



(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)



1-0052910

(51)<sup>2006.01</sup> A01N 63/02; A01N 25/22; A01N 25/30; (13) B  
C12R 1/07; A01P 15/00; C12N 1/20;  
C12R 1/02; A01N 25/00

(21) 1-2020-07143

(22) 28/07/2015

(62) 1-2017-00541

(86) PCT/GB2015/052170 28/07/2015

(87) WO2016/016629 04/02/2016

(30) 1413333.4 28/07/2014 GB

(45) 25/11/2025 452

(43) 25/05/2021 398A

(73) AZOTIC TECHNOLOGIES LTD (GB)

R9, Building N2, Chorley Business & Technology Centre, Euxton Lane, Euxton,  
Chorley Lancashire PR7 6TE, United Kingdom

(72) DENT, David (GB); CLARKE, Ian (GB).

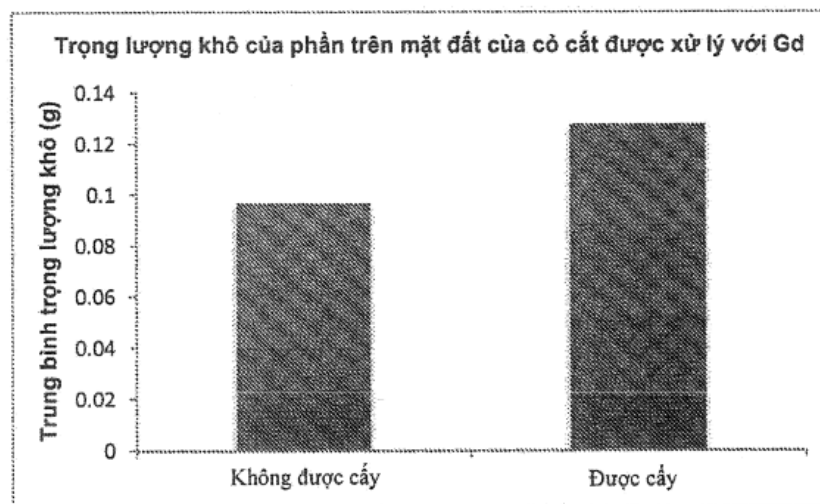
(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) PHƯƠNG PHÁP BAO GỒM VIỆC PHÂN PHỐI CHO CÂY HOẶC HẠT GIỐNG  
CHẾ PHẨM CHỨA GLUCONACETOBACTER DIAZOTROPHICUS, VÀ CÂY  
HOẶC HẠT GIỐNG CHỨA CHẾ PHẨM CHỨA CHỦNG NÀY

(21) 1-2020-07143

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

Fig. 1



### Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

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

### Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

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

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

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

### Bản chất kỹ thuật của sáng chế

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

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

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

### Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Sáng chế sẽ được mô tả cụ thể bằng cách ví dụ có dựa trên các hình vẽ đi kèm, trong đó:

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

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

Fig.3 thể hiện một ví dụ về quy trình chuẩn bị nhân giống chè sinh dưỡng, trong đó Fig.3A minh họa việc loại bỏ phần cắt và Fig.3B thể hiện theo dạng sơ đồ về các phần cắt nhỏ của mỗi phần cắt được lấy để phân lập ADN;

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

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

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

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

Tuy nhiên, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ biết rõ rằng không cần phải có phần mô tả chi tiết cụ thể để thực hành sáng chế. Phần mô tả dưới đây về các phương án cụ thể của sáng chế được trình bày với mục đích minh họa và mô tả. Chúng không có dự định nhằm nêu toàn diện hoặc làm giới hạn sáng chế ở các hình thức chính xác được bộc lộ. Rõ ràng là, có thể có nhiều cải biến và biến thể dựa theo các kiến thức nêu trên. Các phương án được thể hiện và mô tả để giải thích tốt nhất cho các nguyên tắc của sáng chế và các ứng dụng thực tế của nó, để từ đó cho phép người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sử dụng sáng chế tốt nhất và nhiều phương án khác nhau với các cải biến đa dạng được biến đổi phù hợp với cách sử dụng cụ thể được dự liệu.

### **Mô tả chi tiết sáng chế**

Theo một phương án cụ thể, các vi khuẩn cố định nitơ được sử dụng cùng nhau hoặc kết hợp với chủng *Terribacillus*, như được mô tả trong đơn sáng chế quốc tế đang xét nghiệm hưởng quyền ưu tiên từ đơn sáng chế Anh số 1400840.3. Các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng chủng này có thể tăng cường hoạt tính của vi khuẩn cố định nitơ. Các chủng *Terribacillus* thích hợp bao gồm *Terribacillus saccharophilus*, *Terribacillus halophilus*, *Terribacillus goriensis* hoặc *Terribacillus aidingensis* nhưng đặc biệt là chủng *Terribacillus saccharophilus*. *Terribacillus Terribacillus* được sử dụng một mình hoặc trong hỗn hợp với vi khuẩn cố định nitơ nêu trên. *Terribacillus* có thể nằm trong hỗn hợp trộn kỹ với vi khuẩn cố định nitơ, (và trên thực tế thì, IMI501986 (bây giờ là IMI 504998) đã được phân loại là dạng kết hợp của Gd và *Terribacillus*,) hoặc nó có thể được sử dụng ở dạng nuôi cấy đồng thời, hoặc nuôi cấy kết hợp.

Vết thương trên cây có thể là kết quả của tổn thương ngẫu nhiên hoặc tự nhiên, nhờ đó tính khả dụng của nitơ bổ sung có thể tạo điều kiện thuận lợi cho việc sửa chữa sinh trưởng. Tuy nhiên, theo một phương án cụ thể, vết thương này là kết quả của tổn thương do các hoạt động như xén (cỏ sân vườn), cắt (cỏ ủ chua và cỏ khô), tạo chồi mới (cây chuối, cây dừa, cây mía, cây lúa miến, cây lúa gạo, cây đậu thiều, cây bông, cây chuối sợi, cây gai), cắt tia (cây ăn quả, cây nho), do gia súc ăn hoặc do thu hoạch. Các hoạt động khác, ví dụ như bừa, trong đó cây có thể bị tổn thương một cách vô ý hoặc không hoàn toàn, có thể không thích hợp trong một số trường hợp. Cụ thể, vết thương này sẽ được phát hiện ở phần “nằm trên mặt đất” của cây, như lá hoặc thân.

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

Việc phân phối vi khuẩn được thực hiện bằng cách đưa dạng phối trộn thích hợp lên vùng bị tổn thương, cụ thể là, lên bề mặt của vết thương, ở dạng chế phẩm.

Chế phẩm này có thể ở dạng chất lỏng, gel, bột nhão mà có thể được sử dụng trực tiếp hoặc ở dạng được pha loãng, hoặc nó có thể ở dạng chế phẩm dạng rắn như chế phẩm dạng bột hoặc hạt mà sẽ được hòa tan trong chất lỏng như nước trước khi sử dụng. Đối với các chế phẩm dạng rắn, vi khuẩn này thường được sử dụng ở dạng đã sấy khô, ví dụ, ở dạng đông khô, mà có thể hoàn nguyên khi thêm nước vào. Vi khuẩn này có thể được bao vi nang bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực liên quan theo ý muốn, để duy trì khả năng sống và tính ổn định cao của vi khuẩn.

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

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

Các tác giả sáng chế đã phát hiện thấy rằng, ví dụ, đối với một số vi khuẩn nhất định, các tác động đến tính chất như sinh khối, sẽ bị ảnh hưởng bởi lượng vi khuẩn được sử dụng theo cách phụ thuộc vào liều. Điều này có nghĩa là nhiều liều khác nhau có thể được sử dụng tùy thuộc vào mục đích xử lý. Trong trường hợp là cỏ chẳng hạn, có thể cần phải tối đa hóa sinh khối trên đồng cỏ, trong khi đó đối với cỏ sân vườn hoặc bãi cỏ, thì tốc độ sinh trưởng chậm có thể được ưu tiên.

Trong các trường hợp này, lượng vi khuẩn được sử dụng sẽ được chọn để thu được lượng sinh khối tối ưu đối với các loại cỏ mục tiêu, như được minh họa dưới đây.

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

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

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

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

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

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

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

Lượng chất hoạt động bề mặt được sử dụng lên vết thương của cây nên đủ để tạo ra hiệu quả tăng cường sự sinh trưởng của cây khi kết hợp với vi khuẩn cố

định nito (và tùy ý với cả polysacarit như được mô tả thêm dưới đây). Lượng này sẽ thay đổi tùy thuộc vào nhiều yếu tố khác nhau như chất hoạt động bề mặt cụ thể, loại cây được xử lý, bản chất của vết thương, chủng vi khuẩn cố định nito cụ thể được sử dụng và phương pháp sử dụng. Tuy nhiên, thông thường, chế phẩm chứa từ 0,0005 đến 10% thể tích/thể tích, như từ 0,0005 đến 0,5% thể tích/thể tích, ví dụ từ 0,0005 đến 1% thể tích/thể tích, bao gồm từ 0,0005 đến 0,2% thể tích/thể tích, ví dụ từ 0,0005 đến 0,15% thể tích/thể tích như khoảng 0,1% thể tích/thể tích.

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

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

Theo một phương án cụ thể, polysacarit là polysacarit dịch tiết gồm như gồm Arabic, gồm gati, gồm karaya hoặc gồm tragacan. Một ví dụ cụ thể về polysacarit là gồm Arabic.

Gôm Arabica là gôm tự nhiên được gom dưới dạng dịch tiết từ các loài cây keo khác nhau (Fang et al. 2010 (2010) Biomolecules: 11, 1398-1405); phức hệ polysacarit có phạm vi ứng dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực công nghiệp bao gồm sơn, keo, dược phẩm, vật liệu dệt và thực phẩm. Gôm Arabic từ cây keo được cho là polyme phân nhánh của galactosa, rhamnoza, arabinoza, và axit glucuronic

như các muối canxi, magie, và kali với phân tử lượng bằng khoảng 250000. Nó đã cho thấy là (Badar, K.V. et al. (2011) Recent Research in Science and Technology 3 (5) 6-7) có tác dụng đến sự nảy mầm của hạt khi hạt của một số loài cây nhất định được ngâm trong dung dịch 1% của gôm arabica trong 24 giờ trước khi nảy mầm. Hơn nữa, WO02/058466 đã báo cáo rằng một số chế phẩm nhất định chứa hỗn hợp của polysacarit và peptit có thể làm tăng năng suất cây trồng.

Lượng polysacarit được sử dụng lên vết thương của cây nên đủ để tạo ra hiệu quả tăng cường cố định nitơ khi kết hợp với vi khuẩn cố định nitơ và tùy ý với cả chất hoạt động bề mặt. Lượng này sẽ thay đổi tùy thuộc vào nhiều yếu tố khác nhau như polysacarit cụ thể được sử dụng, loại cây được xử lý, bản chất của vết thương, chủng vi khuẩn cố định nitơ cụ thể được sử dụng và phương pháp sử dụng. Tuy nhiên, thường thì sẽ sử dụng chế phẩm chứa polysacarit với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 đến 1% trọng lượng/trọng lượng, ví dụ, từ 0,1 đến 0,5% trọng lượng/trọng lượng như khoảng 0,3% trọng lượng/trọng lượng.

Theo một phương án, chế phẩm chứa cả polysacarit và chất hoạt động bề mặt nông dụng. Trong một số trường hợp, các thành phần này đã được thấy rằng làm tăng cường hiệu quả của vi khuẩn cố định nitơ, và dường như hoạt động hiệp đồng cùng nhau để tạo ra độ tăng cường đáng kể hơn. Các cây được xử lý bằng chế phẩm chứa các thành phần này có thể thể hiện mức độ sinh trưởng tăng lên như được chứng minh bởi sự gia tăng trọng lượng khô của các cây được xử lý đó.

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

Vi khuẩn cố định nitơ như được mô tả ở trên, và cụ thể là *Gluconacetobacter diazotrophicus* có mặt với lượng thích hợp được mô tả ở trên. Tương tự, polysacarit là polysacarit như được mô tả ở trên, như polysacarit dịch tiết gôm, ví dụ, gôm Arabic, và polysacarit có trong chế phẩm với lượng như được mô tả ở trên, ví dụ như ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,1 đến 1% trọng

lượng/trọng lượng polysacarit. Hơn nữa, chất hoạt động bề mặt thích hợp là chất hoạt động bề mặt như được mô tả ở trên như chất tẩy rửa không ion, ví dụ, chất hoạt động bề mặt có 70% là axit béo axit oleic và phần còn lại là hỗn hợp của axit linoleic, axit palmitic và axit stearic.

Theo một phương án cụ thể, chế phẩm này chứa chất hoạt động bề mặt với lượng nằm trong khoảng từ 0,0005 đến 10% thể tích/thể tích, ví dụ, chất hoạt động bề mặt với lượng nằm trong khoảng từ 0,0005 đến 0,2% thể tích/thể tích.

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

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

Sáng chế cho phép vi khuẩn cố định nitơ nội bào được sử dụng và được phân phối cho một phạm vi cây trồng rộng. Cụ thể, chúng có thể là cây lâu năm, cây hai năm, hoặc cây một năm không rụng lá bao gồm nhưng không giới hạn ở

cây ăn quả và cây bụi (ví dụ, cây việt quất, cây mâm xôi và cây chèn), cây nhỏ, cây dùng làm thức ăn gia súc (cây linh lăng và cỏ để ủ chua, để khô hoặc để gia súc ăn ngay) cỏ sân vườn và cây hàng rào, cây lâm nghiệp, cây trồng trọt và thảo mộc (ví dụ, cây họ, cây măng tây, cây cà tím).

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

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

Hơn nữa, sự hình thành khuẩn lạc bởi Gd được thấy rằng có thể làm tăng mức diệp lục trong cây và đặc biệt là trong các loại cỏ như cỏ đồng cỏ, cỏ sân vườn hoặc cỏ bãi cỏ. Do sự gia tăng diệp lục không chỉ liên quan đến hàm lượng nitơ mà còn liên quan đến cả mức độ xanh tươi của cây, nên tính chất này rất được mong đợi trong các ứng dụng như cỏ sân vườn trong đó mức độ xanh tươi cao sẽ có lợi.

## Ví dụ thực hiện sáng chế

### Ví dụ 1

Áp dụng lên cỏ cắt

Phương pháp

Nuôi cấy *G. diazotrophicus*:

*G. diazotrophicus* chủng EVII 501986 (hiện tại là IMI 50998) với plasmid pRGS561 biểu hiện GUS, được nuôi cấy trên môi trường ATGUS, cần có [aga 0,8% (trọng lượng/thể tích), chiết xuất từ nấm men (2,7g l<sup>-1</sup>), glucoza (2,7g l<sup>-1</sup>), manitol (1,8g l<sup>-1</sup>), dung dịch đậm MES (4,4g l<sup>-1</sup>), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (4,8g l<sup>-1</sup>), và KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,65g l<sup>-1</sup>), độ pH = 6,5]. Sự biểu hiện của gen b-glucuronidaza (gusA) được thử nghiệm bằng cách dàn trên môi trường ATGUS chứa X-Gluc (muối xyclohexylamoni của axit 5-brom-4-clo-3-indolyl-beta-D-glucuronic) ở lượng 50mg l<sup>-1</sup>; sự hình thành các khuẩn lạc màu xanh dương đậm chỉ báo sự biểu hiện của gen gusA.

Quy trình cấy:

Huyền phù chứa nước của *G. diazotrophicus* được tạo ra với mật độ quang học ở bước sóng 600nm là 1,1, 10<sup>9</sup> đơn vị hình thành khuẩn lạc (CFU) trong mỗi mililit. Số lượng CFU được xác định bằng cách pha loãng theo dãy, dàn trên môi trường ATGUS (với kháng sinh thích hợp) và đếm các khuẩn lạc vi khuẩn sau 4 ngày cấy trong đĩa Petri (28°C, tối). Huyền phù này được pha loãng đến 10<sup>-4</sup> để tạo ra dung dịch chứa khoảng 100 vi khuẩn trong mỗi ml sẵn sàng để phun như được mô tả dưới đây.

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

Các khay riêng lẻ được đặt trong khay lớn hơn và được cung cấp đủ nước trong phòng sinh trưởng ở chu kỳ 21°C/15°C ngày/đêm 16/8 giờ trong 20 ngày. Sau đó, cỏ được cắt với độ cao là 2cm tính từ mặt đất bằng cách sử dụng kéo (các

mẫu ngắn được loại bỏ) và các hỗn hợp xử lý sau được sử dụng có sử dụng máy phun sương gia dụng cầm tay:

#### Thử nghiệm 1. Hỗn hợp xử lý

Nước đối chứng + sucroza 3%

Gd + nước + sucroza 3%

#### Thử nghiệm 2: Hỗn hợp xử lý

Gd + nước

Gd + nước + sucroza 3%

Gd + nước + Tween 0,1%

Gd + nước + Gôm Arabic 0,3%

Gd + nước + sucroza 3% + Tween 0,1%

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

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

#### Trọng lượng khô của cây giống đã nảy mầm

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

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

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

Các kết quả này được thể hiện trên Fig.2 cho thấy chênh lệch đáng kể ( $P < 0,001$ ) giữa Gd/S/T/GA và trọng lượng khô cao nhất tiếp đó (Gd/T) và Gd/S/T,

chứng minh tác dụng hiệp đồng của hỗn hợp ba thành phần. Gd và Gd/S không có chênh lệch đáng kể với  $P=0,05$ .

#### Ví dụ 2

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

Sinh sản sinh dưỡng từ thân cắt

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

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

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

Sau 3 tháng sinh trưởng, và để xác nhận sự hình thành khuẩn lạc thành công của Gd ở thân cắt, thân cắt không được cấy và thân cắt được cấy được lấy ra từ các bình. Mỗi phần cắt được chia thành các phần là (a) đỉnh chồi, gồm cả vị trí cấy (4)

trên Fig.3B, (b) phần mắt (5) trên Fig.3B, và (C) phần thân dưới gồm mô rỗ bất kỳ (6) trên Fig.3B. Các phần này sau đó được cấp đông nhanh trong nitơ lỏng.

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

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

Các kết quả giải trình tự và BLAST sau đó xác nhận rằng các vạch nhìn thấy ở phần 1 của cây đối chứng là kết quả của liên kết không đặc hiệu của bộ đoạn mồi đã sử dụng, với vạch 4 nhìn thấy ở phần 2 và phần 3 của mô được cấy được nhận diện là *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 (ở độ nhận diện 100%, độ bao phủ trình tự truy vấn 86% và giá trị E là 7e-04). Các kết quả này gợi ý rằng AzGd dù có số bản sao thấp trong mô được cấy vẫn thành công hình thành khuẩn

lạc *Camellia sinensis* sau khi cắt vị trí vết thương. Đây có thể là ví dụ đầu tiên về sự hình thành khuẩn lạc bởi Gd ở cây lâu năm.

### Ví dụ 3

Nghiên cứu về tác dụng của hỗn hợp xử lý đến sinh khối cỏ

Cỏ được trồng trong buồng sinh trưởng cây (Fitotron®) (23°C/15°C ở độ ẩm 65%) trong các khay hạt sử dụng phân trộn John Innes số 1, trong 2 tuần. Sau đó nó được cắt với độ cao 8cm và được phun ngay với 10ml hỗn hợp xử lý như được thiết lập dưới đây bằng cách sử dụng máy phun gia dụng.

Hỗn hợp xử lý

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

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

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

Các kết quả được thể hiện trên Fig.5. Các kết quả này cho thấy rằng, miễn là có một ít sucroza để hỗ trợ sự sinh trưởng của Gd, thì sinh khối của cỏ tăng lên cùng với việc bổ sung Gd tùy thuộc vào chế phẩm. Hơn nữa, sự tăng lên này phụ thuộc vào liều, trong đó sự sinh trưởng tối ưu quan sát được ở  $2,5 \times 10^6$  cfu/ml. Do

đó, nếu cỏ được xử lý là cỏ đồng cỏ trong đó việc tối đa hóa sinh khối là có lợi, thì liều này có thể là có lợi. Tuy nhiên, nếu cỏ được xử lý là cỏ sân vườn hoặc cỏ bãi cỏ, thì sinh khối thấp hơn với độ tươi xanh tăng cường có thể là có lợi ở chỗ nó có thể cải thiện vẻ bề ngoài mà không làm tăng nhu cầu phải cắt hoặc xén thêm nữa. Trong trường hợp này, liều ít hơn hoặc nhiều hơn  $2,5 \times 10^6$  cfu/ml có thể được sử dụng.

#### Ví dụ 4

##### Thử nghiệm thực tế

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

Chế phẩm và nước được sử dụng, trong vòng 30 phút, lên cỏ mới được cắt, bằng cách sử dụng máy phun sương gia dụng để chảy tràn. Mảnh đối chứng được cách ly với mảnh được xử lý bằng màn nhựa. Việc sử dụng này được thực hiện vào buổi chiều muộn khi đứng gió.

Các mảnh  $1\text{m}^2$  được lấy mẫu con bằng cách sử dụng phần tư dây 20cm vuông bằng cách đếm số lượng hoa hình thành hoàn toàn và nở hoàn toàn.

Các kết quả từ mỗi 20cm vuông trong mỗi mảnh được tính trung bình và các kết quả này được thể hiện trên Fig.6. Rõ ràng là việc xử lý Gd, áp dụng theo cách này, có ảnh hưởng đáng kể đến sự phát triển hoa.

#### Ví dụ 5

##### So sánh các thành phần của chế phẩm

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

### Hỗn hợp xử lý

1. Nước

2. Nước + Gd ( $2,5 \times 10^5$  cfu/ml)

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

4. Gôm Arabic 0,3% + Gd ( $2,5 \times 10^5$  cfu/ml)

5. Sucroza 3% + Gd ( $2,5 \times 10^5$  cfu/ml)

6. Tween 0,1% + Gd ( $2,5 \times 10^5$  cfu/ml)

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

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

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

### YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp bao gồm việc phân phối cho cây hoặc hạt giống chế phẩm chứa *Gluconacetobacter diazotrophicus*, polysacarit, và chất tẩy rửa không ion.
2. Cây hoặc hạt giống chứa chế phẩm chứa *Gluconacetobacter diazotrophicus*, polysacarit, và chất tẩy rửa không ion.
3. Phương pháp theo điểm 1, trong đó *Gluconacetobacter diazotrophicus* là chủng được nộp lưu tại CABI ở Anh với số tiếp cận IMI 504958 hoặc số tiếp cận IMI 504998, hoặc biến thể cố định nitơ của chủng này.
4. Cây hoặc hạt giống theo điểm 2, trong đó *Gluconacetobacter diazotrophicus* là chủng được nộp lưu tại CABI ở Anh với số tiếp cận IMI 504958 hoặc số tiếp cận IMI 504998, hoặc biến thể cố định nitơ của chủng này.
5. Chế phẩm hoặc kit chứa *Gluconacetobacter diazotrophicus*, polysacarit, và chất tẩy rửa không ion, trong đó *Gluconacetobacter diazotrophicus* là chủng được nộp lưu tại CABI ở Anh với số tiếp cận IMI 504958 hoặc số tiếp cận IMI 504998, hoặc biến thể cố định nitơ của chủng này.
6. Dung dịch phun cho cây chứa *Gluconacetobacter diazotrophicus*, polysacarit, và chất tẩy rửa không ion.

1/4

Fig. 1

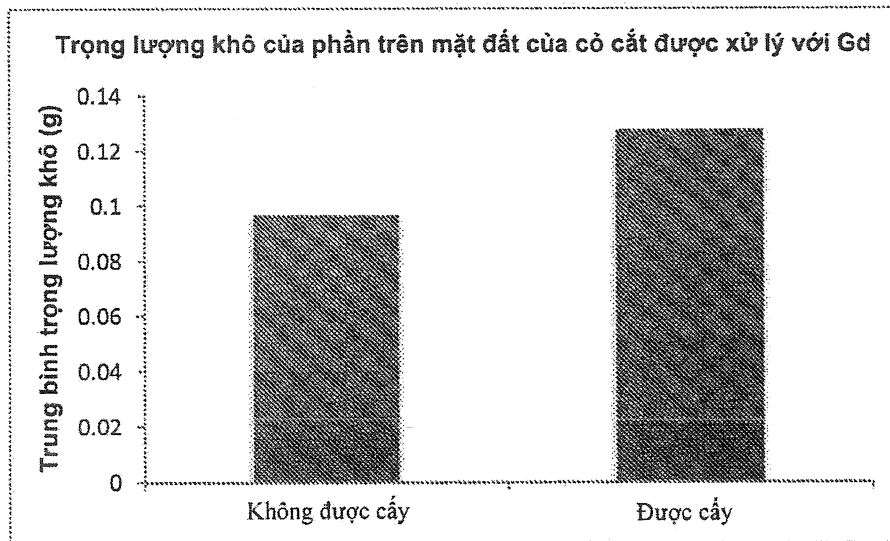
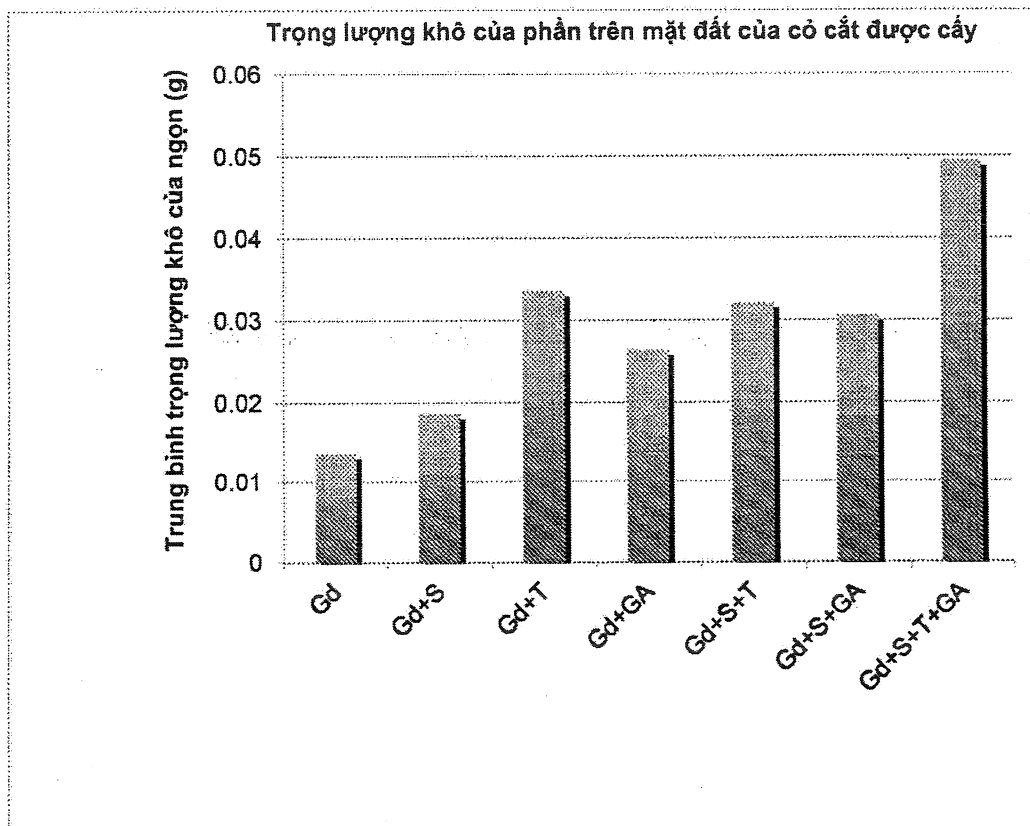
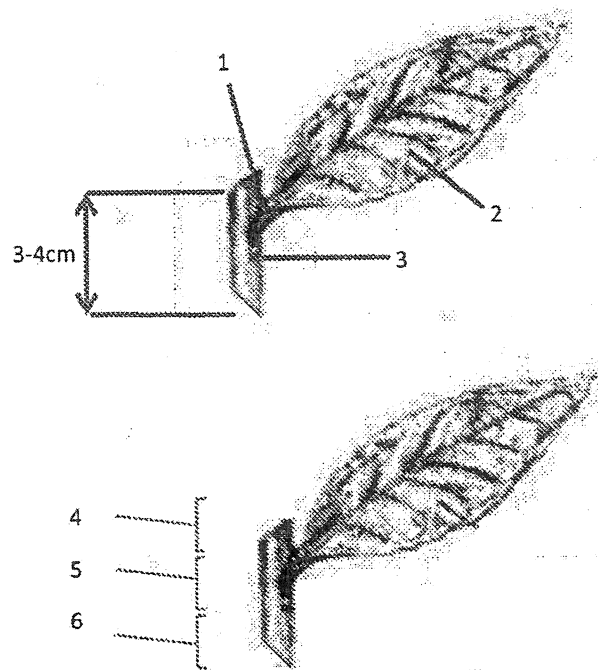


Fig. 2



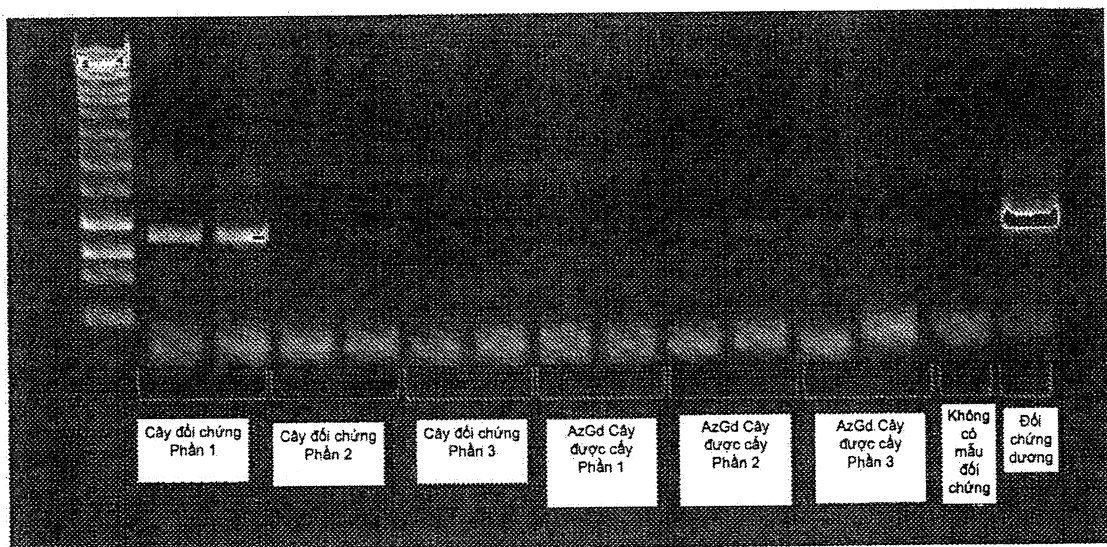
2/4

Fig. 3



B

Fig. 4



3/4

Fig. 5

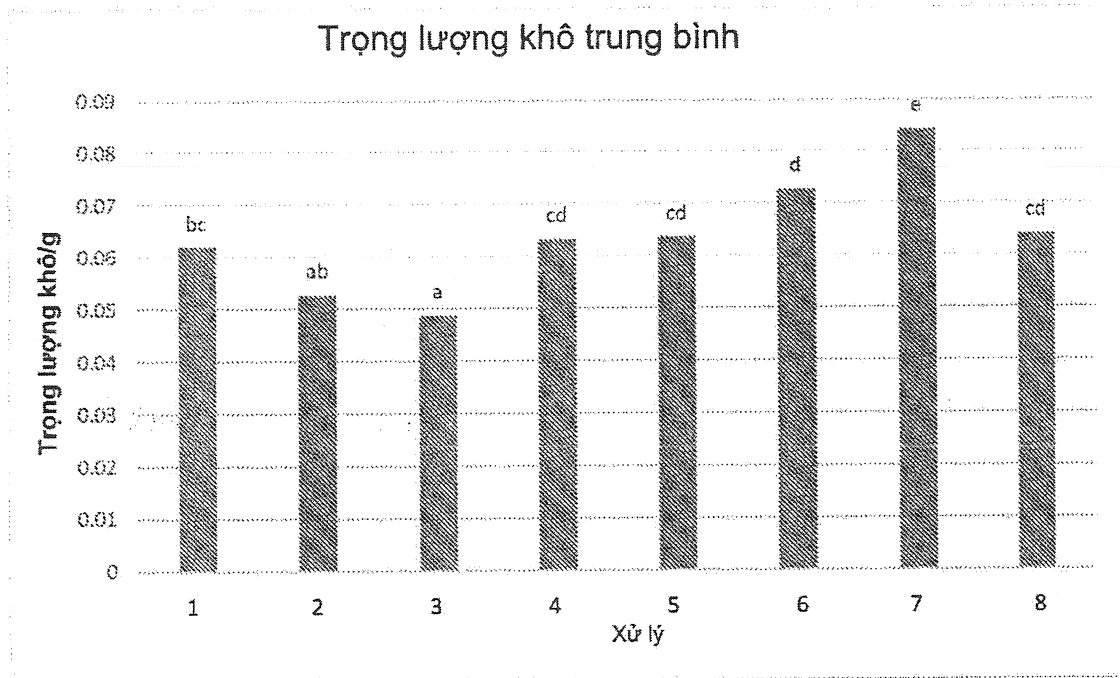
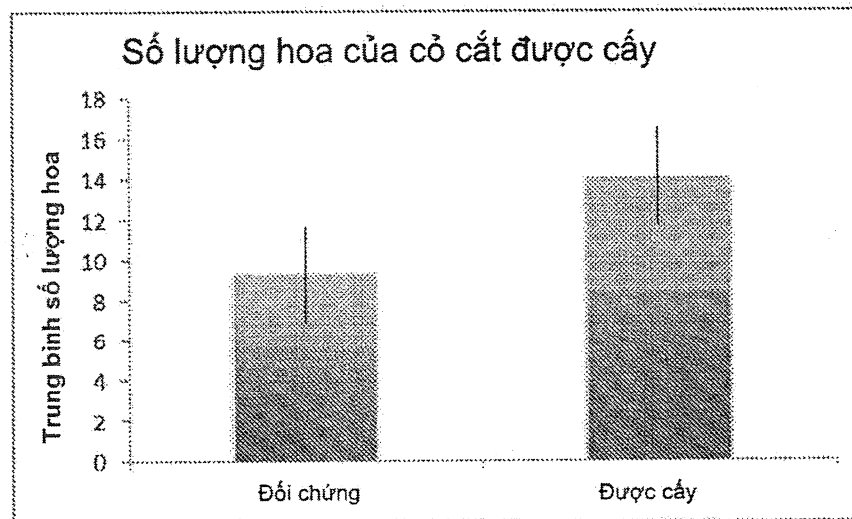


Fig. 6



4/4

Fig. 7

