(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) **1-0041670**

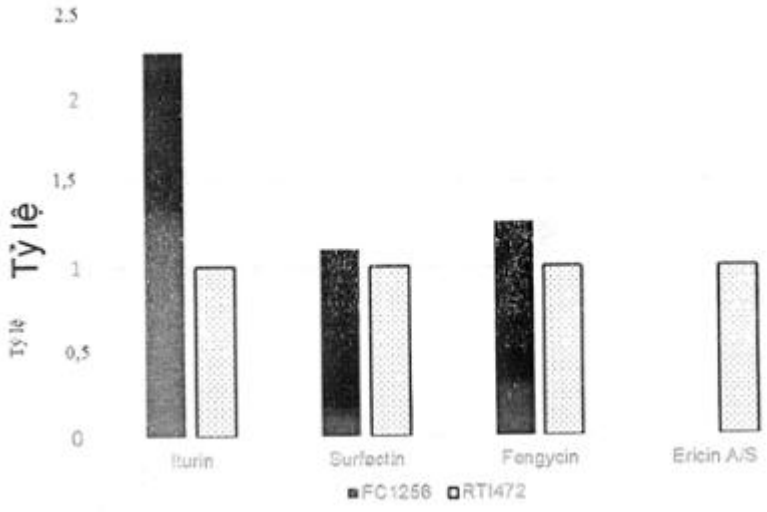
(51)[2020.01] **A01N 63/00**; C12N 1/00; C12R 1/07; A01P 3/00

(13) **B**

(21) 1-2021-01657
(22) 27/09/2019
(86) PCT/US2019/053424 27/09/2019
(87) WO2020/069297 02/04/2020
(30) 62/738,653 28/09/2018 US; 18202293.9 24/10/2018 EP
(45) 25/11/2024 440
(43) 25/02/2022 407
(73) FMC CORPORATION (US)
2929 Walnut Street, Philadelphia, PA 19104, United States of America
(72) VAN DER LELIE, Daniel (US); TAGHAVI, Safiyh (US); DEVINE, Anthony Andrew (US); LEE, Jaeheon (TW).
(74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

(54) CHẾ PHẨM CHỨA BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS FCC1256 VÀ PHƯƠNG PHÁP KIỂM SOÁT SINH VẬT GÂY BỆNH THỰC VẬT

(57) Sáng chế đề xuất phương pháp kiểm soát (các) sinh vật gây bệnh thực vật, ví dụ nấm và vi khuẩn gây bệnh, trên thực vật, trong đó chế phẩm này chứa *Bacillus amyloliquefaciens* FCC1256 được lưu giữ với số ATCC PTA-122162 được dùng cho thực vật, đặc biệt là lên phần nằm trên mặt đất của thực vật. Chế phẩm này có thể chứa iturin và fengycin với tỷ lệ khối lượng tương đối nằm trong khoảng từ 1,3:1,0 đến 3,0:1,0. Sáng chế đề xuất chế phẩm nông nghiệp chứa chủng mới này, chất mang, chất hoạt động bề mặt và tùy chọn là chất đệm, và chế phẩm đậm đặc tương ứng.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề xuất chế phẩm đề cập đến các chế phẩm chứa chủng *Bacillus amyloliquefaciens* FCC1256 được phân lập để ứng dụng cho thực vật hoặc đất xung quanh thực vật để điều trị các bệnh thực vật do sinh vật gây bệnh thực vật gây ra.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Nấm gây bệnh thực vật (phytopathogen), bao gồm nhưng không giới hạn ở *Botrytis* spp., *Fusarium* spp., *Rhizoctonia* spp. là một loài gây hại thực vật có thể gây thiệt hại kinh tế nghiêm trọng trong các ngành nông nghiệp và trồng trọt. Các tác nhân hóa học có thể được sử dụng để kiểm soát các nấm gây bệnh thực vật, nhưng việc sử dụng các tác nhân hóa học gặp phải những bất lợi bao gồm chi phí cao, kém hiệu quả, xuất hiện các chủng nấm kháng thuốc và các tác động môi trường không mong muốn. Ngoài ra, các biện pháp xử lý hóa học như vậy có xu hướng bừa bãi và có thể ảnh hưởng xấu đến vi khuẩn có ích, nấm và động vật chân đốt ngoài mầm bệnh thực vật mà các phương pháp xử lý nhắm tới. Một loài gây hại thực vật thứ hai là vi khuẩn gây bệnh thực vật, bao gồm nhưng không giới hạn ở *Erwinia* spp., *Xanthomonas* spp., và *Pseudomonas* spp. gây thiệt hại kinh tế nghiêm trọng trong các ngành nông nghiệp và làm vườn. Tương tự như nấm gây bệnh, việc sử dụng hóa chất để xử lý các vi khuẩn gây bệnh này gặp phải những bất lợi. Do đó, việc sử dụng vi sinh vật làm thuốc trừ sâu sinh học để kiểm soát nấm và vi khuẩn gây bệnh trên thực vật là mong muốn và có nhu cầu cao để cải thiện tính bền vững của nông nghiệp

Một số thành viên của loài *Bacillus* đã được báo cáo là chủng kiểm soát sinh học, và một số chủng đã được ứng dụng trong các sản phẩm thương mại. Ví dụ, các chủng hiện đang được sử dụng trong các sản phẩm kiểm soát sinh học thương mại bao gồm: *Bacillus velezensis* QST713, được sử dụng làm thành phần hoạt chất của Serenade®, do Bayer CropScience sản xuất, và *Bacillus amyloliquefaciens* D747, được sử dụng làm thành phần hoạt chất trong Double Nickel do Certis sản xuất. Ngoài ra, các chủng *Bacillus* hiện đang được sử dụng trong các sản phẩm kích thích sinh học

thương mại bao gồm: *Bacillus velezensis* FZB42 được sử dụng làm thành phần hoạt tính trong RhizoVital® 42, do ABiTEP GmbH sản xuất.

Hơn nữa, WO 2016/109396 A1 bộc lộ *Bacillus amyloliquefaciens* RTI472 để sử dụng trong việc mang lại lợi ích cho sự phát triển của thực vật và xử lý các bệnh thực vật như nhiễm nấm và vi khuẩn.

Ngoài ra, WO 2016/109395 A1 bộc lộ *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301 để sử dụng trong việc mang lại lợi ích cho sự phát triển của cây trồng và xử lý các bệnh thực vật như nhiễm nấm và vi khuẩn.

Ngoài ra, WO 2015/023662 A1 bộc lộ, tức là, một chủng *Bacillus amyloliquefaciens* để ức chế sự phát triển và/hoặc hoạt động của nấm gây bệnh thực vật.

Tuy nhiên, cho dù sẵn có một số loại thuốc trừ sâu sinh học, trong lĩnh vực kỹ thuật này vẫn cần phải cải thiện tính đặc hiệu đối với các bệnh mục tiêu và các tác nhân gây bệnh tương ứng của chúng. Hơn nữa, cần phải cải thiện hiệu quả và hiệu lực của thuốc trừ sâu sinh học có thể bị ảnh hưởng bởi các yếu tố sinh học và phi sinh học khác nhau. Sáng chế đề xuất nhu cầu trong lĩnh vực kỹ thuật này bằng cách cung cấp các chế phẩm vi sinh vật mới và phương pháp để sử dụng chúng nhằm kiểm soát sự phát triển của sinh vật gây bệnh thực vật và do đó làm giảm bớt hoặc ngăn ngừa bệnh thực vật.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất việc phân lập chủng *Bacillus amyloliquefaciens* mới từ đất trồng cây dâu tây. Chủng *Bacillus amyloliquefaciens* FCC1256 đã được lưu giữ tại ATCC theo Số truy cập sáng chế số PTA-122162, so sánh với Ví dụ 1.

Theo ít nhất một phương án, sáng chế đề xuất các phương pháp kiểm soát (các) sinh vật gây bệnh thực vật trên thực vật, các phương pháp này bao gồm bước dùng chế phẩm chứa *Bacillus amyloliquefaciens* FCC1256 cho thực vật, cho một phần của thực vật và/hoặc vào vị trí mà tại đó thực vật hoặc phần thực vật phát triển hoặc sẽ được trồng.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp kiểm soát (các) nấm gây bệnh thực vật và/hoặc các vi khuẩn gây bệnh thực vật trên thực vật, phương pháp bao gồm bước dùng chế phẩm chứa *Bacillus amyloliquefaciens* FCC1256 cho phần nằm trên mặt đất của thực vật.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất chế phẩm nông nghiệp chứa a) *Bacillus amyloliquefaciens* FCC1256, và b) môi trường pha chế thích hợp cho nông nghiệp, ví dụ chứa chất mang thích hợp, chất hoạt động bề mặt, và tuỳ chọn là chất đệm. Chế phẩm nông nghiệp là đặc biệt hữu ích để ứng dụng để bảo vệ thực vật chống lại sinh vật gây bệnh hoặc xử lý nhiễm trùng sinh vật gây bệnh ở thực vật mẫn cảm, ví dụ theo các phương pháp này được mô tả trong bản mô tả này. Theo một số phương án, chế phẩm này chứa iturin và fengycin với tỷ lệ tương đối nằm trong khoảng từ 1,3:1,0 đến 3,0:1,0, như nằm trong khoảng từ 1,5:1,0 đến 2,8:1,0, tương ứng.

Theo các phương án tiếp theo, sáng chế đề xuất chế phẩm đậm đặc cho chế phẩm nông nghiệp, chế phẩm đậm đặc bao gồm: a) *Bacillus amyloliquefaciens* FCC1256, và b) môi trường pha chế thích hợp cho nông nghiệp, ví dụ môi trường chứa chất mang thích hợp, chất hoạt động bề mặt, và tuỳ chọn là chất đệm.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Do đó, sau khi mô tả các đối tượng được bộc lộ theo sáng chế bằng các thuật ngữ chung, bây giờ sẽ tham khảo các Hình vẽ kèm theo như được mô tả như sau:

Fig 1 thể hiện kết quả của thử nghiệm Đĩa lá cây hạt tiêu tách rời so sánh hoạt động của *Bacillus amyloliquefaciens* FCC1256 với các đối chứng không được xử lý cũng như sản phẩm thương mại Serenade® Optimum.

Fig 2 thể hiện tỷ lệ điển hình của iturin, Suractin, Fengycin và ericin A/S từ các mẫu cấy FCC1256 và RTI472 tương ứng.

Mô tả chi tiết sáng chế

Như được sử dụng bản mô tả này, các ký hiệu "*Bacillus amyloliquefaciens* FCC1256" và "FCC1256" đề cập đến nuôi cấy thuần khiết về mặt sinh học của chủng vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* FCC1256 được lưu giữ với Số truy cập patent PTA-122162, so sánh Ví dụ 1. Trong các phương pháp, chế phẩm, v.v. được mô tả bản mô tả này, chủng vi khuẩn có thể có mặt ở một hoặc nhiều dạng kết hợp: như bào tử phân lập của vết vi khuẩn, dưới dạng môi trường lên men chứa các bào tử của chủng vi khuẩn, như một sản phẩm của quá trình lên men đã chế biến bao gồm các bào tử của chùng vi khuẩn, như là các tế bào sinh dưỡng được phân lập của chủng vi khuẩn, như một môi trường lên men bao gồm các tế bào sinh dưỡng của chủng vi khuẩn, và như một sản phẩm lên men đã chế biến bao gồm các tế bào sinh dưỡng của chủng vi khuẩn.

Thuật ngữ "nuôi cấy thuần khiết về mặt sinh học" dùng để chỉ nuôi cấy phòng thí nghiệm hoặc lên men có chứa một loài sinh vật đơn lẻ, tức là trong trường hợp

hiện tại hầu như chỉ có một chủng vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* FCC1256. Điều này có nghĩa là bất kỳ vi sinh vật nào khác có liên quan đến môi trường lên men của môi trường nuôi cấy tinh khiết đều được coi là chất nhiễm bẩn, chỉ tồn tại với số lượng không đáng kể và không gây ra những thay đổi có thể đo lường được đối với các thành phần vật lý và hóa học của canh trường nuôi cấy.

Thuật ngữ "sản phẩm lên men đã qua xử lý" dùng để chỉ dạng đã qua xử lý sau đó của chúng, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn trong số phần cô đặc của canh trường lên men, chất rắn của canh trường lên men đã được lọc, phần cô đặc của canh trường lên men hoàn nguyên, và canh trường lên men đã được làm khô (ví dụ làm đông khô hoặc sấy phun).

Theo một số phương án, FCC1256 có mặt dưới dạng canh trường lên men chứa các bào tử của FCC1256 hoặc sản phẩm lên men đã qua xử lý chứa các bào tử của FCC1256, như phần cô đặc của canh trường lên men hoặc canh trường lên men đã sấy phun.

Thực tế là việc nuôi cấy *Bacillus amyloliquefaciens* FCC1256 thuần khiết về mặt sinh học được bao gồm trong các chế phẩm và phương pháp bộc lộ trong bản mô tả này không loại trừ rằng các chế phẩm và phương pháp tương ứng có thể bao gồm các chủng vi sinh vật đã xác định khác, đặc biệt là các chủng vi sinh vật thuần khiết về mặt sinh học khác.

Các thuật ngữ "a," "an" và "the" trong bản mô tả tiếng Anh đề cập đến "một hoặc nhiều" khi được sử dụng trong đơn này, bao gồm cả các yêu cầu bảo hộ. Vì vậy, ví dụ, tham chiếu đến "một thực vật" bao gồm nhiều loài thực vật, trừ khi ngữ cảnh rõ ràng là ngược lại.

Trong suốt bản mô tả này và các yêu cầu bảo hộ, các thuật ngữ "chứa", "có chứa" được sử dụng theo nghĩa không loại trừ, trừ khi ngữ cảnh yêu cầu khác đi. Tương tự như vậy, thuật ngữ "bao gồm" và các biến thể ngữ pháp của nó nhằm mục đích không giới hạn, sao cho việc đọc lại các mục trong danh sách không loại trừ các mục tương tự khác có thể được thay thế hoặc thêm vào các mục được liệt kê.

Cho mục đích của bản mô tả này và các yêu cầu bảo hộ, thuật ngữ "khoảng" khi được sử dụng liên quan đến một hoặc nhiều số hoặc phạm vi số, nên được hiểu là để chỉ tất cả các số như vậy, bao gồm tất cả các số trong một phạm vi và sửa đổi phạm vi đó bằng cách mở rộng ranh giới trên và dưới các giá trị số được đặt ra. Việc đọc thuộc phạm vi số theo điểm cuối bao gồm tất cả các số, ví dụ, toàn bộ số nguyên, bao gồm các phân số của chúng, được cộng gộp trong phạm vi đó (ví dụ, việc đọc lại từ 1 đến 5 bao gồm 1, 2, 3, 4 và 5, cũng như các phân số của chúng, ví dụ: 1,5, 2,25, 3,75, 4,1, và những số tương tự) và bất kỳ phạm vi nào trong phạm vi đó.

Với mục đích của đặc điểm kỹ thuật và công bố này, thuật ngữ "chất chuyển hóa" và "chất chuyển hóa" được sử dụng liên quan đến các hợp chất có hoạt tính kháng khuẩn được sản xuất bởi *Bacillus amyloliquefaciens* FCC1256, như iturin, Fengycin và Suractin. Các chất chuyển hóa được gọi là "iturin", "Fengycin" và "Suractin", mỗi chất đại diện cho một loại cấu trúc phân tử khá giống nhau. Cho đến nay, tham chiếu đó được thực hiện với lượng hoặc tỷ lệ bao gồm iturin, Fengycin và Surfactin, lượng/tỷ lệ này được dùng để liên quan đến tổng lượng (khối lượng) của chất chuyển hóa tương ứng. Lượng này có thể được xác định bằng phân tích HPLC sử dụng các tiêu chuẩn thương mại phù hợp.

Các phương pháp theo sáng chế

Theo một số phương án của sáng chế, các chế phẩm và phương pháp được đề xuất bao gồm *Bacillus amyloliquefaciens* FCC1256 để ứng dụng cho thực vật nhằm tạo ra biện pháp bảo vệ chống lại sự lây nhiễm sinh vật gây bệnh ở thực vật mẫn cảm. Bằng các phương pháp theo sáng chế, việc kiểm soát sinh vật gây bệnh thực vật có thể được phản ánh trong việc giảm sự lây nhiễm mầm bệnh, cải thiện khả năng chống lại sinh vật gây bệnh thực vật (ví dụ: khả năng chống lại các cuộc tấn công tiếp theo), cải thiện sức sống của cây con, cải thiện sự phát triển của rễ, cải thiện sự phát triển của cây, cải thiện sức khỏe thực vật, tăng năng suất, cải thiện ngoại hình hoặc sự kết hợp của chúng.

Do đó, sáng chế, ngoài các đối tượng khác, đề xuất phương pháp kiểm soát (các) sinh vật gây bệnh thực vật trên thực vật, phương pháp này bao gồm bước dùng chế phẩm bao gồm *Bacillus amyloliquefaciens* FCC1256 cho thực vật, cho một bộ phận của thực vật và/hoặc vào vị trí mà tại đó thực vật hoặc phần thực vật phát triển hoặc sẽ được trồng.

Như được sử dụng ở bản mô tả này, thuật ngữ "sinh vật gây bệnh thực vật" dùng để chỉ các sinh vật gây bệnh truyền nhiễm cho thực vật, bao gồm nấm, vi khuẩn, virut, viroit, sinh vật giống virut, oomycete (tảo), phytoplasma, động vật nguyên sinh, tuyến trùng và thực vật ký sinh. Theo một số phương án, sinh vật gây bệnh thực vật được chọn từ nấm và vi khuẩn. Trong một phương án biến đổi, sinh vật gây bệnh thực vật được chọn từ nấm gây bệnh thực vật. Trong một phương án biến đổi khác, sinh vật gây bệnh thực vật được chọn từ vi khuẩn gây bệnh thực vật.

Theo một phương án khác, phương pháp bao gồm việc dùng chế phẩm chứa *Bacillus amyloliquefaciens* FCC1256 cho thực vật, một phần của thực vật và/hoặc vào vị trí mà tại đó thực vật hoặc phần thực vật phát triển hoặc sẽ được trồng để kiểm soát sinh vật gây bệnh thực vật được chọn từ nhóm bao gồm nấm gỉ sắt, *Botrytis* spp. (như

Botrytis cinerea, *Botrytis squamosal*), *Erwinia* spp. (như *Erwinia carotovora*, *Erwinia amylovora*), *Dickeya* spp. (như *Dickeya dadantii*, *Dickeya solani*), *Agrobacterium* spp. (như *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium tumefaciens*), *Xanthomonas* spp. (như *Xanthomonas axonopodis*, *Xanthomonas campestris* pv. *carotae*, *Xanthomonas pruni*, *Xanthomonas arboricola*, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*), *Xylella* spp. (như *Xylella fastidiosa*), *Candidatus* spp. (như *Candidatus liberibacter*), *Fusarium* spp. (như *Fusarium colmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium oxysporum f.* sp. *cubense*, *Fusarium oxysporum f.* sp. *lycopersici*, *Fusarium virguliforme*), *Sclerotinia* spp. (như *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotinia minor*, *Sclerotinia homeocarpa*), *Cercospora/Cercosporidium* spp., *Uncinula* spp. (như *Uncinula necator*), *Podosphaera* spp. (như *Podosphaera leucotricha*, *Podosphaera clandestine*), *Phomopsis* spp. (như *Phomopsis viticola*), *Alternaria* spp. (như *Alternaria tenuissima*, *Alternaria porri*, *Alternaria alternate*, *Alternaria solani*, *Alternaria tenuis*), *Pseudomonas* spp. (như *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato*), *Phytophthora* spp. (như *Phytophthora infestans*, *Phytophthora parasitica*, *Phytophthora sojae*, *Phytophthora capsici*, *Phytophthora cinnamon*, *Phytophthora fragariae*, *Phytophthora ramorum*, *Phytophthora palmivara*, *Phytophthora nicotianae*), *Phakopsora* spp. (như *Phakopsora pachyrhizi*, *Phakopsora meibomiae*), *Aspergillus* spp. (như *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*), *Uromyces* spp. (như *Uromyces appendiculatusi)*, *Cladosporium* spp. (như *Cladosporium herbarum*), *Rhizopus* spp. (như *Rhizopus arrhizus*), *Rhizoctonia* spp. (như *Rhizoctonia solani*, *Rhizoctonia zeae*, *Rhizoctonia oryzae*, *Rhizoctonia caritae*, *Rhizoctonia cerealis*, *Rhizoctonia crocorum*, *Rhizoctonia fragariae*, *Rhizoctonia ramicola*, *Rhizoctonia rubi*, *Rhizoctonia leguminicola*), *Macrophomina* spp. (như *Macrophomina phaseolina*), *Magnaporthe* spp. (như *Magnaporthe grisea*, *Magnaporthe oryzae*), *Mycosphaerella* spp. (như *Mycosphaerella graminocola*, *Mycosphaerella fijiensis* (Black sigatoga), *Mycosphaerella pomi*, *Mycosphaerella citri*), *Monilinia* spp. (như *Monilinia fruticola*, *Monilinia vacciniicorymbosi*, *Monilinia laxa*), *Colletotrichum* spp. (như *Colletotrichum gloeosporiodes*, *Colletotrichum acutatum*, *Colletotrichum Candidum*), *Diaporthe* (spp. *Diaporthe citri*), *Corynespora* spp. (như *Corynespora Cassiicola*), *Gymnosporangium* spp. (như *Gymnosporangium juniperi-virginianae*), *Schizothyrium* spp. (như *Schizothyrium pomi*), *Gloeodes* spp. (như *Gloeodes pomigena*), *Botryosphaeria* spp. (như *Botryosphaeria dothidea*), *Neofabraea* spp., *Wilsonomyces* spp. (như *Wilsonomyces carpophilus*), *Sphaerotheca* spp. (như *Sphaerotheca macularis*, *Sphaerotheca pannosa*), *Erysiphe* spp., *Stagonospora* spp. (như *Stagonospora nodorum*), *Pythium*

spp. (như *Pythium ultimum*, *Pythium aphanidermatum*, *Pythium irregularum*, *Pythium ulosum*, *Pythium lutriarium*, *Pythium sylvatium*), *Venturia* spp. (như *Venturia inaequalis*), *Verticillium* spp., *Ustilago* spp. (như *Ustilago nuda*, *Ustilago maydis*, *Ustilago scitaminea*), *Claviceps* spp. (như *Claviceps puprrea*), *Tilletia* spp. (như *Tilletia tritici*, *Tilletia laevis*, *Tilletia horrid*, *Tilletia controversa*), *Phoma* spp. (như *Phoma glycinicola*, *Phoma exigua*, *Phoma lingam*), *Cocliobolus* spp. (như *Cocliobolus sativus*), *Gaeumanomyces* spp. (*Gaeumanomyces gaminis*), *Colleototricum* spp., *Rhychosporium* spp. (như *Rhychosporium secalis*), *Biopolaris* spp., *Helminthosporium* spp. (như *Helminthosporium secalis*, *Helminthosporium maydis*, *Helminthosporium solai*, *Helminthosporium tritici-repentis*), và kết hợp của chúng, bao gồm biến thể phân loài bất kỳ của chúng.

Theo một số phương án, phương pháp là thích hợp để kiểm soát một hoặc nhiều sinh vật gây bệnh thực vật được chọn từ *Botrytis cinerea*, *Botrytis squaomas*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium viguliforme*, *Phytophthora infestans*, *Phytophthora parasitica*, *Phytophthora sojae*, *Phytophthora capsici*, *Phytophthora cinnamon*, *Phytophthora fragariae*, *Phytophthora ramorum*, *Phytophthora palmivara*, *Phytophthora nicotianae*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotinia minor*, *Sclerotinia homeocarpa*, *Aspergillus favus*, *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato*, *Erwinia amylovara*, *Rhizoctonia solani*, *Xanthomonas euvesicatoria*, và kết hợp bất kỳ của chúng, bao gồm biến thể phân loài bất kỳ của chúng.

Theo một số phương án, các phương pháp theo sáng chế sử dụng chế phẩm chứa *Bacillus amyloliquefaciens* FCC1256 để kiểm soát các bệnh do sinh vật gây bệnh thực vật gây ra như Nấm mốc xám (*Botrytis cinerea*) hại cây tiêu, bệnh bạc lá do *Phytophthora* (*Phytophthora capsica*), bệnh thối ngọn cà chua do *Fusarium* (*Fusarium* sp.), bệnh đốm lửa táo (*Erwinia amylovora*), bệnh đốm lá vi khuẩn hại cây cà chua (*Pseudomonas syringae*), bệnh đốm lá cây hồ tiêu (*Xanthomonas euvesicatoria*), bệnh héo rũ đậu tương (*Rhizoctonia solani*).

Như được sử dụng ở đây, cụm từ "kiểm soát (các) sinh vật gây bệnh thực vật" trong ngữ cảnh của các phương pháp và chế phẩm theo sáng chế được dự định để chỉ làm giảm ít nhất 10% sự phát triển của (các) sinh vật gây bệnh thực vật so với các điều kiện tương ứng khi các phương pháp hoặc chế phẩm không được sử dụng, ví dụ theo một số phương án, giảm ít nhất 30%, hoặc giảm ít nhất 50%, hoặc giảm ít nhất 70%, hoặc giảm ít nhất 80%, hoặc giảm ít nhất 90%, hoặc về cơ bản là loại bỏ sự tăng trưởng. Trong trường hợp thứ hai, việc loại bỏ sự phát triển có thể dẫn đến việc loại bỏ trực quan (các) sinh vật gây bệnh thực vật. Ví dụ 3, 5, 6 và 7 trình bày các loại

phương pháp để xác định mức độ kiểm soát các sinh vật gây bệnh thực vật khác nhau bằng cách sử dụng *Bacillus amyloliquefaciens* FCC1256.

Các phương pháp và chế phẩm theo sáng chế rất hữu ích để ngăn ngừa hoặc điều trị các bệnh do mầm bệnh thực vật gây ra ở nhiều loại thực vật bao gồm, nhưng không giới hạn ở, Ngô, Ngô ngọt, Ngô hạt, Ngô ủ chua, Ngô ruộng, Lúa, Lúa mì, Lúa mạch, Cao lương, Măng tây, Blueberry (việt quất), Blackberry (mâm xôi), Raspberry (phúc bồn tử), Loganberry, Huckleberry, Cranberry (nam việt quất), Gooseberry, Elderberry, Currant, Cane berry, Bush berry, Bông cải xanh, Bắp cải, Súp lơ trắng, Cải Brussels, Collards, Cải xoăn, Mustard Greens (cải xanh), Kohlrabi (su hào), Dưa chuột, Dưa đỏ, Dưa gang, Dưa bở, Bí đao, Dưa hấu, Bí ngô, Cà tím, Hành tây, Tỏi, Hành tím, Cam, Bưởi, Chanh, Quýt, Bưởi, Bưởi, Tiêu, Cà chua, Anh đào, Cà chua, Đậu bắp, Nho, Xà lách, Cần tây, Rau bina , Ngò tây, Radicchio, Đậu, Đậu xanh, Đậu hạt, Đậu vỏ, Đậu nành, Đậu khô, Đậu Garbanzo, Đậu Lima, Đậu Hà Lan, Đậu gà, Đậu Hà Lan, Đậu lăng, Cải dầu, Thầu dầu, Dừa, Bông, Hạt lanh, Cây cọ dầu, Ô liu, đậu phộng, hạt cải dầu, cây rum, vừng, hướng dương, đậu tương, táo tây, Crabapple, lê, Quince, May haw, Cà rốt, Khoai tây, Khoai lang, Sắn, Củ cải đường, Gừng, Cải ngựa, Củ cải, Nhân sâm, Củ cải, Mơ, Cherry (anh đào), Nectarine, Đào, Mận, Prune, Dâu tây, Hạnh nhân, Điều, Hồ đào, Óc chó, Filberts, Hạt dẻ, Điều, Beechnut, Butternut, Macadamia, Kiwi, Chuối, (Blue) Agave, Grass, Turf grass, Poinsettia, Hạt dẻ, Sồi, Phong, mía và củ cải đường.

Theo một số phương án, thực vật là đậu tương, đậu, đậu nhanh, lúa mì, bông, ngô, hạt tiêu, cà chua, khoai tây, sắn, nho, dâu tây, chuối, đậu phộng, bí, bí ngô, cà tím và dưa chuột.

Theo các phương án khác, thực vật được chọn từ táo, măng tây, dâu tây, bearberry, Blackberry (mâm xôi), highbush và lowbush blue berry, chokeCherry, nho, cây cơm cháy, quả lý gai, huckleberry, lingonberry, cây bạch quả, dâu tằm, anh đào pin, mâm xôi, Salaberry, Saskatoon berry, hắc mai biển và mâm xôi dại, Blackberry (mâm xôi) hoặc mâm xôi, nho, dâu tây, kiwi mờ, bông cải xanh, bông cải xanh Trung Quốc, bông cải xanh, cải Brussel, bắp cải, súp lơ xanh, bông cải xanh, cải thìa, cải xoăn, su hào, mizuna, mù tạt xanh, cải bó xôi và cải bó xôi rau xanh, hành tây, tỏi, tỏi tây, hẹ và hẹ, cần tây, dưa đỏ, Trung Quốc là bầu, dưa chuột, bầu ăn được, dưa, xạ hương, bí ngô, bí, dưa hấu, cà tím, anh đào xay, đậu bắp, ớt, cà chua và cà chua.

Theo các phương án khác nữa, thực vật được chọn từ hạt tiêu, cây dưa chuột, cây táo, cây măng tây, cây chuối, cây cam quít, cây kiwi, cây dưa, cây đào, cây lê, cây dứa, cây bưởi chùm, cây lựu, cây cần tây, cây hành, cây tỏi, cây nho, cây tỏi tây, cây

hẹ tây, cây hẹ, cây bông cải xanh, cây bắp cải, cây súp lơ, cây bầu bí, cây cà chua, cây khoai tây, cây lúa mì, cây lúa hoặc cây đậu tương.

Theo ít nhất một phương án của các phương pháp của sáng chế, chế phẩm này được dùng cho thực vật, cho một phần của thực vật và/hoặc vào vị trí mà tại đó thực vật hoặc phần thực vật phát triển hoặc sẽ được trồng, ví dụ: tán của cây, vỏ cây, quả của cây, hoa của cây, hạt của cây, rễ của cây, vết cắt của cây, ghép của cây, đất hoặc chất trồng bao quanh cây; đất hoặc môi trường tăng trưởng trước khi gieo hạt của cây vào đất hoặc môi trường sinh trưởng; hoặc đất hoặc môi trường trồng trước khi trồng cây, cắt cây, hoặc ghép cây vào đất hoặc môi trường trồng.

Theo một phương án biến đổi, sáng chế đề xuất phương pháp kiểm soát (các) nấm gây bệnh thực vật và/hoặc các vi khuẩn gây bệnh thực vật trên thực vật, phương pháp bao gồm việc dùng chế phẩm chứa *Bacillus amyloliquefaciens* FCC1256 được lưu giữ với số ATCC PTA-122162 lên phần nằm trên mặt đất của thực vật.

Như được sử dụng ở đây, cụm từ "*đưa [..] vào phần nằm trên mặt đất của thực vật*" và những cụm từ tương tự, đề cập đến việc dùng chế phẩm cho thực vật bằng cách nhắm vào (các) thân, (các) lá, (các) hoa và/hoặc (các) quả của cây. Theo các phương án khác, việc dùng nhằm vào vị trí mà tại đó thực vật hoặc phần thực vật phát triển hoặc sẽ được trồng, ví dụ: đến hệ thống rễ của cây hoặc đất xung quanh hệ thống rễ của cây, hoặc đất mà cây (hoặc các bộ phận của cây) sẽ được trồng; điều này được gọi chung là "*đưa [..] vào phần đất xung quanh thực vật*".

Việc dùng chế phẩm bao gồm *Bacillus amyloliquefaciens* FCC1256 cho thực vật, cho một phần của thực vật và/hoặc vào vị trí mà tại đó thực vật hoặc phần thực vật phát triển hoặc sẽ được trồng có thể được thực hiện bằng bất kỳ phương pháp thông thường nào, ví dụ: bằng cách phun, bằng cách nhỏ giọt, bằng cách dùng bột (ứng dụng bột), bằng cách dùng bọt (ứng dụng bọt), v.v..

Đối với các ứng dụng cho các bộ phận trên mặt đất của thực vật, việc dùng dạng phun hoặc dạng bột có thể đặc biệt thích hợp.

Đối với các ứng dụng cho đất xung quanh cây, phun, bón bằng cách nhỏ giọt, bón bột và phun bọt có thể là thích hợp. Theo một phương pháp biến đổi, bón vào đất xung quanh cây là bón theo rãnh bằng cách nhỏ giọt hoặc phun bọt liên quan đến việc gieo hạt.

Theo một số phương án, sự nhiễm sinh vật gây bệnh có thể do một hoặc sự kết hợp của:

Nấm gỉ sắt hại đậu tương (*Phakopsora pachyrhizi*, *Phakopsora meibomiae*) và thực vật là cây đậu tương;

Nấm mốc xám (*Botrytis cinerea*) và thực vật là nho, dâu tây hoặc hồ tiêu;

Alternaria spp. (ví dụ *Alternaria solani*) và thực vật cây cà chua hoặc cây khoai tây ;

Rỉ đậu (*Uromyces appendiculatus*) và thực vật là cây họ đậu;

Microsphaera diffusa (bệnh phấn trắng cây đậu tương) và thực vật là cây tương;

Mycosphaerella fijiensis (Black sigatoga) hoặc *Fusarium oxysporum f. sp. cubense* (bệnh Panama) và thực vật là cây chuối;

Xanthomonas spp. hoặc *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* và thực vật là cây lúa;

Xanthomonas axonopodis và thực vật là sắn;

Xanthomonas campestris và thực vật là cây cây cà chua;

Bệnh phấn trắng và thực vật là cây thuộc họ bầu bí;

Nấm mốc trắng phương Nam và thực vật là cây lạc;

Đốm lá (*Cercospora/Cercosporidium*) và thực vật là cây lạc;

Fusarium graminearum (Vảy đầu lúa mì) và thực vật là cây lúa mì;

Mycosphaerella graminicola (bệnh đốm *Septoria tritici*) và thực vật là cây lúa mì;

Stagonospora nodorum (bệnh glume blotch và bệnh đốm *Septoria nodorum*), và thực vật là cây lúa mì;

Erwinia amylovora, và thực vật được chọn từ táo, cây lê và cây bưởi chùm khác;

Venturia inaequalis, và thực vật được chọn từ táo, cây lê và các loại cây bưởi chùm; *Sclerotinia sclerotiorum* (mốc trắng) và cây là đậu bìm bịp hoặc khoai tây;

Sclerotinia homeocarpa (đốm đô la) và thực vật bao gồm cỏ sân;

hoặc

Rhizoctonia solani và thực vật được chọn từ cây lúa mì, gạo, cỏ cỏ, đậu tương, ngô, các loại đậu và cây rau.

Trong một biến thể của phương án được đề cập ở trên, (các) sinh vật gây bệnh thực vật được kiểm soát bằng cách dùng chế phẩm lên phần nằm trên mặt đất của thực vật.

Theo các phương án trong bản mô tả này, chế phẩm được sử dụng với lượng hữu hiệu. Thuật ngữ "lượng hữu hiệu" dùng để chỉ một lượng chế phẩm đủ để kiểm soát ít nhất một sinh vật gây bệnh thực vật.

Theo các phương án, chế phẩm này được dùng sao cho tỷ lệ của *Bacillus amyloliquefaciens* FCC1256 nằm trong khoảng từ $4,0x10^9$ CFU/ha đến $4,0x10^{17}$ CFU/ha, như $4,0x10^{10}$ CFU/ha đến $4,0x10^{16}$ CFU/ha. Thông thường, *Bacillus*

amyloliquefaciens FCC1256 được dùng ở dạng bào tử của chúng, chứ không phải tế bào sinh dưỡng.

Theo một số phương án của phương pháp theo sáng chế, chế phẩm này ở dạng lỏng, và *Bacillus amyloliquefaciens* FCC1256 có trong chế phẩm này ở nồng độ từ $1,0x10^6$ CFU/ml đến $1,0x10^{12}$ CFU/ml, như từ $1,0x10^7$ CFU/ml đến $1,0x10^{11}$ CFU/ml.

Theo một phương án khác của phương pháp theo sáng chế, chế phẩm này là ở dạng rắn, và *Bacillus amyloliquefaciens* FCC1256 có trong chế phẩm này ở nồng độ từ $1,0x10^6$ CFU/g đến $1,0x10^{12}$ CFU/g, như từ $1,0x10^7$ CFU/g đến $1,0x10^{11}$ CFU/g.

Theo các phương án trong đó chế phẩm được dùng là ở dạng rắn, chế phẩm này có thể ở dạng chế phẩm được chọn từ bột có thể bám bụi (DP), hạt phân tán trong nước (WG) và bột có thể thấm ướt (WP).

Theo một số phương án, chế phẩm được dùng chứa iturin và Fengycin theo tỷ lệ trọng lượng tương đối nằm trong khoảng từ 1,3:1,0 đến 3,0:1,0, như từ 1,5:1,0 đến 2,8:1,0 và tất cả các tỷ lệ trong phạm vi như vậy.

Bản chất, các phương án và biến thể của chế phẩm chứa *Bacillus amyloliquefaciens* FCC1256 được sử dụng trong phương pháp của sáng chế sẽ được mô tả thêm trong phần sau dưới tiêu đề "*Các chế phẩm nông nghiệp theo sáng chế*".

Chế phẩm nông nghiệp theo sáng chế

Chế phẩm như được mô tả trong bản mô tả này và các phương án của chúng được giải thích thêm trong phần sau đây đặc biệt hữu ích trong phương pháp được mô tả trên đây, nhưng không giới hạn ở ứng dụng đó. Các chế phẩm được mô tả trong tiêu đề này là các chế phẩm sẵn sàng để sử dụng. Theo một số phương án, có thể thuận tiện để chuẩn bị chế phẩm đậm đặc thích hợp để pha loãng trước khi sử dụng để tạo ra chế phẩm nông nghiệp sẵn sàng sử dụng, ví dụ: để giảm chi phí vận chuyển hoặc để kéo dài thời hạn sử dụng, v.v ... Các chế phẩm cô đặc như vậy được mô tả thêm dưới đây với tiêu đề "*Chế phẩm đậm đặc dùng cho chế phẩm nông nghiệp*".

Do đó, sáng chế, ngoài các đối tượng khác, đề cập đến chế phẩm nông nghiệp chứa: a) *Bacillus amyloliquefaciens*, và b) môi trường pha chế thích hợp cho nông nghiệp.

Thuật ngữ "thích hợp cho nông nghiệp" được dự định để môi trường công thức như vậy (nghĩa là không có bất kỳ thành phần hoạt tính nào được cố ý đưa vào) không được có những tác động bất lợi đáng kể đến thực vật hoặc thực vật mà chế phẩm nông nghiệp dự định áp dụng. Theo đó, "môi trường pha chế thích hợp cho nông nghiệp" bao gồm bất kỳ môi trường công thức bất kỳ nào như vậy trong đó *Bacillus amyloliquefaciens* FCC1256 có thể được đưa vào để tạo điều kiện thuận lợi cho việc

vận chuyển một lượng hữu hiệu để bón cho bộ phận thực vật quan tâm và thích hợp cho việc sử dụng nông nghiệp.

Môi trường pha chế có thể bao gồm chất mang lỏng hoặc rắn, cũng như một hoặc nhiều thành phần bổ sung được chọn từ các chất hoạt động bề mặt, chất bảo quản, chất giữ ẩm, chất làm khô, chất chống tạo bọt, chất chống đông, chất phân tán, chất kết dính, chất nhũ hóa, thuốc nhuộm, chất chống tia cực tím, chất chống trôi, chất hỗ trợ lắng đọng dạng phun, chất tạo dòng chảy tự do, chất đệm và chất làm đặc, và sự kết hợp của chúng.

Ví dụ về chất mang lỏng bao gồm nước, dầu động vật và các dẫn xuất, dầu khoáng và các dẫn xuất, dầu thực vật và các dẫn xuất, rượu, polyol, triglyxerit, các polyme tự nhiên và tổng hợp và các dẫn xuất không ion của chúng. Ví dụ về chất mang rắn bao gồm khoáng chất, đất sét, silicas, muối vô cơ và hữu cơ, đường, tinh bột, sáp, vỏ động vật xay, vật liệu thực vật bao gồm sợi, vỏ trấu và bột mì.

Theo các phương án, môi trường pha chế bao gồm chất mang thích hợp và chất hoạt động bề mặt. Trong các biến thể của sáng chế, môi trường công thức còn bao gồm chất đệm.

Theo một số phương án, chế phẩm nông nghiệp chứa iturin và fengycin với tỷ lệ khối lượng tương đối nằm trong khoảng từ 1,3:1,0 đến 3,0:1,0, như từ1,5:1,0 đến 2,8:1,0, bao gồm tất cả các tỷ lệ trong phạm vi như vậy.

Theo một số phương án, chế phẩm này có thể ở dạng chế phẩm được chọn từ huyền phù, huyền phù đậm đặc (SC), hệ phân tán dầu (OD), dạng bọt, bột có thể bám bụi (DP), hạt phân tán trong nước (WG) và bột có thể thấm ướt (WP).

Thông thường, Bacillus amyloliquefaciens FCC1256 được đưa vào các chế phẩm thích hợp ở dạng bào tử của chúng, chứ không phải ở dạng tế bào sinh dưỡng. Ví dụ, các chế phẩm có thể bao gồm một phần của môi trường lên men chứa các bào tử của FCC1256 hoặc sản phẩm lên men đã qua xử lý chứa các bào tử của FCC1256, như phần cô đặc của canh trường lên men hoặc canh trường lên men đã sấy phun.

Theo một số phương án, chế phẩm nông nghiệp ở dạng lỏng, và *Bacillus amyloliquefaciens* FCC1256 có trong chế phẩm này ở nồng độ từ $1,0x10^6$ CFU/ml đến $1,0x10^{12}$ CFU/ml, như từ $1,0x10^7$ CFU/ml đến $1,0x10^{11}$ CFU/ml.

Theo các phương án trong đó chế phẩm nông nghiệp ở dạng lỏng, chế phẩm này có thể ở dạng chế phẩm được chọn từ huyền phù, huyền phù đậm đặc (SC), hệ phân tán dầu (OD) và dạng bọt.

Theo một phương án khác, chế phẩm nông nghiệp là ở dạng rắn, và *Bacillus amyloliquefaciens* FCC1256 có trong chế phẩm này ở nồng độ từ $1,0x10^6$ CFU/g đến $1,0x10^{12}$ CFU/g, như từ $1,0x10^7$ CFU/g đến $1,0x10^{11}$ CFU/g.

Theo các phương án trong đó chế phẩm nông nghiệp là ở dạng rắn, chế phẩm này có thể ở dạng chế phẩm được chọn từ bột có thể bám bụi (DP), hạt phân tán trong nước (WG) và bột có thể thấm ướt (WP).

Trong các phương pháp phân phối FCC1256 kết hợp với thuốc trừ sâu vi sinh, sinh học hoặc hóa học, thuốc diệt nấm, thuốc trừ giun tròn, chất diệt khuẩn hoặc chất điều hòa sinh trưởng thực vật, chế phẩm có thể ở dạng chất lỏng, dạng phân tán dầu, dạng bụi, bột khô ướt, dạng hạt có thể rải hoặc dạng hạt khô dạng ướt.

Theo một số phương án, chế phẩm nông nghiệp, ngoài môi trường pha chế, còn có thể bao gồm một hoặc sự kết hợp của vi sinh vật hoặc thuốc trừ sâu hóa học, thuốc diệt nấm, chất diệt giun tròn, thuốc diệt khuẩn, chất điều hòa sinh trưởng thực vật hoặc chất kích thích tăng trưởng thực vật, ví dụ:

Thuốc trừ sâu: A0) các loại thuốc trừ sâu khác nhau, bao gồm agrigata, al-phosphide, amblyseius, aphelinus, aphidius, aphidoletes, artimisinin, autographa californica NPV, azocyclotin, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis spp. aizawai*, *Bacillus thuringiensis spp. kurstaki*, *Bacillus thuringiensis*, *Beauveria bassiana*, beta-cyfluthrin, bisultap, brofluthrinate, bromophos-e, bromopropylate, capsaicin, cartap, celastrus-extract, chlorbenzuron, chloretoxyfos, chlorfluazuron, cnidiadin, cryolite, cyanophos, cyhalothrin, cyhexatin, cypermethrin, dacnusa, DCIP, điclopropen, dicofol, diglyphus, diglyphus+dacnusa, dimethacarb, emamectin, encarsia, EPN, eretmocerus, etylen-đibromua, eucalyptol, fenazaquin, fenobucarb (BPMC), fenpyroximate, flubrocythrinate, flufenzine, formetanate, formothion, furathiocarb, gama-cyhalothrin, nước tỏi, virut granulosis, harmonia, heliothis armigera NPV, axit inđol-3-ylbutyric, iođometan, sắt, isocarbofos, isofenphos, isofenphos-m, isoprocarb, isothioate, lindane, liuyangmycin, matrine, mephosfolan, metalđehyt, metarhizium-anisopliae, methamidophos, metolcarb (MTMC), mirex, m-isothioxyanat, monosultap, myrothecium verrucaria, naled, neochrysocharis formosa, nicotin, nicotinoids, omethoate, orius, oxymatrine, paecilomyces, parathion-e, pasteuria, pheromones, axit phospho, photorhabdus, phoxim, phytoseiulus, pirimiphos-e, *Plutella xylostella* GV, virut polyhedrosis, dịch chiết polyphenol, kali-oleat, profenofos, prosuler, prothiofos, pyraclofos, pyrethrins, pyridaphenthion, pyrimidifen, pyriproxifen, quillay-extract, quinomethionate, rotenone, saponin, saponozit, natri-fluosilicat, ssulfluramid, lưu huỳnh, tebupirimfos, tefluthrin, temephos, tetradifon, thiofanox, thiometon, transgenics (ví dụ, Cry3Bb1), triazamate, trichoderma, trichogramma, triflumuron, verticillium, vertrine, kappa-bifenthrin, kappa-tefluthrin, dichoromezotiaz, broflanilide, pyraziflumid; A1) nhóm carbamat, bao gồm aldicarb, alanycarb, benfuracarb, carbaryl, carbofuran, carbosulfan, methiocarb, methomyl, oxamyl,

pirimicarb, propoxur và thiodicarb; A2) nhóm phosphat hữu cơ, bao gồm acephate, azinphos-etyl, azinphos-metyl, chlorfenvinphos, chlorpyrifos, chlorpyrifos-metyl, demeton-S-metyl, diazinon, dichlorvos/DDVP, dicrotophos, dimethoate, disulfoton, ethion, fenitrothion, fenthion, isoxathion, malathion, methamidaphos, methidathion, mevinphos, monocrotophos, oxymethoate, oxyđemeton-metyl, parathion, parathion-metyl, phenthoate, phorate, phosalone, phosmet, phosphamidon, pirimiphos-metyl, quinalphos, terbufos, tetrachlorvinphos, triazophos và trichlorfon; A3) nhóm các hợp chất xyclođien organoclo như endosulfan; A4) nhóm các fiprole, bao gồm ethiprole, fipronil, pyrafluprole và pyriprole; A5) nhóm các neonicotinoid, bao gồm axetamiprit, clothianidin, dinotefuran, imidacloprid, nitenpyram, thiacloprid và thiamethoxam; A6) nhóm các spinosyn như spinosad và spinetoram; A7) các chất hoạt hóa kênh clorua từ nhóm mectin, bao gồm abamectin, emamectin benzoat, ivermectin, lepimectin và milbemectin; A8) các chất bắt chước hormon vị thành niên như hydroprene, kinoprene, methoprene, fenoxycarb và pyriproxyfen; A9) các thuốc chẹn ăn homopteran chọn lọc như pymetrozine, flonicamid và pyrifluquinazon; A10) chất ức chế sự phát triển của bọ ve như clofentezine, hexythiazox và etoxazol; A11) chất ức chế tổng hợp ATP của ty thể như diafenthiuron, fenbutatin oxit và propargite; chất tách đôi của quá trình phosphoryl hóa oxy hóa như chlorfenapyr; A12) thuốc chẹn kênh thụ thể nicotinic axetylcholin như bensultap, cartap hyđroclorua, thiocyclam và thiosultap natri; A13) chất ức chế sinh tổng hợp chitin loại 0 từ nhóm benzoylurea, bao gồm bistrifluron, diflubenzuron, flufenoxuron, hexaflumuron, lufenuron, novaluron và teflubenzuron; A14) chất ức chế sinh tổng hợp chitin typ 1 như buprofezin; A15) các chất phá vỡ lột xác như cyromazine; A16) chất chủ vận thụ thể ecdyson như methoxyfenozide, tebufenozide, halofenozide và chromafenozide; A17) chất chủ vận thụ thể octopamin như amitraz; A18) chất ức chế vận chuyển điện tử phức hợp ty thể pyridaben, tebufenpyrad, tolfenpyrad, flufenerim, cyenopyrafen, cyflumetofen, hydramethylnon, acequinocyl hoặc fluacrypyrim;A19) chất chẹn kênh natri phụ thuộc vào điện thế như indoxacarb và metaflumizone; A20) chất ức chế tổng hợp lipit như spirođiclofen, spiromesifen và spirotetramat; A21) chất điều biến thụ thể ryanodine từ nhóm điamit, bao gồm flubendiamit, các hợp chất phthalamit (R)-3-Chlor-N1-{2-metyl-4-[1,2,2,2-tetraflo-1-(triflometyl)etyl]phenyl}-N2-(1-metyl-2-metylsulfonyletyl)phthalamit và (S)-3-Chlor-N1-{2-metyl-4-[1,2,2,2-tetraflo-1-(triflometyl)etyl]phenyl}-N2-(1-metyl-2-metylsulfonyletyl)phthalamit, chlorantraniliprole và cyantraniliprole; A22) các hợp chất có phương thức hoạt động không xác định hoặc không chắc chắn như azadirachtin, amidoflumet, bifenazate, fluensulfon, piperonyl butoxit, pyridalyl, sulfoxaflor; hoặc A23) chất điều biến kênh

natri từ nhóm pyrethroid, bao gồm acrinathrin, allethrin, bifenthrin, cyfluthrin, lambda-cyhalothrin, cypermethrin, alpha-cypermethrin, beta-cypermethrin, zeta-cypermethrin, deltamethrin, esfenvalerate, etofenprox, fenpropathrin, fenvalerate, flucythrinate, tau-fluvalinate, permethrin, silafluofen và tralomethrin.

Thuốc diệt nấm/diệt khuẩn: B0) benzovindiflupyr, anitiperonosporic, ametoctradin, amisulbrom, các muối đồng (ví dụ, đồng hyđroxit, đồng oxyclorua, đồng sulfat, đồng persulfat), boscalid, thiflumazide, flutianil, furalaxyl, thiabendazole, benodanil, mepronil, isofetamid, fenfuram, bixafen, fluxapyroxad, penflufen, sedaxane, coumoxystrobin, enoxastrobin, flufenoxystrobin, pyraoxystrobin, pyrametostrobin, triclopyricarb, fenaminstrobin, metominostrobin, pyribencarb, meptyldinocap, fentin axetat, fentin clorua, fentin hyđroxit, oxytetraxyclin, chlozolinate, chloroneb, tecnazene, etridiazole, iodocarb, prothiocarb, *Bacillus subtilis*, chiết xuất từ *Melaleuca alternifolia*, chiết xuất từ *Lupinus albus* doce, BLAD polypeptit, pyrisoxazole, oxpoconazole, etaconazole, fenpyrazamine, naftifine, terbinafine, validamycin, pyrimorph, valifenalate, fthalide, probenazole, isotianil, laminarin, chiết xuất từ *Reynoutria sachalinensis*, axit và các muối phospho, teclofthalam, triazoxide, pyriofenone, dầu hữu cơ, kali bicacbonat, clothalonil, floimit; B1) các azol, bao gồm bitertanol, bromuconazole, cyproconazole, difenoconazole, diniconazole, enilconazole, epoxiconazole, fluquinconazole, fenbuconazole, flusilazole, flutriafol, hexaconazole, imibenconazole, ipconazole, metconazole, myclobutanil, penconazole, propiconazole, prothioconazole, simeconazole, triadimefon, triadimenol, tebuconazole, tetraconazole, triticonazole, prochloraz, pefurazoate, imazalil, triflumizole, cyazofamid, benomyl, carbendazim, thiabendazole, fuberidazole, ethaboxam, etridiazole và hymexazole, azaconazole, diniconazole-M, oxpoconazol, paclobutrazol, uniconazol, 1-(4-clo-phenyl)-2-([1,2,4]triazol-1-yl)-xycloheptanol và imazalilsulfphate; B2) các strobilurin, bao gồm azoxystrobin, dimoxystrobin, enestroburin, fluoxastrobin, kresoxim-metyl, methominostrobin, orysastrobin, picoxystrobin, pyraclostrobin, trifloxystrobin, enestroburin, metyl (2-clo-5-[1-(3-metylbenzyloxyimino)etyl]benzyl)carbamat, metyl (2-clo-5-[1-(6-metylpyridin-2-ylmetoxyimino)etyl]benzyl)carbamat và metyl 2-(ortho-(2,5-đimetylphenyloxymetylen)-phenyl)-3-metoxyacrylat, 2-(2-(6-(3-clo-2-metyl-phenoxy)-5-flo-pyrimiđin-4-yloxy)-phenyl)-2-metoxyimino-N-metyl-axetamit và este metyl của axit 3-metoxy-2-(2-(N-(4-metoxy-phenyl)-xyclopropancarboximiđoylsulfanylmetyl)-phenyl)-acrylic; B3) carboxamit, bao gồm carboxin, benalaxyl, benalaxyl-M, fenhexamid, flutolanil, furametpyr, mepronil, metalaxyl, mefenoxam, ofurace, oxadixyl, oxycarboxin, penthiopyrad, isopyrazam,

thifluzamide, tiadinil, 3,4-điclo-N-(2-xyanophenyl)isothiazol-5-carboxamit, dimethomorph, flumorph, flumetover, fluopicolide (picobenzamid), zoxamide, carpropamid, diclocymet, mandipropamid, N-(2-(4-[3-(4-clophenyl)prop-2-ynyloxy]-3-metoxyphenyl)etyl)-2-metansulfonyl-amino-3-metylbutyramit, N-(2-(4-[3-(4-clo-phenyl)prop-2-ynyloxy]-3-metoxy-phenyl)etyl)-2-etansulfonylamino-3-metylbutyramit, metyl 3-(4-clophenyl)-3-(2-isopropoxycarbonyl-amino-3-metyl-butyrylamino)propionat, N-(4'-bromobiphenyl-2-yl)-4-điflometyl-metylthiazol-δ-carboxamit, N-(4'-triflometyl-biphenyl-2-yl)-4-điflometyl-2-metylthiazol-5-carboxamit, N-(4'-clo-3'-flobiphenyl-2-yl)-4-điflometyl-2-metyl-thiazol-5-carboxamit, N-(3\4'-điclo-4-flobiphenyl-2-yl)-3-điflo-metyl-1-metyl-pyrazol-4-carboxamit, N-(3',4'-điclo-5-flobiphenyl-2-yl)-3-điflometyl-1-metylpyrazol-4-carboxamit, N-(2-xyano-phenyl)-3,4-đicloisothiazol-5-carboxamit, 2-amino-4-metyl-thiazol-5-carboxanilit, 2-clo-N-(1,1,3-trimetyl-indan-4-yl)-nicotinamit, N-(2-(1,3-đimetylbutyl)-phenyl)-1,3-đimetyl-5-flo-1H-pyrazol-4-carboxamit, N-(4'-clo-3',5-điflo-biphenyl-2-yl)-3-điflometyl-1-metyl-1H-pyrazol-4-carboxamit, N-(4'-clo-3',5-điflo-biphenyl-2-yl)-3-triflometyl-1-metyl-1H-pyrazol-4-carboxamit, N-(3',4'-điclo-5-flo-biphenyl-2-yl)-3-triflometyl-1-metyl-1H-pyrazol-4-carboxamit, N-(3',5-điflo-4'-metyl-biphenyl-2-yl)-3-điflometyl-1-metyl-1H-pyrazol-4-carboxamit, N-(3',5-điflo-4'-metyl-biphenyl-2-yl)-3-triflometyl-1-metyl-1H-pyrazol-4-carboxamit, N-(cis-2-bixyclopropyl-2-yl-phenyl)-3-điflometyl-1-metyl-1H-pyrazol-4-carboxamit, N-(trans-2-bixyclopropyl-2-yl-phenyl)-3-điflo-metyl-1-metyl-1H-pyrazol-4-carboxamit, fluopyram, N-(3-etyl-3,5-5-trimetyl-xyclohexyl)-3-formylamino-2-hyđroxy-benzamit, oxytetracyclin, silthiofam, N-(6-metoxy-pyriđin-3-yl) xyclopropancarboxamit, 2-iođo-N-phenyl-benzamit, N-(2-bixyclo-propyl-2-yl-phenyl)-3-difluormetyl-1-metylpyrazol-4-ylcarboxamit; B4) các hợp chất dị vòng, bao gồm fluazinam, pyrifenox, bupirimate, cyprodinil, fenarimol, ferimzone, mepanipyrim, nuarimol, pyrimethanil, triforine, fenpiclonil, fluđioxonil, aldimorph, dodemorph, fenpropimorph, tridemorph, fenpropidin, iprodione, procymidone, vinclozolin, famoxadone, fenamidone, octhilinone, probenazole, 5-clo-7-(4-metyl-piperiđin-1-yl)-6-(2,4,6-triflophenyl)-[1,2,4]triazolo[1,5-a]pyrimiđin, anilazin, diclomezin, pyroquilon, proquinazid, tricyclazole, 2-butoxy-6-iođo-3-propylchromen-4-on, acibenzolar-S-metyl, captafol, captan, dazomet, folpet, fenoxanil, quinoxyfen, N,N-đimetyl-3-(3-bromo-6-flo-2-metylinđol-1-sulfonyl)-[1,2,4]triazol-1-sulfonamit, 5-etyl-6-octyl-[1,2,4]triazolo[1,5-a]pyrimiđin-2,7-điamin, 2,3,5,6-tetraclo-4-metansulfonyl-pyriđin, 3,4,5-triclo-pyriđin-2,6-đi-carbonitril, N-(1-(5-bromo-3-clo-pyridin-2-yl)-etyl)-2,4-điclo-nicotinamit, N-((5-bromo-3-clopyridin-2-yl)-metyl)-2,4-điclo-nicotinamit, diflumetorim, nitrapyrin,

dodemorphacetate, fluoroimid, blasticidin-S, chinomethionat, debacarb, difenzoquat, difenzoquat-metylsulphat, axit oxolinic và piperalin; B5) các carbamat, bao gồm mancozeb, maneb, metam, methasulphocarb, metiram, ferbam, propineb, thiram, zineb, ziram, diethofencarb, iprovalicarb, benthiavalicarb, propamocarb, propamocarb hyđroclorua, 4-flophenyl N-(1-(1-(4-xyanophenyl)-etansulfonyl)nhưng-2-yl)carbamat, metyl 3-(4-clo-phenyl)-3-(2-isopropoxycarbonylamino-3-metyl-butyrylamino)propanoat; hoặc B6) các thuốc diệt nấm khác, bao gồm guaniđin, đodin, bazơ tự do đođin, iminoctadine, guazatine, kasugamycin, oxytetracyclin và các muối của nó, streptomycin, polyoxin, validamycin A, binapacryl, dinocap, dinobuton, dithianon, isoprothiolane, các muối fentin, edifenphos, iprobenfos, fosetyl, fosetyl-nhôm, axit phospho và các muối của nó, pyrazophos, tolclofos-metyl, dichlofluanid, flusulfamide, hexaclo-benzen, phthalide, pencycuron, quintozene, thiophanate, thiophanate-metyl, tolylfluanid, cyflufenamid, cymoxanil, dimethirimol, ethirimol, furalaxyl, metrafenone và spiroxamine, guazatine-axetat, iminoctadine-triaxetat, iminoctadine-tris(albesilat), kasugamycin hyđroclorua hyđat, dichlorophen, pentaclophenol và các muối của nó, N-(4-clo-2-nitro-phenyl)-N-etyl-4-metyl-benzensulfonamit, dicloran, nitrothal-isopropyl, tecnazen, biphenyl, bronopol, điphenylamin, mildiomycin, oxincopper, prohexadione canxi, N-(xyclopropylmetoxy-imino-(6-điflometoxy-2,3-điflo-phenyl)-metyl)-2-phenyl axetamit, N'-(4-(4-clo-3-triflometyl-phenoxy)-2,5-đimetyl-phenyl)-N-etyl-N-metyl formamiđin, N'-(4-(4-flo-3-triflometyl-phenoxy)-2,5-đimetyl-phenyl)-N-etyl-N-metyl formamiđin, N'-(2-metyl-5-trifluormetyl-4-(3-trimetylsilanyl-propoxy)-phenyl)-N-etyl-N-metylformamiđin, N'-(5-difluormetyl-2-metyl-4-(3-trimetylsilanyl-propoxy)-phenyl)-N-etyl-N-metyl formamiđin, và fluindapyr.

Các thuốc diệt giun tròn: C1) Benomyl, cloethocarb, aldoxycarb, tirpate, diamidafos, fenamiphos, cadusafos, dichlofenthion, ethoprophos, fensulfothion, fosthiazate, heterophos, isamidofof, isazofos, phosphocarb, thionazin, imicyafos, mecarphon, acetoprole, benclothiaz, chloropicrin, dazomet, fluensulfone, 1,3-điclopropen (telone), đimetyl đisulfua, metam natri, metam kali, muối metam (tất cả các chất tạo MITC), metyl bromua, chất cải tạo đất sinh học (ví dụ: hạt mù tạt, chiết xuất từ hạt mù tạt), xông hơi khử trùng đất, alyl isothioxyanat (AITC), đimetyl sulfat, furfual (alđehyt).

Chất điều hòa sinh trưởng thực vật: D1) các antiauxin, như axit clofibric, axit 2,3,5-tri-iođobenzoic; D2) các auxin như 4-CPA, 2,4-D, 2,4-DB, 2,4-DEP, dichlorprop, fenoprop, IAA, IBA, naphtalenaxetamit, các axit α-naphtalenaxetic, 1-naphthol, các axit naphthoxyaxetic, kali naphtenat, natri naphtenat, 2,4,5-T; D3) các

cytokinin, như 2iP, benzylađenin, rượu 4-hyđroxyphenetylic, kinetin, zeatin; D4) chất làm rụng lá, như canxi xyanamit, dimethipin, endothal, ethephon, merphos, metoxuron, pentachlorophenol, thidiazuron, tribufos; D5) chất ức chế etylen, như aviglycin, 1-metylxyclopropen; D6) chất giải phóng etylen, như ACC, etacelasil, ethephon, glyoxime; D7) các chất diệt giao tử, như fenridazon, maleic hyđrazit; D8) chất điều hoà sinh trưởng thực vật gibberellin, như chất điều hoà sinh trưởng thực vật gibberellin, axit gibberellic; D9) chất ức chế sinh trưởng, như axit abscisic, ancymidol, butralin, carbaryl, chlorphoni, chlorpropham, dikegulac, flumetralin, fluoridamid, fosamine, glyphosine, isopyrimol, axit jasmonic, maleic hyđrazit, mepiquat, piproctanyl, prohydrojasmon, propham, tiaojiean, axit 2,3,5-tri-iođobenzoic; D10) các morphactin, như chlorfluren, chlorflurenol, dichlorflurenol, flurenol; D11) chất làm chậm sinh trưởng, như chlormequat, daminozide, flurprimidol, mefluidide, paclobutrazol, tetcyclacis, uniconazole; D12) chất kích thích tăng trưởng, như brassinolide, brassinolide-etyl, DCPTA, forchlorfenuron, hymexazol, prosuler, triacontanol; D13) các chất điều hòa tăng trưởng thực vật chưa được phân loại, như bachmedesh, benzofluor, buminafos, carvone, cholin clorua, ciobutide, clofencet, xyanamit, cyclanilite, xycloheximit, cyprosulfamide, epocholeone, ethychlozate, etylen, fuphenthiourea, furalane, heptopargil, holosulf, inabenfide, karetazan, lead arsenate, methasulfocarb, prohexadione, pydanon, sintofen, triapenthenol, trinexapac.

Chất kích thích sinh trưởng thực vật: E1).

Chế phẩm đậm đặc dùng cho chế phẩm nông nghiệp

Sáng chế còn đề xuất chế phẩm đậm đặc cho chế phẩm nông nghiệp, chế phẩm đậm đặc bao gồm: a) *Bacillus amyloliquefaciens* FCC1256, và b) môi trường pha chế thích hợp cho nông nghiệp, ví dụ chứa chất mang thích hợp, chất hoạt động bề mặt, và tuỳ chọn là chất đệm.

Các chế phẩm nông nghiệp có thể thu được bằng cách pha loãng thích hợp chế phẩm đậm đặc với chất mang lỏng thích hợp như đã nêu ở trên cho các chế phẩm nông nghiệp, đặc biệt là chất mang nước. Thuật ngữ "chất mang nước" được dùng để chỉ chất mang chất lỏng chủ yếu dựa trên nước và chứa (các) thành phần không phải nước lên đến 5% trọng lượng. Theo một số phương án, pha loãng chỉ bằng cách sử dụng nước.

Thông thường, độ pha loãng ở tỷ lệ trọng lượng chế phẩm đậm đặc trên chất mang là từ 1:10 đến 1:5000, chẳng hạn như từ 1:20 đến 1:1000.

Theo các phương án, chế phẩm đậm đặc là chế phẩm được chọn từ huyền phù đậm đặc (SC hoặc SD), huyền phù thể tích cực thấp (SU), huyền phù xử lý hạt giống (FS), hệ phân tán dầu (OD), thuốc nhão (PA), gel (GD), hạt phân tán trong nước (WG), bột có thể bám bụi (DP), viên nén phân tán trong nước (WT), bột phân tán trong nước để tạo bột nhão xử lý (WS) và bột có thể thấm ướt (WP).

Thông thường, *Bacillus amyloliquefaciens* FCC1256 được đưa vào các chế phẩm thích hợp ở dạng bào tử của chúng, chứ không phải ở dạng tế bào sinh dưỡng. Ví dụ, các chế phẩm có thể bao gồm một phần của canh trường lên men chứa các bào tử của FCC1256 hoặc sản phẩm lên men đã qua xử lý chứa các bào tử của FCC1256, như phần cô đặc của canh trường lên men hoặc canh trường lên men đã sấy phun.

Theo một số phương án, chế phẩm đậm đặc ở dạng lỏng, và *Bacillus amyloliquefaciens* FCC1256 có mặt trong chế phẩm đậm đặc ở nồng độ từ $1,0x10^8$ CFU/ml đến $1,0x10^{14}$ CFU/ml, như từ $1,0x10^9$ CFU/ml đến $1,0x10^{13}$ CFU/ml.

Theo các phương án trong đó chế phẩm đậm đặc ở dạng lỏng, chế phẩm đậm đặc có thể ở dạng chế phẩm được chọn từ huyền phù đậm đặc (SC hoặc SD), huyền phù thể tích cực thấp (SU), huyền phù xử lý hạt giống (FS), hệ phân tán dầu (OD), thuốc nhão (PA), gel (GD), đặc biệt là huyền phù đậm đặc (SC) và hệ phân tán dầu (OD).

Theo các phương án khác, chế phẩm đậm đặc là ở dạng rắn, và *Bacillus amyloliquefaciens* FCC1256 có mặt trong chế phẩm đậm đặc ở nồng độ từ $1,0x10^8$ CFU/g đến $1,0x10^{14}$ CFU/g, như từ $1,0x10^9$ CFU/g đến $1,0x10^{13}$ CFU/g.

Theo các phương án trong đó chế phẩm đậm đặc là ở dạng rắn, chế phẩm đậm đặc có thể ở dạng chế phẩm được chọn từ hạt phân tán trong nước (WG), bột có thể bám bụi (DP), viên nén phân tán trong nước (WT), bột phân tán trong nước để tạo bột nhão xử lý (WS) và bột có thể thấm ướt (WP), đặc biệt là bột có thể thấm ướt (WP) và hạt phân tán trong nước (WG).

Theo một số phương án, chế phẩm đậm đặc chứa iturin và fengycin với tỷ lệ khối lượng tương đối nằm trong khoảng từ 1,3:1,0 đến 3,0:1,0, như từ 1,5:1,0 đến 2,8:1,0, bao gồm tất cả các phép đo trong phạm vi như vậy.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ sau đây đã được đưa vào để cung cấp hướng dẫn cho chuyên gia có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này để thực hành các phương án đại diện của đối tượng được bộc lộ. Xem xét sáng chế và mức độ kỹ năng trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, chuyên gia có thể đánh giá cao rằng các Ví dụ sau đây chỉ nhằm

mục đích làm mẫu và có thể sử dụng nhiều thay đổi, sửa đổi và biến đổi mà không nằm ngoài phạm vi của đối tượng sáng chế hiện tại.

Phương pháp

Xác định iturin, fengycin và surfactin

Các mẫu được phân tích bằng LC-DAD pha ngược sử dụng cột C18 với građient sàng lọc cho phép phát hiện đồng thời cả ba họ lipopeptit. Pha động bao gồm nước và axetonitril được trộn trước với axit formic 0,1%. Các hợp chất được xác định dựa trên thời gian lưu của chúng và phổ UV so với các chất chuẩn xác thực

Xác định các đơn vị hình thành khuẩn lạc (CFU: colony-forming unit)

CFU của mẫu (được biểu thị bằng CFU/ml đối với mẫu lỏng và CFU/g đối với mẫu rắn) có thể được xác định theo BS EN 15784: 2009 *("Animal feeding stuffs. Isolation and enumeration of presumptive Bacillus spp.").*

Ví dụ 1

Xác định thể phân lập vi khuẩn là *Bacillus amyloliquefaciens* thông qua phân tích trình tự

Một chủng vi khuẩn liên quan đến thực vật, được chỉ định ở bản mô tả này là *Bacillus amyloliquefaciens* FCC1256, đã được phân lập từ đất cây dâu tây ở Autryville, NC, Hoa Kỳ. Chủng *Bacillus amyloliquefaciens* FCC1256 đã được lưu giữ vào ngày 12 tháng 5 năm 2015 theo các điều khoản của Hiệp ước Budapest về Công nhận quốc tế về việc nộp lưu vi sinh vật cho các mục đích của thủ tục cấp bằng sáng chế tại Bộ sưu tập nuôi cấy kiểu Mỹ (ATCC: American Type Culture Collection) ở Manassas, Virginia, Hoa Kỳ mang Số truy cập sáng chế số PTA-122162.

Ban đầu, toàn bộ dữ liệu trình tự bộ gen của *Bacillus amyloliquefaciens* FCC1256 được khai thác để xác định các gen đánh dấu kiểu hình cốt lõi thường được sử dụng để chỉ định phát sinh loài. Các gen được chọn để phân tích này đều là một bản sao đơn lẻ, chỉ có một bản sao của gen trong bộ gen và có chức năng quản lý cốt lõi cho tế bào. Sáu gen được chọn từ tệp chú thích RAST là tiểu đơn vị beta polymeaza ARN hướng ADN (*rpoB*), tái tổ hợp sửa chữa ADN A (*recA* 2), protein sửa chữa không phù hợp ADN S (*mutS*), protein hỗ trợ hấp thu glyxerol (*glpF*), tiểu đơn vị B gyraza AND (gyrB) và chaperone K ADN (dnaK). Đối với mỗi gen được chọn, các chủng gen đại diện cho chi *Bacillus* (cụm *Bacillus subtilis* và cụm *Bacillus cereus*) được sử dụng để so sánh. Vì vậy, FCC1256 đã được xác định là một chủng *Bacillus amyloliquefaciens* mới thông qua phân tích trình tự của các gen rRNA 16S và *rpoB* được bảo toàn cao.

Cũng bao gồm cho mỗi gen là một trình tự nhóm ngoài. Các trình tự nhóm ngoài này được khai thác từ bộ gen của các vi khuẩn khác nhau về mặt phát sinh loài để cung cấp một dấu hiệu về tính mạnh mẽ của các tính toán phát sinh loài.

Mỗi bộ gen tham chiếu lần đầu tiên được tải xuống từ NCBI và được chú thích trong đường dẫn chú thích RAST. Sau đó, mỗi bảng chú thích được tạo ra được tìm kiếm để xác định từng gen quản lý nhà đã chọn và trình tự của mỗi gen sau đó được sao chép và dán vào một sắp hàng nucleotit mới trong chương trình phần mềm MEGA 5.2. Khi mỗi trình tự gen đã được tải vào sắp hàng, tất cả các trình tự gen cụ thể đã được sắp hàng bằng cách sử dụng thuật toán sắp hàng ClustalW. Sau khi mỗi nhóm gen được sắp xếp thẳng hàng, các trình tự sẽ được cắt xén để đảm bảo rằng mỗi trình tự có cùng số lượng nucleotit. Sau bước cắt tỉa, các trình tự được căn chỉnh sau đó được sử dụng để tạo cây phát sinh loài.

Mỗi cây phát sinh loài được sao chép 1000 lần để đánh giá mức độ mạnh mẽ của việc phân nhóm phát sinh loài. Đối với mỗi cây, FCC1256 sắp xếp và cây với các chủng *Bacillus amyloliquefaciens* khác như DSM7, RTI301 và RTI472. Những kết quả này cho thấy với độ tin cậy cao rằng FCC1256 thực sự là *Bacillus amyloliquefaciens*.

Tác dụng đối kháng của FCC1256 đối với một số sinh vật gây bệnh cũng đã được xác định. Bảng 1 dưới đây cung cấp tóm tắt kết quả.

Bảng 1. Đặc tính đối kháng của *Bacillus amyloliquefaciens* FCC1256 chống lại các sinh vật gây bệnh thực vật chính trên cây trồng

Thử nghiệm chống vi sinh vật	FCC1256
Nấm gây bệnh:	
Aspergillus flavus	++
Botrytis cinerea	+++
Fusarium graminearum	+++
Fusarium oxysporum	++
Fusarium virguliforme	+
Phytophthora capsici	+
Rhizoctonia solani	++
Vi khuẩn gây bệnh:	
Erwinia amylovora	++
Xanthomonas euvesicatoria	++

+++ hoạt động rất mạnh, ++ hoạt động mạnh, + hoạt động, + - hoạt động yếu, - không có hoạt động nào được quan sát

Ngoài ra, các thử nghiệm đã được thực hiện để xác định các hoạt động đối kháng của *Bacillus amyloliquefaciens* FCC1256 *in vitro* và trên các cây khác nhau trong các điều kiện khác nhau. Kết quả thử nghiệm được đưa ra trong các Ví dụ 3, 5, 6 và 7 dưới đây.

Các thử nghiệm, ngoài những phát hiện khác, cho thấy khả năng của *Bacillus amyloliquefaciens* FCC1256 trong việc bảo vệ chống lại hoặc kiểm soát sự lây nhiễm sinh vật gây bệnh thực vật so với Serenade® (Bayer CropScience, Inc.) bán trên thị trường có chứa thành phần hoạt chất là *Bacillus velezensis* QST713.

Ví dụ 2

Lên men *Bacillus amyloliquefaciens* FCC1256

Bacillus amyloliquefaciens FCC1256 trước hết được rải từ kho chứa glyxerol lên môi trường 869 rắn, chứa (trong lít L): 10 g trypton, 5 g chiết xuất nấm men, 1 g D-glucoza, 0,3 g $CaCl_2$, và 15 g thạch bột. Sau khi ủ ở 30°C qua đêm, một khuẩn lạc đơn lẻ được lấy để cấy vào bình lắc 250 ml với 50 ml môi trường chứa (trong 1 lít): 10 g pepton, 6 g dịch chiết nấm men, 2 g KCl và 0,1 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$. Sau khi hấp áp lực, các dung dịch sau được thêm vào môi trường: 5 ml 20% glucoza, 1 ml 1M $CaCl_2$, 1 ml 0,1 M $MnCl_2$, và 10 µl 0,1 M $FeSO_4$. Bình lắc được ủ trong tủ ấm lắc ở 30°C và 200 vòng/phút cho đến khi OD600 đạt 1,0. Các viên tế bào được thu thập để cấy vào chất lên men (thể tích làm việc 1,5 lít, Bioflo 320, Eppendorf). Quá trình lên men được thực hiện ở 30°C, tốc độ khuấy là 800 vòng/phút và tốc độ cung cấp không khí là 2 lít/phút. Các mẫu được lấy trong quá trình lên men để theo dõi sự phát triển của tế bào, sự hình thành tế bào và nồng độ chất chuyển hóa. Sau 168 giờ lên men, hầu hết các tế bào *Bacillus amyloliquefaciens* FCC1256 đã hình thành và toàn bộ hỗn hợp nuôi cấy được thu hoạch.

Bacillus amyloliquefaciens FCC1256 và chủng đối chứng QST713 (chủng *Bacillus velezensis* thu được từ sản phẩm Serenade® thương mại) được lên men trong môi trường nuôi cấy nêu trên. Sử dụng phép đo OD600, mức sinh khối trong quá trình lên men được đo. So sánh profin chất chuyển hóa của chủng *Bacillus amyloliquefaciens* FCC1256 và QST713 cho thấy FCC1256 tạo ra iturin với tỷ lệ cao hơn đáng kể so với QST713 trong cùng điều kiện.

Đánh giá thêm về nồng độ chất chuyển hóa cho thấy FCC1256 có tỷ lệ khối lượng iturin: Fengycin: Suractin vào khoảng 3,3:1,4:1, có khả năng góp phần vào các hoạt động đối kháng của chủng chống lại sinh vật gây bệnh thực vật.

Ví dụ 3

Đặc tính chống vi khuẩn của *Bacillus amyloliquefaciens* FCC1256

Bacillus amyloliquefaciens FCC1256, và QST713 được cho vào đĩa và phát triển trong đĩa TSA qua đêm (16-18 giờ) ở 30°C. Sau đó, một khuẩn lạc đơn lẻ được chuyển vào môi trường (môi trường tăng trưởng H_2O, 914,3 ml; NH_4NO_3, 8 g; Na_2HPO_4, 7,15 g; KH_2PO_4, 6,8 g; chiết xuất nấm men 0,5 g; điều chỉnh pH thành 7,5 với 4 mL KOH 4 M; 45 mL môi trường tăng trưởng được chuyển vào bình có vách ngăn 250 ml và được hấp tiệt trùng ở 121°C trong 15 phút. Sau khi hấp tiệt trùng, các dung dịch sau được thêm vào mỗi bình: 0,1 M $CaCl_2$ 5 µl, 0,1M $MnCl_2$ 5 µl, 0,1M $FeSO_4$ 35 µl, 0,1M $ZnCl_2$ 5 µl, 1M $MgSO_4$ 100 µl, glucoza 50 % sol (nồng độ cuối 40 g/l) 4 ml) và ủ trong 168 giờ ở 30°C và trong điều kiện khuấy liên tục (220 vòng/phút). Các chủng này được nuôi trong các bình có vách ngăn 250 ml với chỉ GL 45 (Duran®, Đức) và thể tích làm việc cuối cùng là 50 ml.

Tổng cộng, 14 sinh vật gây bệnh trên lá (12 nấm và 2 vi khuẩn) đã được sử dụng trong nghiên cứu này. Thông số kỹ thuật của sinh vật gây bệnh, điều kiện sinh trưởng và môi trường sử dụng được trình bày trong Bảng 2. Tất cả các sinh vật gây bệnh trên lá được sử dụng cho thí nghiệm này đã được thử nghiệm trong môi trường rắn Potato Dextrose Agar (PDA) ngoại trừ *Pseudomonas syringae* và *Xanthomonas axonopodis* được thử nghiệm trong môi trường rắn thạch đậu nành Trypticase (TSA). Thời gian ủ bệnh của mỗi sinh vật gây bệnh trước khi điều trị dao động từ 3 đến 5 ngày. Trong trường hợp *Pseudomonas syringae* và *Xanthomonas axonopodis* trong đó sử dụng đĩa cỏ để thử nghiệm, cấy qua đêm trên môi trường 869 trong khi *Septoria tritici* được nuôi trên Potato Dextrose Broth trong 5 ngày trước khi chuẩn bị bãi cỏ.

Hoạt động được đánh giá bằng cách sử dụng 20 µl tế bào. Tất cả các ứng dụng được tiến hành ba lần cho tất cả các sinh vật gây bệnh bằng cách sử dụng vật liệu lên men không qua lọc. Thời gian đánh giá đối với nấm bệnh khác nhau tùy theo loài. Thời gian phải tương ứng với mép khuẩn lạc đạt bán kính khoảng 25 mm trên các đĩa điểm kiểm soát. Để đánh giá, một phương pháp bán định lượng đã được sử dụng, hệ thống 4 thang đo sau (0-3) trong đó: **0:** không thấy tác dụng kháng khuẩn; **1**: hiệu ứng nhẹ gây ra nhưng không có vùng rõ ràng; **2**: một khu vực thanh trừ là hiển nhiên; **3**: khu vực thanh trừ lớn hiện diện. Kết quả được thể hiện trong Bảng 2.

Bảng 2. Đặc tính chống vi sinh vật của FCC1256 chống lại các sinh vật gây bệnh trên lá

Chi và loài	**Điều kiện ủ bệnh**	**Loại chuyển**	**Số ngày ủ bệnh trước/ sau khi xử lý**	**Đánh giá QST7 13**	**Đánh giáFCC 1256**
Botrytis cinerea (Bc)	Sẫm màu, 22°C	Nút thạch	0/4	2	2
Stagnospora nodorum (Sn)	Sẫm màu, 22°C	Nút thạch	0/6	2	2
Septoria tritici (St)	Sẫm màu, 22°C	Nút thạch	5/6	2	3
Fusarium oxysporum (Fo)	Sẫm màu, 22°C	Nút thạch	0/4	2	1
Fusarium graminearum (Fg)	Sẫm màu, 22°C	Nút thạch	0/4	2	3
Fusarium culmorum (Fc)	Sẫm màu, 22°C	Nút thạch	0/4	2	2
Monilina fructicola (Mf)	Sẫm màu, 22°C	Nút thạch	0/4	2	3
Sclerotinia homeocarpa (Sh)	Sẫm màu, 22°C	Nút thạch	0/3	2	3
Pyrenophora teres (Pt)	Sẫm màu, 22°C	Nút thạch	0/4	2	3
Alternaria solani (As)	Sẫm màu, 22°C	Nút thạch	0/6	2	3
Magnaporthe oryzae (Mo)	Sẫm màu, 22°C	Nút thạch	0/6	2	3
Glomerella cingulata (Gc)	Sẫm màu, 22°C	Nút thạch	0/4	2	3
Pseudomonas syringae (Pss)	Sẫm màu, 30°C	Bãi cỏ	1/2	1	-
Xanthomonas axonopodis (Xa)	Sẫm màu, 30°C	Bãi cỏ	1/2	2	2

Ví dụ 4

Đặc điểm kiểu hình của *Bacillus amyloliquefaciens* FCC1256

Ngoài các đặc tính đối kháng, các đặc điểm kiểu hình khác nhau cũng được đo đối với *Bacillus amyloliquefaciens* FCC1256 và dữ liệu được thể hiện dưới đây trong Bảng 3. Các xét nghiệm được thực hiện theo các quy trình được mô tả trong văn bản dưới đây của Bảng 3.

Bảng 3. Các thử nghiệm kiểu hình: sản xuất phytohormon, axetoin và axit indol axetic (IAA), và chu trình dinh dưỡng của *Bacillus amyloliquefaciens* FCC1256.

Các thử nghiệm đặc trưng	FCC1256
Sản xuất axetoin (MR-VP)	+++
Hoạt động chitinaza	+
Sản xuất axit inđol-3-axetic	-
Hoạt động của proteaza	++
Sự hòa tan photphat	+

+++ rất mạnh, ++ mạnh, + một số, + - yếu, - không quan sát thấy

Thử nghiệm axetoin. 20 µl dịch nuôi cấy ban đầu trong môi trường được chuyển sang môi trường 1 ml Methyl Red Voges Proskauer (Sigma Aldrich 39484). Các mẫu cấy được ủ trong 2 ngày ở 30°C 200 vòng/phút. 0,5 ml dịch nuôi cấy được trộn với 0,3 mL alpha-naphthol 5% (Sigma Aldrich N1000) sau đó là 0,1 ml KOH 40%. Các mẫu được theo dõi sau 30 phút ủ. Sự phát triển của một màu đỏ cho thấy sản xuất axetoin. Môi trường không cấy được sử dụng như một đối chứng âm tính (Sokol et al., 1979, *Journal of Clinical Microbiology* 9: 538-540).

Hoạt động của chitinaza. Chitin keo 10% trọng lượng ướt được thêm vào môi trường thạch PVK đã sửa đổi (10 g glucoza, 0,2 g kali clorua, 0,5 g amoni sulfat, 0,2 g natri clorua, 0,1 g magie sulfat heptahyđrat, 0,5 g dịch chiết nấm men , 2 mg mangan sulfat, 2 mg sắt sulfat và 15 g thạch trên một lít, pH 7, hấp tiệt trùng). Vi khuẩn được cho vào đĩa trên các đĩa kitin này; các khu vực phòng trừ thể hiện hoạt động của chitinaza (N. K. S. Murthy & Bleakley, 2012. "Simplified Method of Preparing Colloidal Chitin Used for Screening of Chitinase Producing Microorganisms". *The Internet Journal of Microbiology* 10(2)).

Axit inđol-3-axetic. 20 µL dịch nuôi cấy ban đầu trong môi trường được chuyển sang 1 ml 1/10 869 môi trường bổ sung 0,5 g/lit tryptophan (Sigma Aldrich T0254). Nuôi cấy được ủ trong 4-5 ngày trong bóng tối ở 30°C, 200 vòng/phút. Các

mẫu được ly tâm và 0,1 ml phần nổi phía trên được trộn với 0,2 ml thuốc thử Salkowski (35% axit perchloric, 10 mM FeCl3). Sau khi ủ trong 30 phút trong bóng tối, các mẫu có màu hồng được ghi nhận dương tính với sự tổng hợp IAA. Các dung dịch pha loãng của IAA (Sigma Aldrich I5148) được sử dụng như một phép so sánh dương tính; môi trường không cấy được sử dụng làm đối chứng âm tính (Taghavi, et al., 2009, *Applied and Environmental Microbiology* 75: 748-757).

Hoạt động proteaza. Vi khuẩn được cấy trên môi trường 869 có bổ sung 10% sữa. Các vùng phòng trừ cho thấy khả năng phá vỡ các protein điều này gợi ý hoạt động của proteaza (Sokol et al., 1979, *Journal of Clinical Microbiology* 9: 538-540).

Thử nghiệm hòa tan photphat. Vi khuẩn được cấy trên môi trường thạch Pikovskaya (PVK) bao gồm 10 g glucoza, 5 g canxi triphosphat, 0,2 g kali clorua, 0,5 g amoni sulfat, 0,2 g natri clorua, 0,1 g magie sulfat heptahyđrat, 0,5 g dịch chiết nấm men , 2 mg mangan sulfat, 2 mg sắt sulfat và 15 g agar mỗi lít, pH 7, được hấp tiệt trùng. Các khu vực phòng trừ là dấu hiệu của vi khuẩn hòa tan photphat (Sharma et al., 2011, *Journal of Microbiology and Biotechnology Research* 1: 90-95).

Ví dụ 5

Đối kháng của Bacillus amyloliquefaciens FCC1256 trên nấm mốc xám cây tiêu (Botrytis cinerea)

Các nghiên cứu được thực hiện trong nhà kính trên cây tiêu để xác định khả năng của FCC1256 trong việc ngăn ngừa và/hoặc cải thiện tác động của sinh vật gây bệnh nấm mốc xám cây tiêu (*Botrytis cinerea*).

Chế phẩm:

Các bào tử phân lập của FCC1256 được tạo công thức trong 100% môi trường lên men đã qua sử dụng (SFB) ở nồng độ $1x10^8$ CFU/ml (tức là phần cô đặc của canh trường lên men hoàn nguyên). Một chế phẩm FCC1256 tương tự đã được điều chế nhưng có bổ sung thêm chất dinh dưỡng (2 g sucroza + 1,5 g chiết xuất nấm men + 0,2 g $MgSO_4.7H_2O$ mỗi lít).

Bào tử phân lập của *Bacillus amyloliquefaciens* RTI472 được pha chế tương tự trong 100% canh trường lên men đã qua sử dụng (SFB) ở nồng độ $1x10^8$ CFU/ml. Một chế phẩm RTI472 tương tự đã được điều chế với các chất dinh dưỡng bổ sung (như trên đối với FCC1256).

Serenade® Optimum (Bayer CropScience, Inc.) được áp dụng ở nồng độ bào tử $1x10^8$ CFU/mL.

Horizon (Horizon AG-Products) được bón với tỷ lệ 50 g hoạt chất/ha (Tebuconazole).

Phương pháp áp dụng xử lý:

Một máy phun theo dõi được sử dụng để cấy các cây tiêu 28 ngày tuổi trong nhà kính với từng chế phẩm được mô tả ở trên. Máy phun theo dõi có một vòi phun duy nhất trên cao (Quạt phẳng TeeJet SS8001E) ở áp suất 276 kPa (40 psi). Chiều cao vòi phun là 36 cm (14 “) trên lá cây tiêu. Khối lượng ứng dụng là 200 lít/ha và số lần lặp lại trong thí nghiệm là sáu. Các cây xử lý được cấy một lần duy nhất cùng với các cây đối chứng không được xử lý.

Tỷ lệ nhiễm:

Một ngày sau khi áp dụng phương pháp xử lý, các cây thử nghiệm đã được gây nhiễm *Botrytis cinerea* với tỷ lệ nhiễm 500.000 bào tử/ml.

Ba ngày sau khi nhiễm Nấm mốc xám cây tiêu (*Botrytis cinerea*), phần trăm kiểm soát bệnh (trung bình) được đánh giá cho mỗi chế phẩm được mô tả ở trên.

Kết quả của thí nghiệm được trình bày trong Bảng 4 dưới đây và cho thấy khả năng kiểm soát Mốc Xám cây tiêu (*Botrytis cinerea*) vượt trội so với RTI472 và Serenade® Optimum khi áp dụng cùng một tỷ lệ.

Bảng 4. Kết quả kiểm soát nấm mốc xám tiêu (*Botrytis cinerea*) bằng B. *amyloliquefaciens* FCC1256 so với Serenade® Optimum và các tài liệu tham khảo khác.

Xử lý (mỗi lần $1x10^8$ CFU/ml)	Phần trăm kiểm soát bệnh
FCC1256 + 100% SFB	98 (± 1)
FCC1256 + 100% SFB + chất dinh dưỡng	98 (± 1)
Chất dinh dưỡng	0
RTI472 + 100% SFB	96 (±1)
RTI472 + 100% SFB + chất dinh dưỡng	87 (±4)
Serenade® Optimum	90 (±2)
Mốc	100 (±0)

Ví dụ 6

Đối kháng của *Bacillus amyloliquefaciens* FCC1256 bệnh bạc lá trên cây tiêu do *Phytophthora*

Các nghiên cứu được thực hiện trong nhà kính trên cây tiêu để xác định khả năng của FCC1256 trong việc ngăn ngừa và/hoặc cải thiện tác động của sinh vật gây bệnh thực vật bệnh bạc lá trên cây tiêu do *Phytophthora* (*Phytophthora capsici*).

Chế phẩm:

Các bào tử phân lập của FCC1256 được tạo công thức trong 100% môi trường lên men đã qua sử dụng (SFB) ở nồng độ $1x10^8$ CFU/mL (tức là phần cô đặc của canh trường lên men hoàn nguyên). Một công thức FCC1256 tương tự đã được điều chế nhưng có bổ sung thêm chất dinh dưỡng (2 g sucroza + 1,5 g dịch chiết nấm men + 0,2 g $MgSO_4.7H_2O$ trên lít).

Bào tử phân lập của *Bacillus amyloliquefaciens* RTI472 được bào chế tương tự trong 100% môi trường lên men đã qua sử dụng (SFB) ở nồng độ $1x10^8$ CFU/ml. Một chế phẩm RTI472 tương tự đã được điều chế với các chất dinh dưỡng bổ sung (như trên đối với FCC1256).

Serenade® Soil (Bayer CropScience, Inc.) được áp dụng ở nồng độ bào tử $1x10^8$ CFU/mL.

Ridomil Gold (Syngenta, Inc.) được bón với tỷ lệ 0,5 lb hoạt chất/acre (mefenoxam).

Phương pháp áp dụng xử lý:

Đất của cây tiêu 28 ngày tuổi được tưới đẫm 10 ml nước có chứa mỗi chế phẩm được mô tả ở trên. Số lần lặp lại trong mỗi thử nghiệm bằng sáu. Các cây xử lý được cấy một lần duy nhất cùng với các cây đối chứng không được xử lý.

Tỷ lệ nhiễm:

Đối với mỗi nghiên cứu, vào cùng ngày áp dụng phương pháp xử lý, các cây thử nghiệm được gây nhiễm *Phytophthora capsici* FF157 với tỷ lệ 1 ml 1000 bào tử động vật/ml.

Tám ngày sau khi cây bị nhiễm bệnh viêm lá cây tiêu (*Phytophthora capsici*), phần trăm kiểm soát bệnh được đánh giá cho mỗi nghiệm thức. Điểm mức độ nghiêm trọng của bệnh là 9,8 (0 = khỏe mạnh; 10 = chết) vào 8 ngày sau khi nhiễm bệnh.

Kết quả cho thấy khả năng kiểm soát bệnh viêm lá cây tiêu do *Phytophthora* Blight bằng FCC1256 vượt trội về mặt thống kê so với Serenade® Soil khi áp dụng cùng tỷ lệ.

Bảng 5. Kết quả kiểm soát *Bacillus amyloliquefaciens* FCC1256 đối với bệnh viêm lá cây tiêu so với Serenade® Optimum.

Xử lý	Phần trăm kiểm soát bệnh
FCC1256 + 100% SFB	79 (±14)
FCC1256 + 100% SFB + chất dinh dưỡng	44 (±18)
Chất dinh dưỡng	6 (±6)
RTI472 + 100% SFB + chất dinh dưỡng	6 (±6)
Ridomil Gold	100 (±0)
Serenade[d] Soil	30 (±8)

Ví dụ 7

Xét nghiệm Đĩa Lá Tiêu đã tách rời so sánh hoạt động của *Bacillus amyloliquefaciens* FCC1256 với các đối chứng không được xử lý cũng như với sản phẩm thương mại Serenade® Optimum.

Cây ớt (*Piper capsicum*) được trồng trong nhà kính ở 20-25°C với 14-16 giờ ánh sáng ban ngày trong 6-7 tuần. Từ mỗi cây, thu hoạch 4 lá nở hoàn toàn từ phần giữa và cho vào đĩa petri có giấy lọc ẩm. Lá được phun nước (đối chứng chưa được xử lý) hoặc huyền phù của chất lên men Serenade® Optimum (đối chứng dương tính) hoặc FCC1256 (hai đợt khác nhau). Sau đó, các nắp đậy được đặt trên ba đĩa petri và được đặt để ủ trong một buồng tăng trưởng được đặt ở nhiệt độ giống như cùng điều kiện sinh trưởng như trong nhà kính.

Ngày hôm sau, lá được cấy bằng cách phun hỗn dịch bào tử của *Botrytis cinerea*, điều chỉnh đến 500.000 bào tử/ml. Sau đó các đĩa petri được đưa trở lại buồng sinh trưởng và đánh giá sau 4 ngày, 6 ngày và 9 ngày để theo dõi sự tiến triển của bệnh.

Kết quả được thể hiện trong Hình 1. Cột 1 thể hiện tham chiếu Serenade® Optimum (lượng bón 2,8 kg/ha); Cột 2 thể hiện đối chứng đã cấy chưa xử lý; Cột 3 hiển thị đối chứng chưa được cấy chưa xử lý, Cột 4 và 5 hiển thị *Bacillus amyloliquefaciens* FCC1256 của hai lô lên men khác nhau. Hàng 1 và 2 hiển thị kết quả 4 ngày sau khi cấy. Hàng 5 và 6 cho cùng một lá nhưng 6 ngày sau khi cấy, và hàng 3 và 4 lại cho cùng một lá nhưng 9 ngày sau khi cấy.

Bằng cách kiểm tra bằng mắt thường có thể thấy rõ rằng lá của đối chứng cấy không được xử lý (cột 2) bị hư hại nặng ngay cả sau 4 ngày, và lá của đối chứng

không được cấy (cột 3) vẫn tươi trong suốt 9 ngày thí nghiệm. Tài liệu tham khảo Serenade® Optimum cho thấy khả năng kiểm soát sinh vật gây bệnh sau 3 ngày, do các lá bị hại nặng sau 6 và 9 ngày. Mặt khác, men FCC1256 cho thấy khả năng kiểm soát sinh vật gây bệnh rất tốt sau 4 và 6 ngày, và kiểm soát chấp nhận được sau 9 ngày.

Ví dụ 8

(a) Chế phẩm đậm đặc của *Bacillus amyloliquefaciens* FCC1256

Chế phẩm đậm đặc của FCC1256 được chuẩn bị như sau: 20% FCC1256 lên men cô đặc, 45% nước, 30% glyxerin (86,5%), 5% Marasperse AG (natri lignosulfonatd; chất phân tán anion) được trộn, pH được điều chỉnh thành 6,0-7,5 bằng cách sử dụng chất đệm $HK_2PO_4 \cdot H_2O/KH_2PO_4$. Hàm lượng bào tử (FCC1256) của chế phẩm cuối cùng thường nằm trong khoảng $1,0x10^{10}$ CFU/ml đến $1,0x10^{12}$ CFU/ml.

(b) Chế phẩm đậm đặc của *Bacillus amyloliquefaciens* FCC1256

Một chế phẩm của FCC1256 được điều chế như sau: 50% FCC1256 lên men cô đặc, 4,8% nước, 40% glyxerin (86,5%), 5% Marasperse AG (natri lignosulfonat; chất phân tán anion), 0,1% chất chống bọt và 0,1% Kelzan (chất làm đặc) được trộn, độ pH được điều chỉnh đến 6,0-7,5 bằng cách sử dụng chất đệm $HK_2PO_4 \cdot H_2O/KH_2PO_4$. Hàm lượng bào tử (FCC1256) của chế phẩm cuối cùng thường nằm trong khoảng $1,0x10^{10}$ CFU/ml đến $1,0x10^{12}$ CFU/ml.

(c) Chế phẩm nông nghiệp của *Bacillus amyloliquefaciens* FCC1256

Chế phẩm đậm đặc (a) hoặc (b) như quy định ở trên được pha loãng với nước theo tỷ lệ 1:12 để tạo ra chế phẩm nông nghiệp. Chế phẩm có thể áp dụng cho ứng dụng với tỷ lệ ví dụ 200-600 lít/ha.

Ví dụ 9

Thử nghiệm toàn bộ cây tiêu so sánh hoạt tính kháng nấm của *Bacillus amyloliquefaciens* FCC1256 chống lại Nấm mốc xám (*Botrytis cinerea*) so với đối chứng không được xử lý cũng như với các chủng *Bacillus amyloliquefaciens* khác

Bốn chủng *Bacillus amyloliquefaciens* khác nhau, FCC1256, DSM7, RTI472 và RTI301, được lên men trong các điều kiện tương tự (xem Ví dụ 2), ngoại trừ việc lên men được tiến hành ở quy mô nhỏ hơn bằng cách sử dụng bình lắc 500 ml với 60 ml nuôi cấy. Nhiệt độ nuôi cấy là 28°C, tốc độ khuấy là 200 vòng/phút và thời gian ủ là 144 giờ. Mỗi lần lên men cung cấp nồng độ bào tử vào khoảng $1x10^7$ CFU/ml.

Cây hồ tiêu (giống ớt chuông *Piper capsicum* Lamuyo F1) được sản xuất trong chậu nhựa 7x7x7 cm, sử dụng giá thể đất Agrofino 201. Tại thời điểm thử nghiệm, chúng được 6 tuần tuổi. Tưới nước cho cây hai ngày một lần bằng cách bón phân N:P:K=20:20:20 ở 160 ppm. Sáu lần lặp lại được sử dụng cho mỗi phương thức đã thử nghiệm, mỗi lần lặp lại bao gồm 1 cây (1 chậu).

Mỗi cây được xử lý bên trong một máy phun phòng thí nghiệm bằng cách sử dụng bùng nổ 3 vòi với khối lượng ước tính là 1000 lít/ha. Mỗi chủng trong số bốn chủng *Bacillus amyloliquefaciens* khác nhau, FCC1256, DSM7, RTI472 và RTI301, được sử dụng với liều lượng 20 ml môi trường lên men được pha loãng trong 100 mL nước khử khoáng và được trộn với 0,2% thể tích/thể tích của hỗn hợp tá dược. Môi trường lên men với hỗn hợp tá dược 0,2% thể tích và không có chủng *Bacillus* cũng được đánh giá như một mẫu tham khảo.

Sau khi dùng, cây được bảo quản trong buồng sinh trưởng ở 20°C, 70% RH và thời gian lưu ảnh 16 giờ. Việc cấy bệnh được thực hiện 24 giờ sau khi phun thuốc diệt nấm, bằng cách phun thủ công chế phẩm *Botrytis cinerea* lên các cây đã xử lý cho đến khi ra lá. Nồng độ chất cấy là 50.000 bào tử/ml bên trong môi trường PDB (chủng *Botrytis cinerea* FF248). Sau khi cấy, cây được bảo quản 48 giờ trong buồng sương ở 20°C (không có ánh sáng) để tránh lây nhiễm. Sau đó, cây được đặt trong buồng sinh trưởng ở 20°C, 70% RH và thời gian lưu ảnh 16 giờ, tùy theo phân loại bệnh.

Đánh giá bệnh được thực hiện ba ngày sau khi cấy, bằng cách đánh giá % mức độ nghiêm trọng trên bốn lá phát triển đầy đủ của mỗi cây. Sau đó, % mức độ nghiêm trọng trung bình trên mỗi chậu được tính toán (báo cáo trong Bảng 6), và hiệu quả của các chủng thử nghiệm được tính bằng công thức Abott:

* % kiểm soát A = 100 * ((% mức độ nghiêm trọng A -% mức độ nghiêm trọng chưa được xử lý) /% mức độ nghiêm trọng chưa được xử lý)

Bảng 6. Kết quả kiểm soát bệnh mốc xám của *Bacillus amyloliquefaciens* FCC1256 (*Botrytis cinerea*) so với các chủng *Bacillus amyloliquefaciens* RTI301, DSM7 và RTI472.

Chủng	**Phần trăm kiểm soát bệnh**
RTI301	26 (±26)
DSM7	72 (±10)
RTI472	83 (±11)

FCC1256	94 (±6)
Môi trường lên men (tham khảo)	3 (±5)
Chưa xử lý (đối chứng)	0 (±0)

CÁC TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tất cả các ấn phẩm, đơn xin cấp bằng sáng chế, bằng sáng chế và các tài liệu tham khảo khác được đề cập trong đặc điểm kỹ thuật ở đây được đưa vào toàn bộ bằng cách viện dẫn.

Mặc dù đối tượng nêu trên đã được mô tả một số chi tiết bằng cách minh họa và ví dụ nhằm mục đích hiểu rõ hơn, nhưng những các chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ hiểu rằng một số thay đổi và sửa đổi nhất định có thể được thực hiện trong phạm vi của yêu cầu bảo hộ kèm theo.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp kiểm soát (các) sinh vật gây bệnh thực vật trên thực vật, phương pháp bao gồm bước dùng chế phẩm chứa *Bacillus amyloliquefaciens* FCC1256 được lưu giữ với số ATCC PTA-122162 cho thực vật, cho một phần của thực vật và/hoặc vào vị trí mà tại đó thực vật hoặc phần thực vật phát triển hoặc sẽ được trồng.

2. Phương pháp kiểm soát (các) nấm gây bệnh thực vật và/hoặc các vi khuẩn gây bệnh thực vật trên thực vật, phương pháp này bao gồm bước dùng chế phẩm chứa *Bacillus amyloliquefaciens* FCC1256 được lưu giữ với số ATCC PTA-122162 vào phần nằm trên mặt đất của thực vật.

3. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó chế phẩm này ở dạng lỏng, và trong đó *Bacillus amyloliquefaciens* FCC1256 có trong chế phẩm này ở nồng độ từ $1,0x10^6$ CFU/ml đến $1,0x10^{12}$ CFU/ml.

4. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó chế phẩm này là ở dạng chế phẩm lỏng được chọn từ huyền phù, huyền phù đậm đặc (SC: suspension concentrate), hệ phân tán dầu (OD: oil dispersion) và dạng bọt.

5. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1-2, trong đó chế phẩm này là ở dạng rắn, và trong đó *Bacillus amyloliquefaciens* FCC1256 có trong chế phẩm này ở nồng độ từ $1,0x10^6$ CFU/g đến $1,0x10^{12}$ CFU/g.

6. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 2 và 5, trong đó chế phẩm này là ở dạng chế phẩm rắn được chọn từ bột có thể bám bụi (DP: dustable powder), hạt phân tán trong nước (WG: water-dispersible granule) và bột có thể thấm ướt (WP: wettable powder).

7. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó chế phẩm này được dùng với lượng nằm trong khoảng từ $4,0x10^9$ CFU/ha đến $4,0x10^{17}$ CFU/ha.

8. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó (các) sinh vật gây bệnh thực vật được chọn từ nhóm bao gồm *Botrytis cinerea*, *Botrytis squaomas*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium viguliforme*, *Phytophthora infestans*, *Phytophthora parasitica*, *Phytophthora sojae*, *Phytophthora capsici*, *Phytophthora cinnamon*, *Phytophthora fragariae*, *Phytophthora ramorum*, *Phytophthora palmivara*, *Phytophthora nicotianae*, *Sclerotinia sclerotiorum*,

Sclerotinia minor, *Sclerotinia homeocarpa*, *Aspergillus Favus*, *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato*, *Erwinia amylovara*, *Rhizoctonia solani*, *Xanthomonas euvesicatoria*, và kết hợp bất kỳ của chúng.

9. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó thực vật được chọn từ các cây hạt tiêu, cây dưa chuột, cây táo, cây măng tây, cây mọng, cây chuối, cây cam quít, cây kiwi, cây dưa, cây đào, cây lê, cây dứa, cây bưởi chùm, cây lựu, cây cần tây, cây hành, cây tỏi, cây nho, cây tỏi tây, cây hẹ tây, cây hẹ, cây bông cải xanh, cây bắp cải, cây súp lơ, cây bầu bí, cây cà chua, cây khoai tây, cây lúa mì, cây lúa và cây đậu tương.

10. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó chế phẩm này chứa iturin và fengycin với tỷ lệ khối lượng tương đối nằm trong khoảng từ 1,3:1,0 đến 3,0:1,0.

11. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó chế phẩm này còn bao gồm môi trường pha chế thích hợp cho nông nghiệp gồm chất mang thích hợp, chất hoạt động bề mặt, và tuỳ chọn là chất đệm.

12. Chế phẩm nông nghiệp bao gồm:

a) *Bacillus amyloliquefaciens* FCC1256 được lưu giữ với số ATCC PTA-122162, và

b) môi trường pha chế thích hợp cho nông nghiệp chứa chất mang thích hợp, chất hoạt động bề mặt, và tuỳ chọn là chất đệm.

13. Chế phẩm theo điểm 12, trong đó chế phẩm này chứa iturin và fengycin với tỷ lệ khối lượng tương đối nằm trong khoảng từ 1,3:1,0 đến 3,0:1,0.

14. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 12 đến 13, trong đó chế phẩm này là chế phẩm được chọn từ huyền phù, huyền phù đậm đặc (SC: suspension concentrate), hệ phân tán dầu (OD: oil dispersion), dạng bọt, bột có thể bám bụi (DP: dustable powder), hạt phân tán trong nước (WG: water-dispersible granule) và bột có thể thấm ướt (WP: wettable powder).

15. Chế phẩm đậm đặc cho chế phẩm nông nghiệp, trong đó chế phẩm đậm đặc này bao gồm:

a) *Bacillus amyloliquefaciens* FCC1256 được lưu giữ với số ATCC PTA-122162, và

b) môi trường pha chế thích hợp cho nông nghiệp chứa chất mang thích hợp, chất hoạt động bề mặt, và tuỳ chọn là chất đệm.

16. Chế phẩm đậm đặc theo điểm 15, trong đó chế phẩm này ở dạng chế phẩm được chọn từ huyền phù đậm đặc (SC hoặc SD), huyền phù thể tích cực thấp (SU: ultra-low volume suspension), huyền phù xử lý hạt giống (FS: seed treatment suspension), hệ phân tán dầu (OD: oil dispersion), thuốc nhão (PA: paste), gel (GD), hạt phân tán trong nước (WG: water-dispersible granule), bột có thể bám bụi (DP: dustable powder), viên nén phân tán trong nước (WT: water-dispersible tablet), bột phân tán trong nước để tạo bột nhão xử lý (WS: water-dispersible powders for slurry treatment) và bột có thể thấm ướt (WP: wettable powder).

17. Chế phẩm đậm đặc theo điểm bất kỳ trong số các điểm 15 và 16, chứa iturin và fengycin với tỷ lệ khối lượng tương đối nằm trong khoảng từ 1,3:1,0 đến 3,0:1,0.

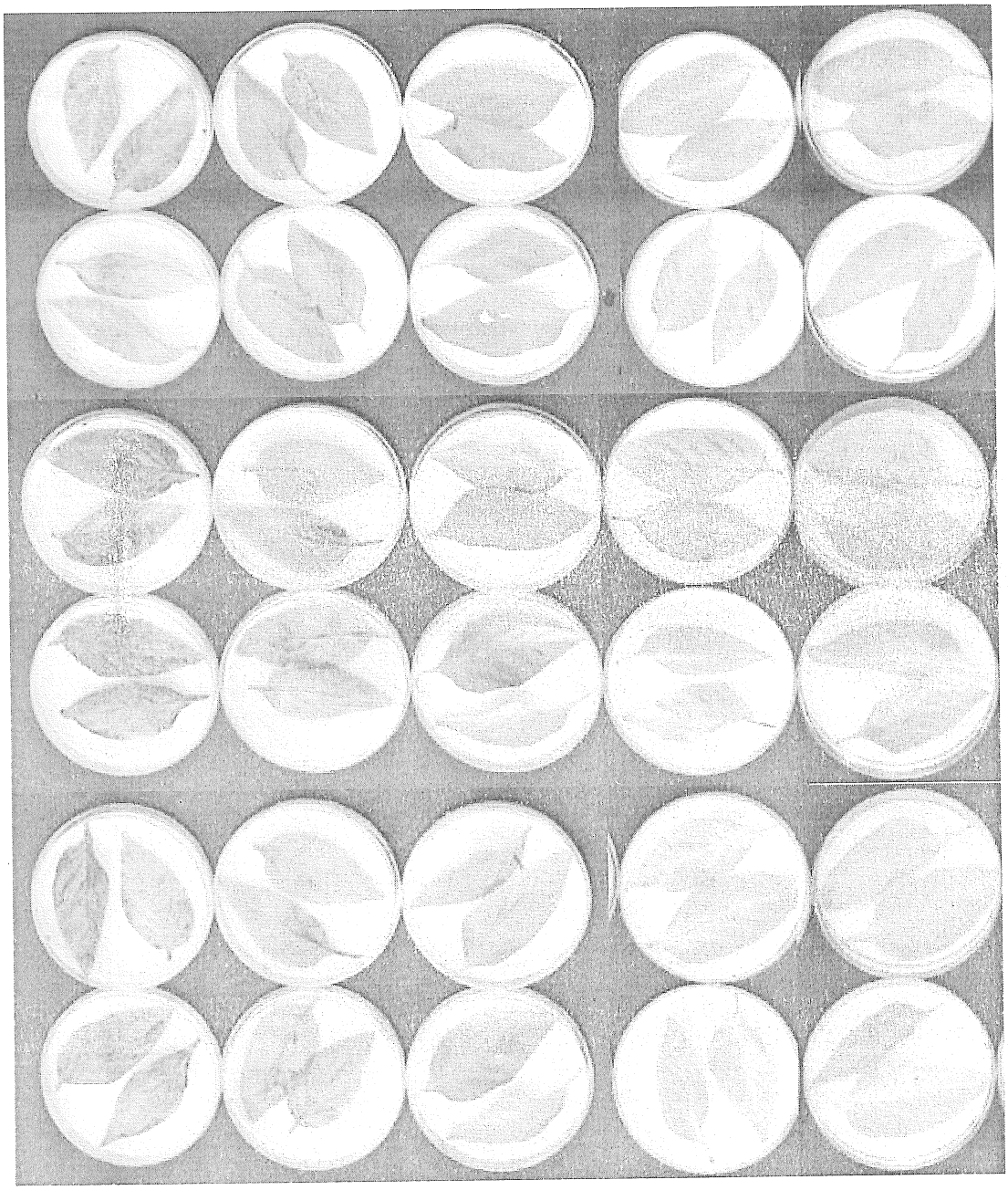


Fig. 1

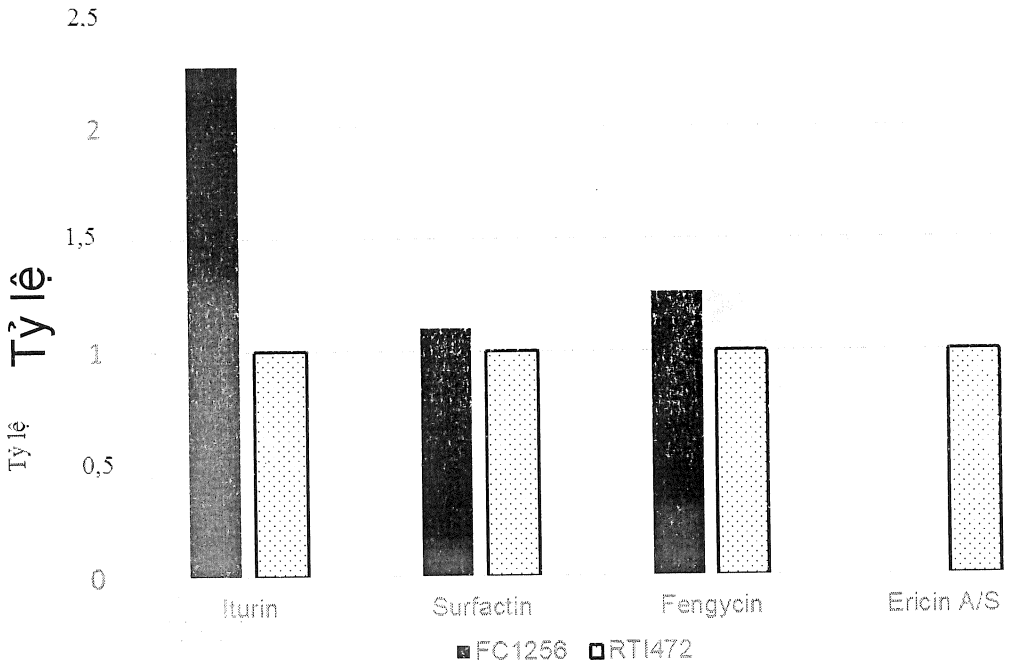

2.5
2
1,5
1
0,5
0
Tỷ lệ
Tỷ lệ
Iturin
Surfactin
Fengycin
Ericin A/S
FC1256
RTI472

Fig. 2