



(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)



1-0043876

(51)^{2020.01} A01N 63/00; C12R 1/07; C12N 1/20

(13) B

(21) 1-2020-04952

(22) 31/01/2019

(86) PCT/US2019/015951 31/01/2019

(87) WO 2019/152584 08/08/2019

(30) 15/886,124 01/02/2018 US

(45) 25/03/2025 444

(43) 25/11/2020 392A

(73) Phibro Animal Health Corporation (US)

300 Frank W. Burr Blvd., Suite 21 Glenpointe Center East, 3rd Floor Teaneck, New Jersey 07666, United States of America

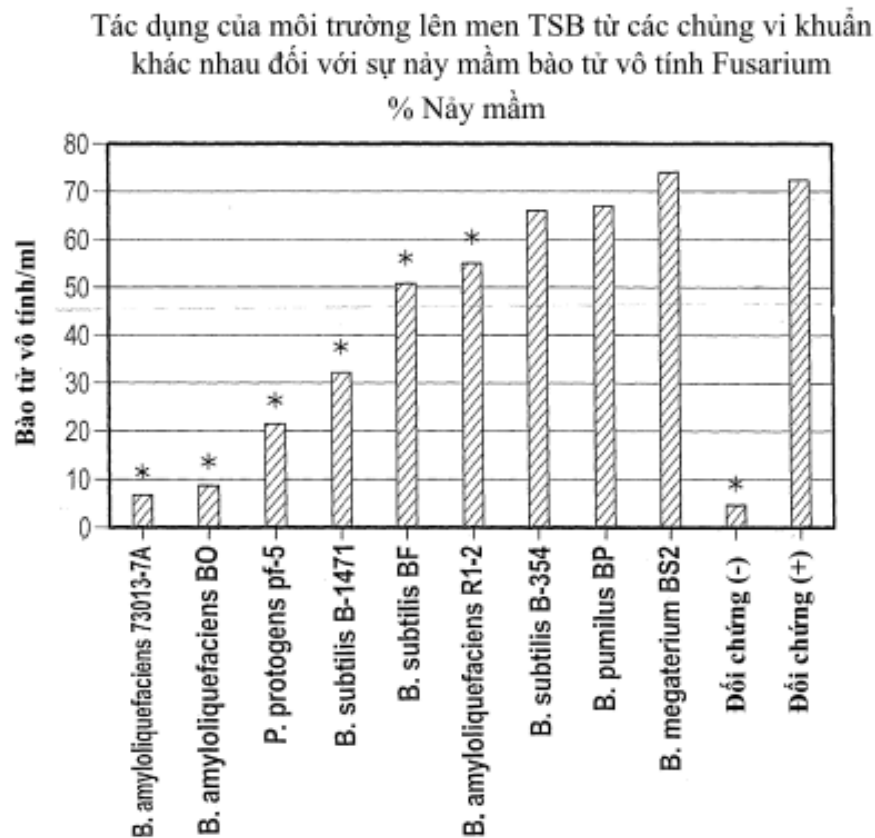
(72) REUTER, Christopher J. (US); MACKENZIE, Steven J. (US).

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

(54) PHƯƠNG PHÁP LÀM GIẢM TÌNH TRẠNG NHIỄM NẤM Ở CÂY TRỒNG

(21) 1-2020-04952

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp làm giảm tình trạng nhiễm nấm ở cây trồng bằng cách sử dụng cho hạt giống, hoặc cho đất trồng cây, chế phẩm chứa nguồn protein được cấy với lượng từ 5×10^7 cfu đến 5×10^9 cfu chủng *Bacillus amyloliquefaciens* cho mỗi gam nguồn protein này.



Đối chứng (-) chưa được xử lý với chủng vi khuẩn hoặc môi trường nảy mầm bất kỳ
Đối chứng (+) được xử lý bằng môi trường nảy mầm
Các trường hợp xử lý với chủng ID được xử lý với canh thang vi khuẩn và môi trường nảy mầm của bào tử vô tính
Các cột được đánh dấu * là giảm có ý nghĩa thống kê so với đối chứng (+) ở p nhỏ hơn hoặc bằng 0,05

FIG. 1

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp và chế phẩm để làm giảm hoặc loại bỏ tình trạng nhiễm nấm của cây trồng đang phát triển và/hoặc đã thu hoạch bằng cách sử dụng vi khuẩn không gây bệnh.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các thành viên của loài *Bacillus* đã được báo cáo là hữu ích để phòng ngừa tình trạng nhiễm bệnh và/hoặc thúc đẩy sự phát triển của cây trồng. Ví dụ, chủng *Bacillus pumilus* QST2808, chủng *Bacillus pumilus* GB34, chủng *Bacillus Subtilis* QST713, chủng *Bacillus Subtilis* GB03, nhiều chủng khác nhau của *Bacillus thuringiensis* và *Bacillus firmus*, và chủng *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 đã được sử dụng trong các sản phẩm kiểm soát sinh học đã có trên thị trường.

Mặc dù các thuốc diệt nấm sinh học, không gây bệnh, tự nhiên đã biết đã đạt được một số thành công về mặt thương mại, vẫn có nhu cầu về thuốc diệt nấm sinh học hiệu quả cao và an toàn.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến chế phẩm diệt nấm sinh học an toàn (không độc, không gây bệnh) chứa nguồn protein được cấy với lượng từ 5×10^7 cfu đến 5×10^9 cfu chủng *Bacillus amyloliquefacias* cho mỗi gam của nguồn protein này. Sự kết hợp của nguồn protein và chủng diệt vi sinh vật là *Bacillus amyloliquefacies* đã được phát hiện ra là làm giảm và/hoặc ức chế bệnh nhiễm nấm ở cây trồng hữu hiệu hơn so với từng thành phần đơn lẻ, tạo ra sự cải thiện hiệp đồng và bất ngờ.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 là đồ thị cột thể hiện tác dụng ức chế của dịch chảy ra từ môi trường lên men từ các chủng vi khuẩn khác nhau đối với sự nảy mầm bào tử vô tính *Fusarium oxysporum*.

Fig. 2 là đồ thị cột thể hiện tác dụng ức chế của dịch chảy ra từ môi trường lên men từ các chủng vi khuẩn khác nhau đối với số lượng bào tử vô tính *Fusarium oxysporum*.

Fig. 3 là đồ thị cột thể hiện tác dụng ức chế của việc bổ sung chế phẩm chứa nguồn protein được cấy với chủng *Bacillus amyloliquefaciens* vào đất trồng cây.

Fig. 4 là đồ thị cột thể hiện là việc bổ sung một mình chủng *Bacillus amyloliquefaciens*, mà không có nguồn protein, vào đất trồng cây không ức chế hiệu quả *Fusarium oxysporum*.

Fig. 5 là đồ thị cột thể hiện là bột đậu tương được cấy với chủng *Bacillus amyloliquefaciens* là hữu hiệu hơn nhiều so với một mình bột đậu tương trong việc ức chế *Fusarium oxysporum* trong đất.

Mô tả chi tiết sáng chế

Dựa trên các thử nghiệm, trong đó các loài *Bacillus* khác nhau được sàng lọc về khả năng của chúng trong việc thúc đẩy sự sinh trưởng của cây húng tây đã được xử lý bằng nguồn protein được chọn từ khô dầu hạt bông, bột đậu tương và bột lông vũ đã thủy phân, đã xác định được là sự sinh trưởng tương ứng với khô dầu hạt bông và bột đậu tương là rất kém bất kể loài *Bacillus* và lượng *Bacillus* được sử dụng. Cũng xác định được là sự sinh trưởng tương ứng với bột lông vũ đã thủy phân là tốt bất kể lượng hoặc loài *Bacillus* được sử dụng. Điều này gợi ý cho tác giả sáng chế là bột đậu tương và khô dầu hạt bông đang được sử dụng bởi vi khuẩn và được đưa vào khối vi khuẩn này. Vi khuẩn chịu trách nhiệm về việc chuyển hóa các nguồn protein có thể là vi khuẩn tự nhiên, vi khuẩn được bổ sung vào (vi khuẩn cấy vào nguồn protein), hoặc kết hợp của cả vi khuẩn cấy và vi khuẩn tự nhiên. Điều này gợi ý tác giả sáng chế là một số nguồn protein, như bột đậu tương và khô dầu hạt bông, có thể được sử dụng để hỗ trợ cho sự sinh trưởng của sinh vật kiểm soát sinh học, như vi khuẩn diệt nấm.

Dựa trên các thử nghiệm riêng, trong đó các chủng *Bacillus* khác nhau được sàng lọc về khả năng của chúng trong việc ức chế sự nảy mầm của bào tử vô tính trong nước và khả năng của chúng trong việc dung giải bào tử vô tính trong nước, đã xác định được là dịch thu được từ môi trường canh thang đậu tương trypsin (TSB) được sử dụng để nuôi cấy nhiều chủng *Bacillus* khác nhau được thử nghiệm thường chứa các chất được tiết ra có khả năng ức chế sự nảy mầm của bào tử vô tính từ *Fusarium oxysporum*. Tuy

nhiên, như được thể hiện trong Fig. 1, có một số ngoại lệ, như chủng *B. pumilus* BP, không ức chế đáng kể *Fusarium oxysporum*. Ngoài ra, như được thể hiện trong Fig. 1, các chủng *B. amyloliquefaciens* OBT 730 (được lưu trữ với số truy cập ATCC là PTA-124660), và OBT 712 (được lưu trữ với số truy cập ATCC là PTA-122189) là đặc biệt hữu hiệu trong việc ức chế sự nảy mầm của bào tử vô tính *Fusarium*.

Fig. 2 thể hiện là khả năng của các dịch thu được từ các chủng OBT 730 và OBT 712 trong việc dung giải bào tử vô tính *Fusarium oxysporum* là đặc biệt tốt, với hơn 70% bào tử vô tính biến mất. Trong số các bào tử vô tính còn lại, tỷ lệ phần trăm nảy mầm đối với các dịch thu được từ các chủng OBT 730 và OBT 712 là thấp hơn nhiều so với được quan sát thấy khi các bào tử vô tính được xử lý với dịch thu được từ các môi trường nuôi cấy khác.

Chủng OBT 712 là chủng gốc được bán trong hầu hết các sản phẩm dựa trên *Bacillus* được bán bởi Osprey Biotechnics, Sarasota, Florida, và chủng OBT 730 được phân lập bởi Osprey Biotechnics từ mẫu đất.

Chủng OBT 712 được chọn để phân tích thêm. Cụ thể là, các thử nghiệm được thực hiện để xác định khả năng của chủng OBT 712 trong việc làm giảm nồng độ bào tử vô tính *Fusarium* trong đất, cả có và không có bột đậu tương. Bột đậu tương được cấy với 5×10^8 cfu chủng *B. amyloliquefaciens* OBT 712 cho mỗi gam bột đậu tương. Bột đậu tương đã cấy được bổ sung vào đất với lượng là không, 0,33%, 1% và 5%, và bào tử vô tính *Fusarium oxysporum* được bổ sung với lượng 5×10^5 bào tử vô tính cho mỗi gam đất. Việc bổ sung bột đậu tương đã cấy *B. amyloliquefaciens* làm giảm đáng kể *Fusarium* mà có thể thu được từ đất, như được thể hiện trong Fig. 3.

Tác giả sáng chế đã thực hiện một số nghiên cứu khác để xác định là chủng OBT 712 có thể làm giảm số lượng *Fusarium* khi không có bột đậu tương hay không và tác dụng trên *Fusarium* có phải là do một mình bột đậu tương hay không hoặc có cần vi khuẩn này hay không. Bột đậu tương một phần trăm được cấy với 5×10^8 cfu chủng OBT 712 cho mỗi gam bột đậu tương sẽ cung cấp 5×10^6 cfu chủng OBT 712 cho mỗi gam đất. Nồng độ này cũng như 5×10^5 cfu chủng OBT 712 cho mỗi gam đất đều không tác động đáng kể đến *Fusarium* (Fig. 4). Tuy nhiên, khi so sánh với một mình bột đậu tương, bột đậu tương cộng chủng OBT 712 làm giảm lượng thu hồi *Fusarium* xấp xỉ 80% (Fig. 5).

Từ các thử nghiệm trên đây, tác giả sáng chế đã kết luận là chế phẩm cải tạo đất chứa bột đậu tương được cấy với *Bacillus amyloliquefaciem* có thể được sử dụng để làm giảm tình trạng nhiễm *Fusarium* ở cây trồng. Bột đậu tương có ưu điểm so với các nguồn nitơ khác đã được thử nghiệm. Lượng đậu tương cần thiết để quan sát thấy tác dụng có lợi đối với sự thu hồi *Fusarium* là thấp hơn nhiều so với các nguồn cung cấp nitơ hữu cơ khác. Ở bột đậu tương 0,5%, hàm lượng nitơ của hỗn hợp giá thể hữu cơ là xấp xỉ 375 ppm. Thông thường, sẽ mong muốn nồng độ nitơ nằm trong khoảng 100-200 ppm, nhưng mặc dù *B. amyloliquefaciens* phát triển trên cơ chất này và đồng hóa nitơ, có thể hiểu rằng nitơ tự do sẽ là thấp hơn nhiều so với 200 ppm và các tác dụng bất lợi cho cây sẽ không được quan sát thấy.

Theo cách khác, chính canh thang lên men có thể tạo ra sản phẩm chống nấm thích hợp. Có thể sử dụng thử nghiệm thông thường để xác định tỷ lệ phần trăm nguyên liệu có thể được sử dụng làm chất diệt nấm. Các sản phẩm được tiết ra mà có thể có hoạt tính chống nấm của các chủng *B. amyloliquefaciens* là các lipopeptit. Ví dụ như iturin, surfactin, và fengycin. Gen mã hóa các enzym cần thiết để tổng hợp các hợp chất này có trong bộ gen của chủng OBT 712. Các peptit này đã được chỉ ra là gây tan máu và do đó không được thương mại hóa.

Các chế phẩm (các nguồn protein được cấy và dịch thu được từ môi trường nuôi cấy) được bộc lộ ở đây có thể được sử dụng để ức chế bệnh nhiễm nấm ở cây bằng cách sử dụng các chế phẩm này cho cây, cho hạt mà sẽ phát triển thành cây, hoặc cho đất trồng cây. Nồng độ đất thường đề cập đến các nồng độ trong đất mà tiếp xúc với rễ của cây. Việc sử dụng cho hạt đề cập đến việc đưa chế phẩm đã mô tả vào vỏ hạt. “Dịch thu được” đề cập đến chất lỏng đã lọc thu được từ môi trường mà trong đó vi khuẩn đã mô tả được nuôi cấy.

Các phương án được mô tả được ưu tiên hơn và/hoặc được minh họa, nhưng không làm giới hạn. Nhiều biến đổi khác nhau được xem là nằm trong phạm vi và giới hạn của các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp làm giảm tình trạng nhiễm nấm ở cây trồng, bao gồm bước sử dụng cho hạt giống, hoặc cho đất trồng cây, chế phẩm chứa nguồn protein được chọn từ bột đậu tương hoặc khô dầu hạt bông và từ 5×10^7 cfu đến 5×10^9 cfu chủng *Bacillus amyloliquefaciens* cho mỗi gam của nguồn protein này.
2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó chế phẩm này được bổ sung vào đất trồng cây, sao cho chế phẩm này có mặt trong đất với lượng từ khoảng 0,33% đến khoảng 5% khối lượng của đất.
3. Phương pháp theo điểm 1, trong đó chủng *Bacillus amyloliquefaciens* có các đặc điểm nhận diện của chủng vi khuẩn được ký hiệu là OBT 712, được lưu trữ với số truy cập ATCC là PTA-122189.
4. Phương pháp theo điểm 1, trong đó chủng *Bacillus amyloliquefaciens* có các đặc điểm nhận diện của chủng vi khuẩn được ký hiệu là OBT 730, được lưu trữ với số truy cập ATCC là PTA-124660.
5. Phương pháp theo điểm 1, trong đó cây trồng này bị nhiễm chủng *Fusarium oxysporum*.
6. Phương pháp làm giảm tình trạng nhiễm nấm ở cây trồng, bao gồm bước sử dụng cho cây trồng, hoặc cho đất trồng cây, dịch thu được từ chủng *Bacillus amyloliquefaciens* được nuôi trong môi trường nuôi cấy, chủng *Bacillus amyloliquefaciens* này có các đặc điểm nhận diện của chủng vi khuẩn được ký hiệu là OBT 712, được lưu trữ với số truy cập ATCC là PTA-122189, trong đó môi trường nuôi cấy là canh thang đậu tương trypsin.
7. Phương pháp làm giảm tình trạng nhiễm nấm ở cây trồng, bao gồm bước sử dụng cho hạt giống, hoặc cho đất trồng cây, chế phẩm chứa bột đậu tương được cấy chủng *Bacillus amyloliquefaciens* có các đặc điểm nhận diện của chủng vi khuẩn được ký hiệu là OBT

712, được lưu trữ với số truy cập ATCC là PTA-122189 với lượng từ 5×10^7 cfu đến 5×10^9 cfu chủng *Bacillus amyloliquefaciens* cho mỗi gam của bột đậu tương.

8. Phương pháp làm giảm tình trạng nhiễm nấm ở cây trồng, bao gồm các bước:

tạo ra chế phẩm chứa nguồn protein được chọn từ bột đậu tương hoặc khô dầu hạt bông và từ 5×10^7 cfu đến 5×10^9 cfu chủng *Bacillus amyloliquefaciens* cho mỗi gam của nguồn protein này; và

sử dụng chế phẩm này cho hạt giống hoặc cho đất.

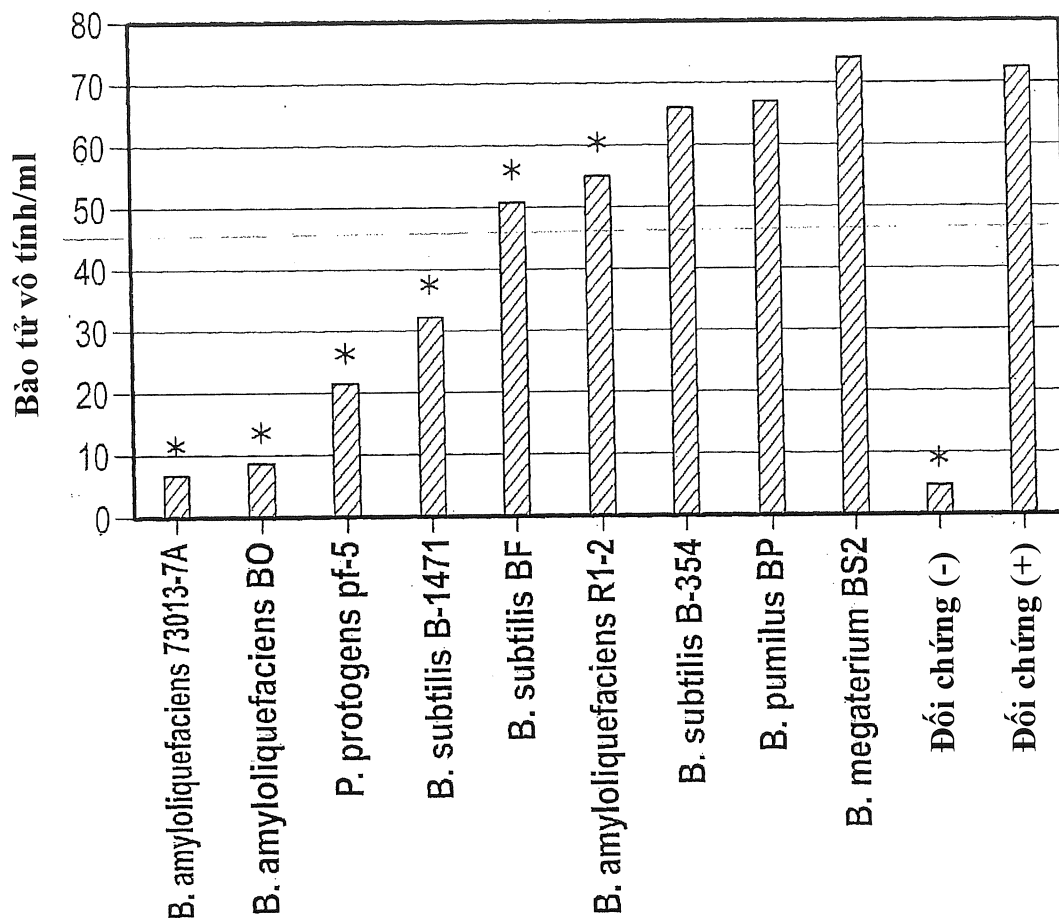
9. Phương pháp theo điểm 8, trong đó chế phẩm này được sử dụng cho hạt giống.

10. Phương pháp theo điểm 9, trong đó chế phẩm này chứa bột đậu tương và chủng *Bacillus amyloliquefaciens* có các đặc điểm nhận diện của chủng vi khuẩn được ký hiệu là OBT 712, được lưu trữ với số truy cập ATCC là PTA-122189 với lượng từ 5×10^7 cfu đến 5×10^9 cfu chủng *Bacillus amyloliquefaciens* cho mỗi gam của bột đậu tương.

1/5

Tác dụng của môi trường lên men TSB từ các chủng vi khuẩn khác nhau đối với sự nảy mầm bào tử vô tính Fusarium

% Nảy mầm



Đối chứng (-) chưa được xử lý với chủng vi khuẩn hoặc môi trường nảy mầm bất kỳ
 Đối chứng (+) được xử lý bằng môi trường nảy mầm

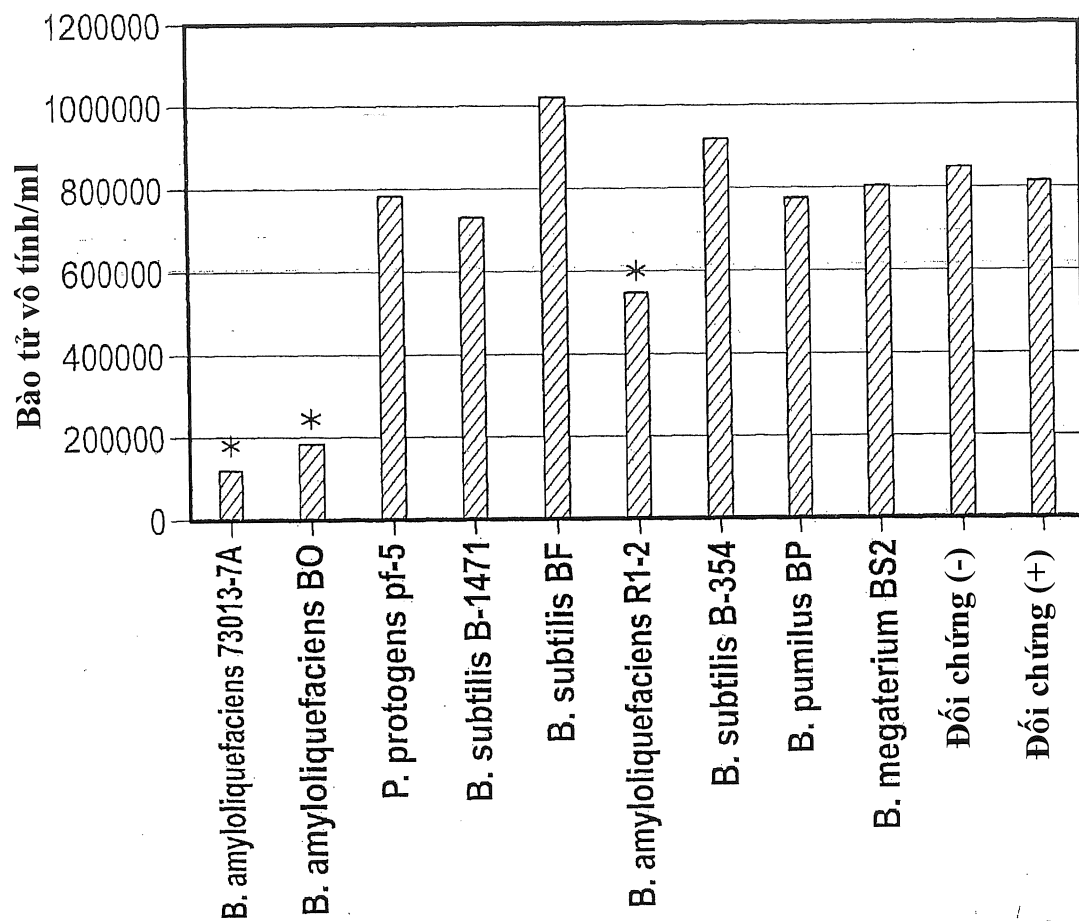
Xử lý với chủng ID được xử lý với canh thang vi khuẩn và môi trường nảy mầm của bào tử vô tính

Các cột được đánh dấu * là giảm có ý nghĩa thống kê so với đối chứng (+) ở p nhỏ hơn hoặc bằng 0,05

FIG. 1

2/5

Tác dụng của môi trường lên men TSB từ các chủng vi khuẩn khác nhau đối với số lượng bào tử vô tính *Fusarium*

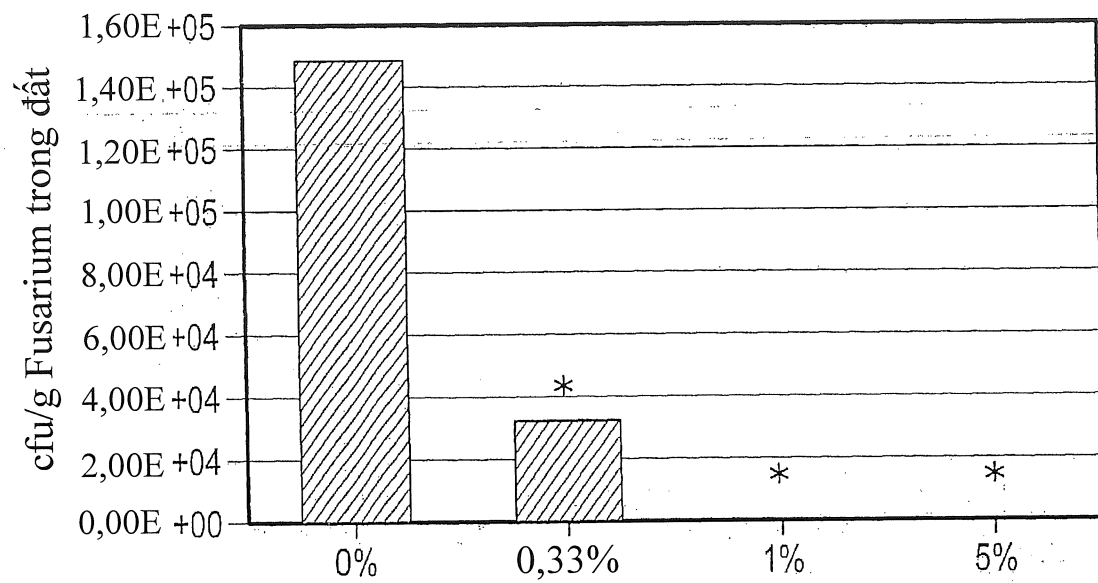


Đối chứng (-) chưa được xử lý với chủng vi khuẩn hoặc môi trường này mầm bất kỳ
 Đối chứng (+) được xử lý bằng môi trường này mầm
 Xử lý với chủng ID được xử lý với canh thang vi khuẩn và môi trường này mầm của bào tử vô tính
 Các cột được đánh dấu * là giảm có ý nghĩa thống kê so với đối chứng (-) ở p nhỏ hơn hoặc bằng 0,05

FIG. 2

3/5

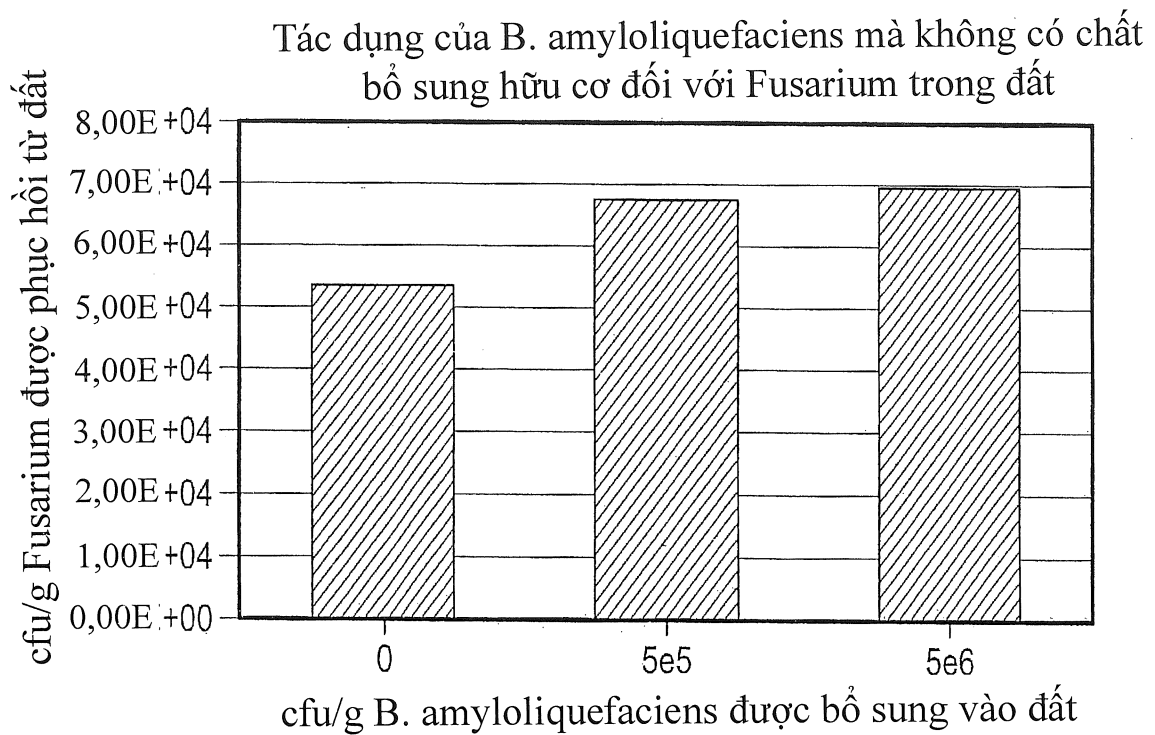
Tác dụng của bột đậu tương và *Bacillus amyloliquefaciens* đối với *Fusarium* trong đất



Tỷ lệ phần trăm bột đậu tương + 5e8 cfu/g *B. amyloliquefaciens*

Mỗi kỹ thuật xử lý được lặp lại 3 lần. * chỉ ra rằng việc xử lý làm giảm có ý nghĩa thống kê P nhỏ hơn 0,05 *Fusarium* thu hồi từ đất so với việc xử lý bằng bột đậu tương 0%

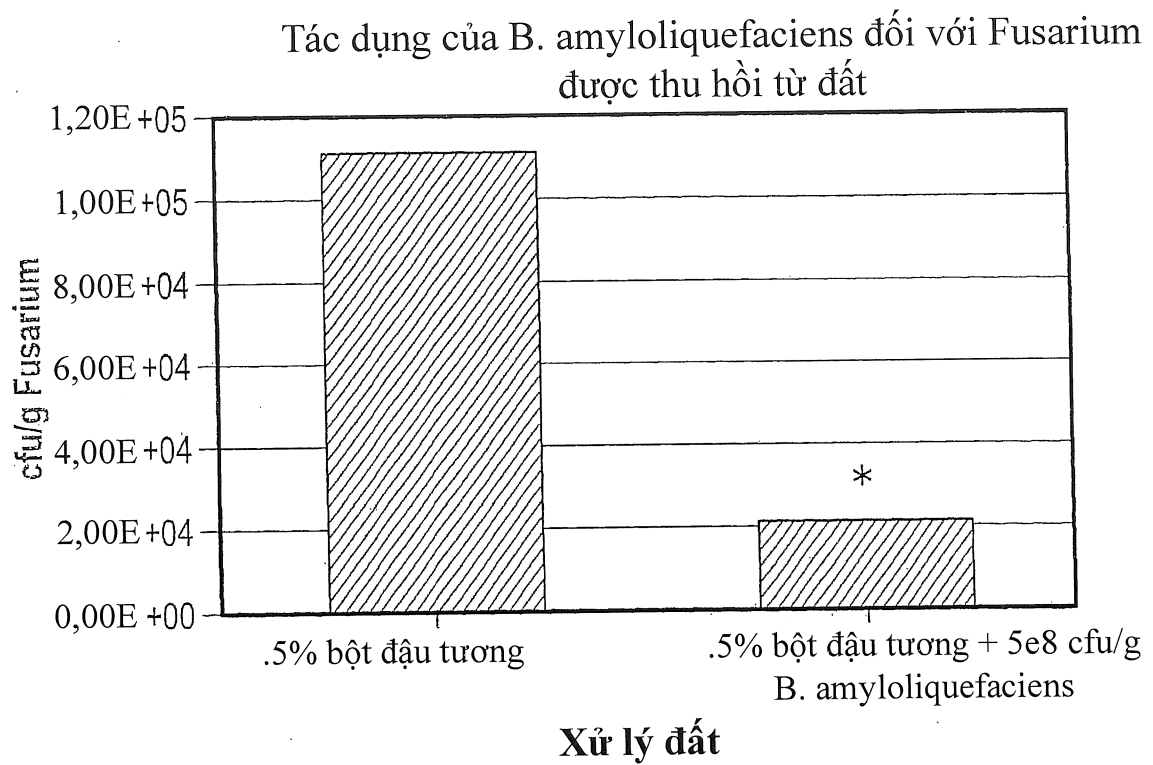
4/5



Mỗi kỹ thuật xử lý được lặp lại 3 lần. *B. amyloliquefaciens* ở mỗi nồng độ không có tác động đến sự phục hồi của *Fusarium*

FIG. 4

5/5



Mỗi kỹ thuật xử lý được lặp lại 8 lần. * chỉ ra là việc xử lý làm giảm có ý nghĩa thống kê P nhỏ hơn 0,05 *Fusarium* được thu hồi từ đất so với chỉ có .5% bột đậu tương

FIG. 5