguồn gây bệnh là nguồn gây bệnh rỉ sắt ở đậu nành.
4. Hợp phần theo điểm 1 hoặc 2, trong đó nguồn nấm gây bệnh cho thực vật bao gồm nấm *Rhizoctonia*, nấm *Pythium*, nấm *Botrytis* hoặc nấm *Phakopsora*.
5. Hợp phần theo điểm 1, bao gồm tác nhân kiểm soát sinh học chứa NRRL No. B-50897 và (b) fenhexamit, flutriafol, difenoconazol, tebuconazol, tetraconazol, pyraclostrobin, trifloxystrobin, propiconazol, fluoxastrobin, flutolanil, metconazol, hoặc metrafenon; trong đó hợp phần này kiểm soát nguồn gây bệnh cho thực vật.
6. Chế phẩm chứa tác nhân kiểm soát sinh học NRRL No. B-50897, trong đó chế phẩm được điều chế dưới dạng bột ướt, bụi, hạt, dịch lỏng chứa nước, hoặc dịch lỏng gốc dầu, và tác nhân kiểm soát sinh học này kiểm soát nguồn gây bệnh cho thực vật.
7. Hạt được phủ chứa hạt và lớp phủ trên hạt, trong đó lớp phủ chứa tác nhân kiểm soát sinh học NRRL No. B-50897.
8. Hạt được phủ theo điểm 7, trong đó lớp phủ này cũng chứa ít nhất một thuốc trừ sâu, thuốc diệt cỏ, thuốc diệt nấm, hoặc thuốc trừ sâu.
9. Hạt được phủ theo điểm 7, trong đó lớp phủ cũng chứa prothioconazol, azoxystrobin, fluopicolit, clorothalonil, hoặc fosetyl.
10. Hạt được phủ theo điểm 7, trong đó lớp phủ cũng chứa fenhexamid, flutriafol, difenoconazol, tebuconazol, tetraconazol, pyraclostrobin, trifloxystrobin, propiconazol, fluoxastrobin, flutolanil, metconazol, hoặc metrafenon.

11. Hạt được phủ theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 7 đến 10, trong đó hạt được phủ là một lá mầm hoặc hai lá mầm.
12. Phương pháp trồng cây bao gồm việc trồng trong khu vực trồng trọt hạt được phủ theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 7 đến 11.
13. Phương pháp trồng cây bao gồm việc áp dụng cho cây, khu vực trồng trọt, hoặc hạt với lượng hữu hiệu của tác nhân kiểm soát sinh học chứa NRRL No. B-50897, trong đó lượng hữu hiệu kiểm soát nấm thực vật.
14. Phương pháp theo điểm 12 hoặc 13, trong đó thực vật này là một lá mầm hoặc hai lá mầm.
15. Phương pháp theo điểm 13, trong đó phương pháp cũng bao gồm việc áp dụng lượng hữu hiệu thuốc trừ sâu, thuốc diệt cỏ, thuốc diệt nấm, hoặc thuốc trừ sâu.
16. Phương pháp theo điểm 15, trong đó tác nhân kiểm soát sinh học và thuốc trừ sâu, thuốc diệt cỏ, thuốc diệt nấm, hoặc thuốc trừ sâu được áp dụng đồng thời.
17. Phương pháp theo điểm 15, trong đó tác nhân kiểm soát sinh học và thuốc trừ sâu, thuốc diệt cỏ, thuốc diệt nấm, hoặc thuốc trừ sâu được áp dụng liên tục.
18. Phương pháp theo điểm 15, trong đó thuốc diệt nấm bao gồm prothioconazol, azoxystrobin, fluopicolil, clorothalonil, hoặc fosetyl.
19. Phương pháp theo điểm 15, trong đó thuốc diệt nấm bao gồm fenhexamid, flutriafol, difenoconazol, tebuconazol, tetraconazol, pyraclostrobin, trifloxystrobin, propiconazol, fluoxastrobin, flutolanil, metconazol, hoặc metrafenon.

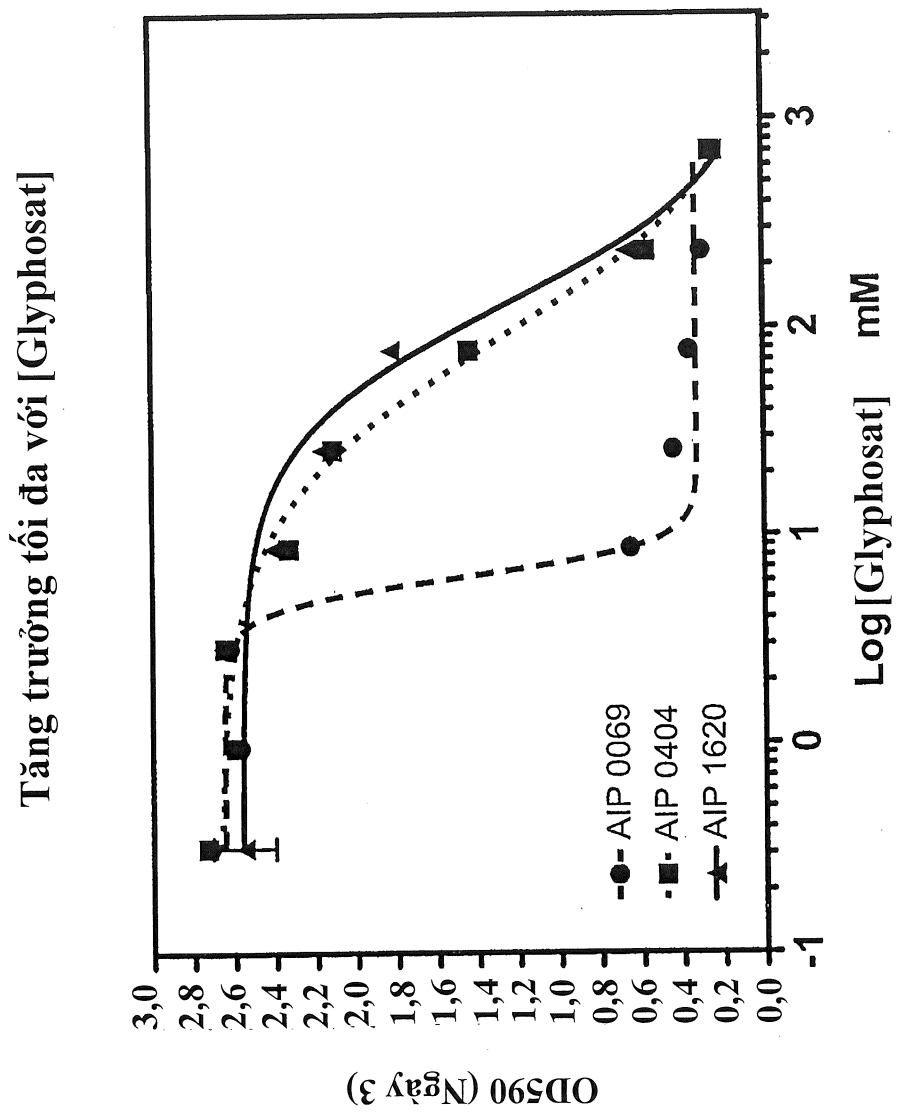


Fig. 1