



(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) 
1-0022334

(51)⁷ **C05C 3/00, 9/02, A01N 25/00**

(13) **B**

(21)	1-2011-01993	(22)	12.01.2010		
(86)	PCT/FR2010/050042	12.01.2010	(87)	WO2010/081987	22.07.2010
(30)	0950151	13.01.2009	FR		
(45)	25.11.2019	380	(43)	27.02.2012	287
(73)	PRP HOLDING (FR) 46-33 Avenue du Maine, 75755 Paris, France.				
(72)	DARIDON, Bruno (FR), VEYRIER, Thibaut (FR)				
(74)	Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)				

(54) **CHẾ PHẨM KHOÁNG DẠNG LÔNG DỪNG ĐỂ CẢI THIỆN KHẢ NĂNG THÍCH ÚNG CỦA THỰC VẬT ĐỐI VỚI SỰ THAY ĐỔI ĐIỀU KIỆN MÔI TRƯỜNG**

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm khoáng dạng lông dừng để phun lên lá, trong đó chế phẩm này có công thức (I) sau:

- tổng nitơ amoniac (N%)	từ 0,08% đến 2%
- kali tính theo K ₂ O (%)	từ 3% đến 6%
- magie tính theo MgO (%)	từ 0,4% đến 0,8%
- natri tính theo Na ₂ O (%)	từ 1% đến 2%
- canxi tính theo CaO (%)	từ 0% đến 0,5%
- tổng sulphat tính theo SO ₃ (%)	từ 3% đến 6%
- tổng phospho tính theo P ₂ O ₅ (%)	0%
- clorua Cl (%)	từ 1% đến 2%
- hydro cacbonat (% của HCO ₃)	từ 1,2% đến 3,0%
- bo (%)	ừ 0,1 đến 0,2%
- đồng (%)	từ 0,018% đến 0,03%
- mangan (%)	từ 0,00005% đến 0,006%
- iot (%)	từ 0,02% đến 0,04%
- kẽm (%)	từ 0,00005% đến 0,006%
- sắt (mg/kg)	từ 0,0002 đến 0,003
- nước	với lượng đủ đến 100%

trong đó tỷ lệ phần trăm là tỷ lệ phần trăm theo khối lượng so với tổng khối lượng chế phẩm, để cải thiện khả năng thích ứng của thực vật đối với sự thay đổi của các điều kiện môi trường.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến lĩnh vực phân bón có tác dụng bảo toàn hoặc cải thiện thể trạng của thực vật, được sử dụng trong nông nghiệp, làm vườn, trồng cây hoặc trong bãi cỏ chăn thả gia súc. Cụ thể là, sáng chế đề cập đến chế phẩm khoáng dạng lỏng dùng để cải thiện khả năng thích ứng của thực vật đối với sự thay đổi điều kiện môi trường.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Đặc điểm của thực vật trong quá trình sinh trưởng, phát triển, tích lũy sinh khối và thu hoạch phụ thuộc đặc biệt vào khả năng thích ứng của thực vật đối với sự thay đổi các điều kiện môi trường, bao gồm các hiện tượng stress vật lý, hoá học và sinh học gây ra.

Ví dụ, đã phát hiện ra rằng các hiện tượng stress như stress do nước, stress do thâm thấu hoặc stress do nhiệt là các yếu tố hạn chế sự phát triển của thực vật và vì vậy ảnh hưởng đến việc sản xuất trong lĩnh vực nông nghiệp, làm vườn, trồng cây và bãi cỏ chăn thả gia súc. Khi thực vật tiếp xúc với các điều kiện nhiệt hoặc khô hạn, thì thực vật thường có sản lượng thấp về sinh khối thực vật, hạt giống, quả và các sản phẩm khác mà người hoặc động vật, kể cả gia súc, có thể ăn được. Sự mất mùa, bao gồm việc giảm sản lượng các nguyên liệu thực vật có thể khai thác, ví dụ trong quá trình trồng lúa, ngô hoặc lúa mì, do các hiện tượng stress gây ra, cũng góp phần gây thiếu hụt lương thực ở một số nước đang phát triển.

Các hiện tượng stress gây ra cơ chế phòng thủ sinh lý trong thực vật, huy động nguồn dự trữ cho phép thực vật sống sót và bảo toàn thể trạng của nó, làm gây hại đến

nguồn dự trữ dùng để duy trì việc sản xuất ban đầu của nguyên liệu thực vật mong muốn.

Nói chung, đã biết nhiều giải pháp kỹ thuật sinh học hoặc hoá học được tạo ra để bảo vệ thực vật ít nhất một phần tránh khỏi hậu quả của các hiện tượng stress bên ngoài.

Đặc biệt quan tâm là kỹ thuật biến đổi di truyền trên thực vật được tính toán để tạo ra thực vật chuyển gen có các đặc tính có thể di truyền như khả năng chịu stress cao, như được mô tả, ví dụ, trong Công bố đơn quốc tế số WO2007/125531, WO2007/060514, WO2008/050350 và W2008/145675. Tuy nhiên, đây là các kỹ thuật đặc biệt, mất nhiều thời gian và tốn kém, do cần phải được lặp lại trên mỗi loại thực vật cần biến đổi di truyền. Ngoài ra, ở nhiều quốc gia, hiện nay vẫn còn áp dụng các điều luật cấm hoàn toàn hoặc gần như hoàn toàn việc trồng các loại thực vật biến đổi di truyền trên các thửa ruộng.

Theo cách khác để giải quyết vấn đề khả năng chống chịu stress của thực vật, ngày nay người ta đã dùng các chế phẩm phân bón hữu cơ hoặc hữu cơ-khoáng, đặc biệt các chế phẩm dạng lỏng có các đặc tính chung hoặc đặc hiệu chống lại sự thiếu hụt các thành phần dinh dưỡng. Các chế phẩm đã biết này được tính toán để kích thích phản ứng phòng thủ tự nhiên của thực vật chống lại stress do sinh vật gây bệnh, ví dụ các chế phẩm bao gồm các chất được chiết từ thực vật, sản phẩm thủy phân của các polyme dùng trong nông nghiệp, dịch chiết của vi sinh vật, các polysacarit tự nhiên hoặc được biến đổi, hormon thực vật, peptit, protein hoặc chất chủ vận hoặc chất đối kháng của các protein thực vật đã biết có liên quan đến cơ chế phòng thủ của thực vật.

Các chế phẩm nêu trên đã chứng minh được hiệu quả, đặc biệt để điều chỉnh sự thiếu hụt các thành phần dinh dưỡng hoặc để kích thích sự phòng thủ của thực vật chống lại các sinh vật gây bệnh, như một số virus, vi sinh vật hoặc côn trùng nhất định.

Tuy nhiên, theo sự hiểu biết của tác giả sáng chế, hiện nay không có chế phẩm thuần khoáng chất nào có khả năng bảo vệ hoặc kích thích thực vật chống lại các hiện

tượng stress dạng không phải sinh học, như các điều kiện stress do nước, stress do thẩm thấu hoặc stress do nhiệt, đồng thời góp phần vào phản ứng của thực vật chống lại kẻ tấn công giàu chitin, như nấm.

Trong tất cả các trường hợp, do có tầm quan trọng về mặt kinh tế và tầm quan trọng của thực vật dùng làm thực phẩm cho con người hoặc động vật sử dụng, đặc biệt thực vật tạo ra sản xuất sản lượng chất lượng cao trong nông nghiệp, làm vườn, trồng cây và bãi cỏ chăn thả gia súc, trong lĩnh vực này hiện nay vẫn có nhu cầu tìm ra các chế phẩm khác được cải tiến hơn, với giá cả chấp nhận được so với các chế phẩm đã biết.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến chế phẩm khoáng dạng lỏng, trong đó chế phẩm này có công thức (I) như được nêu cụ thể trong phần mô tả dưới đây, để cải thiện khả năng thích ứng của thực vật đối với sự thay đổi của các điều kiện môi trường.

Chế phẩm khoáng dạng lỏng có công thức (I) có dạng đậm đặc, được sử dụng trực tiếp để phun lên lá, ở dạng pha loãng trong nước hoặc trong chất lỏng.

Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến chế phẩm khoáng dạng lỏng có công thức (I) được mô tả dưới đây, để cải thiện khả năng thích ứng của thực vật đối với hiện tượng stress sinh học hoặc stress không phải sinh học.

Các hiện tượng stress không phải sinh học bao gồm stress do nước, stress do thẩm thấu, stress do nhiệt hoặc sự thiếu hụt dưỡng chất.

Các hiện tượng stress sinh học bao gồm việc tiếp xúc với hoặc bị nhiễm từ các loài sinh vật, bao gồm vi sinh vật gây bệnh chứa chitin và các chất được tạo ra hoặc thu được từ các loài sinh vật khác nhau này kể cả chitin.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Các Fig. 1A và Fig. 1B thể hiện đường cong đáp ứng canxi của cây con *Arabidopsis thaliana* mười ngày tuổi, thu được khi xử lý bằng lượng chế phẩm có công thức (I) tăng dần. Trên trục x: thời gian tính theo giây. Trên trục y: nồng độ của ion Ca^{2+} trong phần bào tan, tính theo micromol (μM).

Các Fig. 2A và Fig. 2B thể hiện đường cong đáp ứng canxi của cây con *Arabidopsis thaliana* mười ngày tuổi, được gây ra bởi sốc lạnh 24 giờ sau khi xử lý sơ bộ cây này bằng dung dịch không chứa hoặc chứa chế phẩm có công thức (I). Các hình 2A và 2B thể hiện kết quả của hai dãy thử nghiệm giống nhau. Trên trục x: thời gian tính theo giây. Trên trục y: nồng độ của ion Ca^{2+} trong phần bào tan, tính theo micromol (μM).

Fig. 3 thể hiện đường cong của việc sản xuất hydro peroxit (H_2O_2) của cây con *Arabidopsis thaliana* mười ngày tuổi, được gây ra bởi sốc thâm thấu 24 giờ sau khi xử lý sơ bộ cây này bằng dung dịch không chứa hoặc chứa chế phẩm có công thức (I). Trên trục x: thời gian tính theo giây. Trên trục y: đơn vị huỳnh quang tùy ý (tương đối) (arbitrary (relative) luminescence units-RLU).

Fig. 4 thể hiện đường cong của việc sản xuất hydro peroxit (H_2O_2) của cây con *Arabidopsis thaliana* mười ngày tuổi, được gây ra bởi sốc chất kích hoạt (elicitor shock) bằng chất hoá học, chitin, 24 giờ sau khi xử lý sơ bộ cây này bằng dung dịch không chứa hoặc chứa chế phẩm có công thức (I). Trên trục x: thời gian tính theo giây. Trên trục y: đơn vị huỳnh quang tùy ý (RLU).

Fig. 5 thể hiện tác dụng trong thời gian dài của chế phẩm có công thức (I) đối với quá trình sinh trưởng của cây con *Arabidopsis thaliana* được cho chịu các hiện tượng stress khác nhau trước đó. Trên trục y: số đo sự phát triển của rễ của cây con, tính theo xăngtimet trong hai tuần áp dụng các điều kiện stress. Đồ thị hình khối trên trục x: (a) cây con đối chứng không được xử lý và không được chịu stress; (b) cây con đối chứng không được xử lý cho chịu stress do nước bằng NaCl; (c) cây con không

được xử lý cho chịu stress do thẩm thấu bằng manitol; (d) cây con đã được xử lý bằng chế phẩm có công thức (I) và không được chịu stress; (e) cây con đã được xử lý bằng chế phẩm có công thức (I) và được chịu stress do nước bằng NaCl; (f) cây con đã được xử lý bằng chế phẩm có công thức (I) và được chịu stress do thẩm thấu bằng manitol.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau khi tiến hành rất nhiều nghiên cứu, tác giả sáng chế đã tìm ra chế phẩm khoáng dạng lỏng có đặc tính cải thiện khả năng thích ứng của thực vật đối với sự thay đổi của các điều kiện môi trường.

Đặc biệt, đã phát hiện ra rằng chế phẩm khoáng dạng lỏng có công thức (I) như được xác định dưới đây trong bản mô tả sáng chế, khi được sử dụng với độ pha loãng thích hợp, có đặc tính cải thiện khả năng thích ứng của thực vật phản ứng lại sự thay đổi của một số các điều kiện môi trường bao gồm sốc nước, sốc thẩm thấu và phản ứng phòng thủ khi cho tiếp xúc với các chất nhất định từ các loài sinh vật, như nấm.

Vì vậy, sáng chế đề cập đến chế phẩm khoáng dạng lỏng dùng để phun lên lá có công thức (I) sau:

- tổng nitơ amoniac (N%)	từ 0,08% đến 2%
- kali tính theo K ₂ O %.	từ 3% đến 6%
- magie tính theo MgO (%)	từ 0,4% đến 0,8%
- natri tính theo Na ₂ O (%)	từ 1% đến 2%
- canxi tính theo CaO (%)	từ 0% đến 0,5%
- tổng sulphat tính theo SO ₃ (%)	từ 3% đến 6%
- tổng phospho tính theo P ₂ O ₅ (%)	0%

- clorua Cl (%)	từ 1% đến 2%
- bicacbonat (% của HCO_3)	từ 1,2% đến 3,0%
- bo (%)	0, từ 1% đến 0,2%
- đồng (%)	từ 0,018% đến 0,03%
- mangan (%)	0,00005% - 0,006%
- iot (%)	từ 0,02% đến 0,04%
- kẽm (%)	0,00005% - 0,006%
- sắt (mg/kg)	0,0002% đến 0,003%
- nước	với lượng đủ đến 100%

trong đó tỷ lệ phần trăm là tỷ lệ phần trăm theo khối lượng so với tổng khối lượng chế phẩm, để cải thiện khả năng thích ứng của thực vật đối với sự thay đổi của các điều kiện môi trường.

Chế phẩm khoáng chất có công thức (I) gồm có chế phẩm khoáng chất ở dạng cô đặc. Để phun lên lá, chế phẩm khoáng dạng lỏng có công thức (I) được pha loãng một cách thích hợp trong nước hoặc trong chất lỏng.

Để xác nhận chế phẩm có đặc điểm định tính và định lượng trong các thành phần khoáng chất của chế phẩm có công thức (I), tốt hơn là người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sử dụng các kỹ thuật thử nghiệm đã biết cho dạng chế phẩm này.

Ví dụ, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể sử dụng các kỹ thuật phân tích chế phẩm sau:

(i) đối với hàm lượng nitơ ở dạng amoniac, phương pháp được Conway mô tả được sử dụng (European Community Directive No. 71/393, được sửa đổi theo European Directive No. 73/47 và n° 81/681),

(ii) đối với hàm lượng kali, kỹ thuật thử nghiệm K_2O được sử dụng theo tiêu chuẩn của Pháp NF U 44-140 và kỹ thuật phát xạ ngọn lửa,

(iii) đối với hàm lượng magie, kỹ thuật thử nghiệm được mô tả theo tiêu chuẩn của Pháp số NF U 44-140 và NF U 44-146 và kỹ thuật hấp phụ nguyên tử được sử dụng,

(iv) đối với hàm lượng natri Na_2O , kỹ thuật thử nghiệm được mô tả theo tiêu chuẩn của Pháp số NF U 44-140 và kỹ thuật quang kế ngọn lửa được sử dụng,

(v) đối với hàm lượng canxi, kỹ thuật phổ hấp phụ nguyên tử được xác định theo tiêu chuẩn của Pháp số NF U 44-140 và kỹ thuật hấp phụ nguyên tử được sử dụng,

(vi) đối với tổng sulphat hàm lượng, phương pháp được xác định theo tiêu chuẩn Châu Âu số CEE 8.1 và kỹ thuật phân tích trọng lượng được sử dụng,

(vii) đối với thử nghiệm tổng phospho tính theo tỷ lệ phần trăm (khối lượng) của P_2O_5 , kỹ thuật được xác định theo tiêu chuẩn NF U 42-241 (CEE 3.1) và NF U 42-246 (đo quang phổ) được sử dụng,

(viii) đối với hàm lượng clorua, phương pháp được xác định theo tiêu chuẩn của Pháp số NF U 42-371 được sử dụng,

(ix) đối với hàm lượng bicarbonat, kỹ thuật thử nghiệm ion hydro cacbonat phương pháp được mô tả trong tiêu chuẩn của Pháp số NF EN ISO 9963-1 (T 90-036) được sử dụng,

(x) đối với hàm lượng bo, kỹ thuật thử nghiệm được xác định theo tiêu chuẩn Châu Âu số CEE 9-1 và số CEE 9-5 được sử dụng, nếu nồng độ cuối cùng nhỏ hơn

10% (khối lượng) hoặc tiêu chuẩn Châu Âu số CEE 10-1 và số CEE 10-5 nếu nồng độ cuối cùng lớn hơn 10% (khối lượng),

(xi) đối với hàm lượng đồng, kỹ thuật thử nghiệm được xác định theo tiêu chuẩn Châu Âu số CEE 9-1 và số CEE 9-7 và kỹ thuật hấp phụ nguyên tử được sử dụng,

(xii) đối với hàm lượng mangan, kỹ thuật thử nghiệm được xác định theo tiêu chuẩn số ICP NF EN ISO 11885 được sử dụng,

(xiii) đối với hàm lượng iot, kỹ thuật sau được sử dụng: mẫu được khử thành tro theo phương pháp điều chế Grote-Krekeler (thả ống thạch anh theo tiêu chuẩn DIN 53 474 vào nồi nấu kim loại bằng sứ nhỏ). Iot được hấp thụ trong natri hydroxit, sau đó phép đo quang thử nghiệm tiến hành sử dụng phương pháp Sandell-Kolthoff (có tác dụng xúc tác của cặp oxy hóa khử Ce (IV)/ As(III) ở bước sóng 436 nm),

(xiv) đối với hàm lượng kẽm, kỹ thuật thử nghiệm được xác định theo tiêu chuẩn ICP NF EN ISO 11885 được sử dụng, và

(xv) đối với hàm lượng sắt, kỹ thuật thử nghiệm được xác định theo tiêu chuẩn ICP NF EN ISO 11885 được sử dụng.

Theo phương án được ưu tiên, chế phẩm có công thức (I) gồm chế phẩm bao gồm các thành phần hoặc hợp chất khoáng chất duy nhất. Theo phương án này, chế phẩm có công thức (I) gồm chế phẩm hoàn toàn hoặc duy nhất khoáng chất và do vậy không chứa thành phần hoặc hợp chất hữu cơ, có nghĩa là không chứa hợp chất hydrocacbon. Ví dụ, chế phẩm có công thức (I) không chứa vitamin, axit amin, đường, axit hoặc bazơ hữu cơ, v.v..

Theo đặc điểm khác, chế phẩm có công thức (I) tồn tại ở dạng cô đặc, thường được pha loãng trước khi sử dụng cho thực vật.

Để sản xuất chế phẩm có công thức (I) nêu trên, tốt hơn là người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này tham khảo các phần mô tả của bản mô tả này, kể cả ví dụ.

Thuật ngữ “thực vật” được sử dụng trong bản mô tả này được dùng để chỉ thực vật một lá mầm và hai lá mầm.

Thực vật, trong ngữ cảnh của sáng chế, bao gồm thực vật được sử dụng trong nông nghiệp, làm vườn, trồng cây và bãi cỏ chăn thả gia súc.

Đáng chú ý là thực vật bao gồm các cây ngũ cốc chính, cây ăn quả và hoa. Thực vật đáng chú bao gồm cây lúa mỳ, cây lúa mạch, cây cải dầu, cây ngô và cây lúa và cây ăn quả như cây táo, lê, mận, đào và mơ.

Cây hai lá mầm bao gồm các loài và họ sau: *Nymphaeaceae*, *Ceratophyllaceae*, *Ranunculaceae*, *Papaveraceae*, *Fumariaceae*, *Ulmaceae*, *Cannabaceae*, *Urticaceae*, *Myricaceae*, *Fabaceae*, *Betulaceae*, *Aizoaceae*, *Chenopodiaceae*, *Portulacaceae*, *Caryophyllaceae*, *Polygonaceae*, *Plumbaginaceae*, *Elatinaceae*, *Guttiferae/Hypericaceae/Clusiaceae*, *Malvaceae*, *Malvaceae*, *Droseraceae*, *Violaceae*, *Cucurbitaceae*, *Salicaceae*, *Cruciferae/Brassicaceae*, *Resedaceae*, *Empetraceae*, *Ericaceae*, *Pyrolaceae*, *Monotropaceae*, *Primulaceae*, *Grossulariaceae*, *Crassulaceae*, *Saxifragaceae*, *Rosaceae*, *Leguminosae/Fabaceae*, *Elaeagnaceae*, *Hallogaraceae*, *Lythraceae*, *Onagraceae*, *Viscaceae*, *Celastraceae*, *Aquifoliaceae*, *Euphorbiaceae*, *Rhamnaceae*, *Linaceae*, *Polygalaceae*, *Aceraceae*, *Oxalidaceae*, *Geraniaceae*, *Balsaminaceae*, *Araliaceae*, *Umbelliferae/Apiaceae*, *Gentianaceae*, *Apocynaceae*, *Solanaceae*, *Convolvulaceae*, *Cuscutaceae*, *Menvanthaceae*, *Boraginaceae*, *Lamiaceae*, *Hippuridaceae*, *Callitrichaceae*, *Plantaginaceae*, *Buddlejaceae*, *Oleaceae*, *Scrophulariaceae*, *Orobanchaceae*, *Lentibulariaceae*, *Campanulaceae*, *Rubiaceae*, *Caprifoliaceae*, *Adoxaceae*, *Valerianaceae*, *Dipsacaceae* và *Compositae/Acteraceae*.

Thuật ngữ “khả năng thích ứng” của thực vật được sử dụng trong bản mô tả này được dùng để chỉ bất kỳ các biến đổi sinh lý có thể phát hiện được của thực vật sau khi áp dụng sự thay đổi nhanh của các điều kiện môi trường vào thực vật nêu trên. Các biến đổi sinh lý có thể phát hiện được bao gồm sự biến đổi bất kỳ với lượng hoặc nồng độ của một hoặc một vài chất chuyển hóa mô, bao gồm chất chuyển hóa nội bào hoặc sự biến đổi bất kỳ có thể phát hiện được về mặt định tính hoặc định lượng hoạt tính enzym của thực vật nêu trên hoặc sự biến đổi bất kỳ có thể phát hiện được về hình thái học của thực vật nêu trên. Đáp ứng thích ứng của thực vật đáng chú ý là dẫn đến việc sản xuất chất chuyển hóa của các tế bào thực vật được gọi là “chất truyền tin thứ hai”. Chất truyền tin thứ hai bao gồm ion canxi và các loại oxy hoạt động (reactive oxygen species-ROS).

“Các điều kiện môi trường” bao gồm các điều kiện nước, các điều kiện độ mặn, các điều kiện thẩm thấu, các điều kiện oxy hóa và các điều kiện nhiệt. Sự thay đổi nhanh trong các điều kiện môi trường của thực vật còn được gọi là “sốc” hoặc “stress” trong bản mô tả sáng chế. Các điều kiện môi trường bao gồm (i) các điều kiện “sinh học” là kết quả của môi trường sinh học của thực vật và (ii) các điều kiện “không phải sinh học” là kết quả của môi trường vật lý và hoá học của thực vật.

Sự thay đổi các điều kiện môi trường gồm có stress hoặc sốc không phải sinh học bao gồm stress hoặc sốc do muối, thẩm thấu, oxy hóa, nhiệt và nước và sốc do thực vật tiếp xúc với các chất độc gây ra như một số kim loại nhất định hoặc một số hóa chất hữu cơ độc tổng hợp nhất định hoặc một số các khoáng chất tự nhiên hoặc tổng hợp nhất định. Chúng cũng bao gồm việc tiếp xúc với bức xạ ion hóa hoặc phi ion hóa và sự thiếu hụt hoặc dư thừa chất dinh dưỡng.

Stress hoặc sốc do muối có thể do khi thực vật phát triển trên vùng đất có hàm lượng natri clorua cao, ví dụ trong khu ruộng ven biển hoặc đồng cỏ. Stress do muối chủ yếu dẫn đến việc phải điều tiết sự cân bằng tự nhiên và sự phân phối ion trong mô thực vật, dẫn đến sự thay đổi trong quá trình nảy mầm của hạt và phát triển của thực vật.

Stress do thẩm thấu hoặc sốc có thể cũng được gây ra một cách không tự nhiên do sự phát triển trong chất nuôi giàu manitol. Stress do thẩm thấu chủ yếu dẫn đến việc phi điều tiết sự cân bằng tự nhiên và sự phân phối ion trong mô thực vật, dẫn đến sự thay đổi trong quá trình nảy mầm của hạt và sự phát triển của thực vật.

Stress hoặc sốc do oxy hóa có thể xuất hiện không tự nhiên do sự phát triển trên methyl viologen. Stress do oxy hóa chủ yếu gây ra sự tạo thành các loại oxy hoạt động (ROS), sự biến tính protein và phân hủy chất diệp lục, dẫn đến việc tẩy trắng thực vật và có thể làm cho thực vật bị chết.

Stress hoặc sốc do nhiệt bao gồm stress do nhiệt gây ra và stress do lạnh gây ra. Stress gây ra do sự phát triển ở nhiệt độ cao chủ yếu làm biến tính các protein, dẫn đến sự thay đổi quá trình phát triển của thực vật. Stress gây ra do sự phát triển trong điều kiện lạnh chủ yếu tạo thành loại oxy hoạt động và phá vỡ màng tế bào, dẫn đến sự thay đổi quá trình phát triển của thực vật.

Stress do nước có thể xuất hiện do sự phát triển trong các điều kiện khô. Stress do nước chủ yếu ngăn chặn quá trình phát triển và sinh tổng hợp, dẫn đến sự thay đổi của quá trình phát triển của thực vật.

Sự thay đổi trong các điều kiện môi trường gồm có stress sinh học hoặc sốc bao gồm stress hoặc sốc do việc cho thực vật tiếp xúc với sinh vật đơn bào hoặc đa bào gây ra, ví dụ vi khuẩn, virus, nấm, sinh vật ăn thực vật, côn trùng hoặc sinh vật gây bệnh hoặc stress hoặc sốc do việc cho thực vật tiếp xúc với các chất có nguồn gốc từ sinh vật đơn bào hoặc đa bào gây ra. Stress sinh học có thể do vi khuẩn, virus hoặc nấm hoặc bộ phận của chúng hoặc các chất có nguồn gốc từ vi khuẩn, virus hoặc nấm gây ra.

Chế phẩm có công thức (I) theo sáng chế có đặc tính trực tiếp gây ra con đường sinh lý liên quan đến khả năng thích ứng của thực vật đối với sự thay đổi của các điều kiện môi trường, đáng chú ý là gây ra đường truyền tín hiệu canxi, như được thể hiện bằng tác dụng làm tăng nồng độ của ion Ca^{2+} như được trình bày trong phần Ví dụ. Do

vậy, chế phẩm có công thức (I) gây ra các dạng biến thể của canxi trong phần bào tan của tế bào, hàm lượng của chúng phụ thuộc vào lượng chế phẩm có công thức (I) được cho tiếp xúc với thực vật này.

Cũng chứng tỏ được rằng chế phẩm có công thức (I) gây ra sự thay đổi đáp ứng của thực vật với stress không phải sinh học, như sốc lạnh chẳng hạn.

Tương tự, các kết quả được nêu trong phần Ví dụ chứng tỏ rằng chế phẩm có công thức (I) theo sáng chế có khả năng kích thích sự gia tăng việc sản xuất hydro peroxit (H_2O_2) để phản ứng lại việc áp dụng stress do thẩm thấu.

Vì vậy, theo một số khía cạnh nhất định, việc cải thiện khả năng thích ứng của thực vật được gây ra bởi chế phẩm có công thức (I), trong phạm vi của sáng chế, bao gồm:

(i) đặc tính gia tăng đáp ứng canxi có thể phát hiện được của thực vật với stress không phải sinh học hoặc sinh học, sự gia tăng đáp ứng canxi được phát hiện bằng cách đo nồng độ của ion Ca^{2+} trong mô thực vật và đặc biệt trong phần bào tan của các tế bào thực vật; và

(ii) đặc tính gia tăng việc sản xuất hydro peroxit có thể phát hiện được trong mô thực vật để đáp ứng với stress không phải sinh học hoặc sinh học.

Sự thật là chế phẩm có công thức (I) theo sáng chế có đặc tính gia tăng đáp ứng canxi của thực vật phản ứng lại stress sinh học hoặc stress không phải sinh học rất quan trọng, vì ion canxi được tạo ra vào thời điểm đáp ứng canxi đã được biết đến trong tình trạng kỹ thuật dưới dạng loài được gọi là “chất truyền tin thứ hai” trong đường truyền tín hiệu trao đổi chất và theo thời gian cục bộ rất cao trong quy trình theo bậc nhằm gây ra khả năng thích ứng của thực vật đã được cho chịu stress sinh học hoặc stress không phải sinh học. Đã biết là sự gia tăng nồng độ ion canxi gây ra việc hoạt hoá các protein có ái lực với ion này, như canxiprotein. Sau đó, canxiprotein đã hoạt hoá hoạt hóa các protein có hoạt tính enzym khác, như kinaza hoặc các protein không phải enzym hoạt hóa khác, như các protein “bom” (Sanders, D., Brownlee, C.,

and Harper, J.F. (1999). Communicating with calcium. *Plant Cell* 11, 691-706.

Shapiro, A.D. (2005). Nitric oxide signaling in plants. *Plant Hormones VOL* 72, 339-398;

Brownlee, C. (2003). Plant signalling: Calcium first and second. *Current Biology* 13, R923-R924.

Hetherington, A.M., and Brownlee, C. (2004). The generation of Ca^{2+} signals in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 55, 401-427.

Harper, J.F., Breton, G., and Harmon, A. (2004). Decoding Ca^{2+} signals through plant protein kinase. *Annu Rev Plant Biol* 55, 263-288.

Mori, I.C., Murata, Y., Yang, Y.Z., Munemasa, S., Wang, Y.F., Andreoli, S., Tiriác, H., Alonso, J.M., Harper, J.F., Ecker, J.R., Kwak, J.M., and Schroeder, J.I. (2006). CDPKs CPK6 and CPK3 function in ABA regulation of guard cell S-type anion- and Ca^{2+} -permeable channels and stomatal closure - art. no. e327. *Plos Biology* 4, 1749-1762.

George, L., Romanowsky, S.M., Harper, J.F., and Sharrock, R.A. (2007). The ACA10 Ca^{2+} ATPase Regulates Adult Vegetative Development and Inflorescence Architecture in Arabidopsis. *Plant Physiol.*

Các quy trình theo bậc này giúp cho sự phát triển khả năng thích ứng đặc hiệu của thực vật, để phản ứng lại stress ban đầu. Để làm ví dụ về khả năng thích ứng của thực vật, có thể đề cập đến sự đóng kín khí khổng để hạn chế sự mất nước trong giai đoạn stress do nước, việc sản xuất osmolyt bảo vệ để phản ứng lại stress do nhiệt hoặc thẩm thấu và việc sản xuất chất độc nội sinh có tác dụng hạn chế sự tiến triển của sinh vật gây bệnh.

Thực tế là chế phẩm có công thức (I) theo sáng chế có đặc tính gia tăng đáp ứng oxy hóa của thực vật, đặc biệt là việc sản xuất các loại oxy hoạt động, để phản ứng lại stress sinh học hoặc stress không phải sinh học là quan trọng. Cụ thể hơn, đặc biệt có lợi nếu chế phẩm có công thức (I) theo sáng chế làm tăng đáng kể việc sản xuất hydro peroxit, là loại oxy hoạt động ổn định nhất và do đó, là hợp chất "chất truyền tin thứ hai", có thể gây ra từ xa các phản ứng của tế bào cần để tạo ra đáp ứng hoạt động của thực vật. Cần phải nhớ rằng việc sản xuất các loại oxy hoạt động gây ra sự khởi đầu phần lớn các khả năng thích ứng của thực vật với stress không phải sinh học. Cũng cần chỉ ra rằng các khả năng thích ứng của thực vật phản ứng lại stress sinh học hoặc stress không phải sinh học dẫn đến việc sản sinh các loại oxy hoạt động bao gồm: sự tiêu hao nhiệt của năng lượng dư, sự tiêu hao quang hóa của năng lượng bổ sung sử dụng oxy

làm chất nhận mạch vận chuyển điện tử, việc sử dụng toàn bộ dãy enzym và các phân tử chống oxy hóa để giải độc ROS được tạo ra, việc liên quan đến enzym chống oxy hóa (superoxit dismutaza, catalaza, glutathion peroxidaza, ascorbat peroxidaza, cặp thioređoxin/thioređoxin ređuctaza, các protein sốc nhiệt), việc liên quan đến các protein mang sắt và đồng (transferrin, ferritin), việc liên quan đến các phân tử chống oxy hóa nhỏ: glutathion, carotenoit, vitamin A, C (axit ascorbic), E (tocopherol), ubiquinon, flavonoit, bilirubin và việc liên quan đến nguyên tố vi lượng (đồng, kẽm, selenium) là các đồng nhân tố sống còn đối với hoạt tính chống oxy hóa của enzym.

Vì vậy, theo một trong số các khía cạnh, sáng chế đề xuất chế phẩm có công thức (I), trong đó nó cải thiện khả năng thích ứng của thực vật đối với stress sinh học hoặc stress không phải sinh học.

Theo phương án nhất định, sáng chế đề xuất chế phẩm có công thức (I), khác biệt ở chỗ stress không phải sinh học được chọn từ nhóm bao gồm stress do nước, stress do thâm thấu, stress do nhiệt hoặc sự thiếu hụt dưỡng chất. sự thiếu hụt dưỡng chất bao gồm sự thiếu hụt khoáng chất, kể cả sự thiếu hụt nguyên tố vi lượng.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất chế phẩm có công thức (I), khác biệt ở chỗ stress sinh học bao gồm đáng chú ý là việc tiếp xúc với hoặc bị nhiễm, các loài sinh vật, bao gồm vi sinh vật gây bệnh chứa chitin và các chất được tạo ra hoặc thu được từ các loài sinh vật khác nhau này, kể cả chitin.

Ngoài ra, tác giả sáng chế cũng chứng minh rằng theo sáng chế chế phẩm có công thức (I), đáng chú ý là bằng cách phun vào lá, có đặc tính kích thích sự phát triển của rễ thực vật, cả thực vật được trồng trong các điều kiện phát triển bình thường và thực vật được áp dụng ít nhất một điều kiện stress không phải sinh học hoặc sinh học.

Vì vậy, theo khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất chế phẩm có công thức (I) cũng dẫn đến sự gia tăng tốc độ phát triển của rễ thực vật. Sự gia tăng tốc độ phát triển của rễ có thể được chứng minh bằng sự gia tăng tốc độ phát triển của rễ, bằng cách đo độ dài trung bình.

Vì vậy, chế phẩm có công thức (I) gồm có (i) tác dụng gia tăng khả năng thích ứng của thực vật đối với sự thay đổi của các điều kiện môi trường và (ii) và tác dụng kích thích lý học được chứng minh bằng tác dụng gia tăng tốc độ phát triển của rễ.

Vì vậy, sáng chế đề xuất chế phẩm có công thức (I), khi được áp dụng cho thực vật, tốt hơn nếu bằng cách phân tán vào lá, gây ra tác dụng kỹ thuật sau:

- gia tăng đáp ứng canxi của thực vật với stress do nước, stress do thẩm thấu và stress do nhiệt,
- gia tăng phản ứng gây tiết của cơ chế phòng thủ của thực vật by the chất gây tiết chitin,
- cải thiện tình trạng oxy hóa của các tế bào thực vật, bằng cách kích thích việc sản xuất các loại oxy hoạt động, kể cả hydro peroxit (H_2O_2),
- gia tăng tốc độ của sự phát triển của rễ của cây non, và
- gia tăng khả năng chịu đựng khô hạn của cây non.

Đặc biệt, các tác dụng sau của chế phẩm có công thức (I) được nêu trong phần Ví dụ:

A. ở mức chất truyền tín thứ hai của thực vật đáp ứng với stress sinh học/không phải sinh học (Ca^{2+} và H_2O_2) liên quan đến đường truyền tín hiệu:

a) Chế phẩm có công thức (I) được thực vật nhận dưới dạng tác nhân kích thích ngoại sinh được gây ra bởi đường truyền tín hiệu liên quan đến các dạng biến thể của canxi của dịch bào trong các tế bào của cây con *Arabidopsis thalian*. Việc xử lý bằng chế phẩm có công thức (I) gây ra sự thay đổi trong khả năng đáp ứng với stress của thực vật.

b) Việc sản xuất các loại oxy hoạt động như (H_2O_2) để đáp ứng với chất gây tiết chitin ở cây con được xử lý sơ bộ bằng chế phẩm có công thức (I) cao hơn lượng đo

được ở cây con được phun nước. Kết quả này biểu thị sự gia tăng phản ứng phòng thủ của thực vật được xử lý sơ bộ bằng chế phẩm có công thức (I) để đáp ứng với chất gây tiết được các tác nhân gây bệnh tạo ra.

B. ở mức sinh trưởng và phát triển của cây con:

a) Chế phẩm có công thức (I) làm tăng một cách đáng kể sự phát triển của rễ của cây con *Arabidopsis thaliana* trong các điều kiện bình thường hoặc trong các điều kiện stress (thảm thâu hoặc muối).

b) Sự phục hồi hoặc phát triển của cây con được cho chịu stress mạnh do nước, được cải thiện bằng cách xử lý trước bằng chế phẩm có công thức (I). Vì vậy, kết quả của các ví dụ chứng tỏ rằng chế phẩm có công thức (I) có tác dụng có lợi đối với quá trình sinh trưởng và sự phát triển của cây con, cả trong các điều kiện phát triển bình thường và trong các điều kiện stress.

Theo phương án được ưu tiên nhất định, chế phẩm có công thức (II) theo sáng chế sau, được bao hàm bởi công thức (I):

- tổng nitơ amoniac (N%)	từ 0,08% đến 1%
- kali tính theo K ₂ O (%)	3,5% to 4,5%
- magie tính theo MgO (%)	từ 0,4% đến 0,5%
- natri tính theo Na ₂ O (%)	từ 1,2% đến 1,6%
- canxi tính theo CaO (%)	từ 0% đến 0,1%
- tổng sulphat tính theo SO ₃ (%)	từ 3% đến 5%
- tổng phospho tính theo P ₂ O ₅ (%)	0%
- clorua Cl (%)	từ 1% đến 2%
- bicarbonat (% của HCO ₃)	1,5% to 1,9%

- bo (%)	0,từ 1% đến 0,15%
- đồng (%)	0,02từ 0% đến 0,026%
- mangan (%)	từ 0,00005% đến 0,0002%
- iot (%)	0,025% to 0,031%
- kẽm (%)	từ 0,00005% đến 0,0002%
- sắt (%)	0,0002% đến 0,001%
- nước	với lượng đủ đến 100%

trong đó tỷ lệ phần trăm được tính theo tỷ lệ phần trăm theo khối lượng so với tổng khối lượng chế phẩm.

Theo phương án được ưu tiên khác nữa, chế phẩm theo sáng chế có công thức (III) sau, được bao hàm bởi mỗi công thức (I) và (II):

- tổng nitơ amoniac (N%)	0,09%
- kali tính theo K_2O (%)	4%
- magie tính theo MgO (%)	0,45%
- natri tính theo Na_2O (%)	1,40%
- canxi tính theo CaO (%)	0,05%
- tổng sulphat tính theo SO_3 (%)	3,85%
- tổng phospho tính theo P_2O_5 (%)	0%
- clorua Cl (%)	1,40%
- bicacbonat (% của HCO_3)	1,7%
- bo (%)	0,12%

- đồng (%)	0,023%
- mangan (%)	0,00005%
- iot (%)	0,028%
- kẽm (%)	0,00005%
- sắt (%)	0,0003
- nước	với lượng đủ đến 100%

trong đó tỷ lệ phần trăm được tính theo tỷ lệ phần trăm theo khối lượng so với tổng khối lượng chế phẩm.

Đối tượng khác của sáng chế này còn là các chế phẩm bất kỳ được đề cập trong bản mô tả sáng chế, kể cả phần Ví dụ và đáng chú ý là các chế phẩm có công thức (I), (II) và (III).

Theo phương án nhất định, chế phẩm có công thức (I) có thể thu được theo quy trình được nêu trong bảng sau:

- nước lấy từ vôi	với lượng đủ đến 100%
- kali iodua	từ 0,030 đến 0,050 %
- natri clorua	từ 0,8 đến 1,2 %
- axit boric	từ 0,6 đến 1,0 %
- natri cacbonat	từ 2,0 đến 4,0 %
- magie clorua	từ 2,0 đến 4,0 %
- kali sulphat	từ 7,0 đến 1,10 %
- đồng sulphat pentahydrat	từ 0,05 đến 0,15 %

- amoni sulphat

từ 1,5 đến 3,5 %

Tỷ lệ phần trăm nêu trên được tính theo tỷ lệ phần trăm theo khối lượng đối với thành phần, so với tổng khối lượng của chế phẩm lỏng.

Các thành phần khác nhau nêu trên được cho vào nước lấy từ vòi, ở nhiệt độ môi trường, sau đó dung dịch thu được được trộn kỹ cho đến khi thu được chế phẩm lỏng ổn định. Sau đó, lọc chế phẩm lỏng này để loại bỏ chất rắn chưa hòa tan, để thu được chế phẩm có công thức (I) trong suốt dùng trực tiếp.

Tốt hơn, nếu chế phẩm có công thức (I), kể cả ví dụ cụ thể của nó có công thức (II), gồm có chế phẩm lỏng ở dạng cô đặc, được pha loãng trong thể tích nước nhất định để thu được chế phẩm dùng trực tiếp đã pha loãng.

Vì vậy, sáng chế cũng đề cập đến chế phẩm khoáng dạng lỏng dùng để phun lên lá có dạng đậm đặc có công thức (I), kể cả chế phẩm có công thức (II), được pha loãng trong thể tích nước gấp từ 50 đến 10.000 lần, tốt hơn nếu thể tích nước gấp từ 100 đến 5.000 lần, ví dụ thể tích nước gấp từ 100 đến 1.000 lần hoặc từ 400 đến 600 lần, để cải thiện khả năng thích ứng của thực vật đối với sự thay đổi của các điều kiện môi trường.

Sáng chế cũng đề cập đến chế phẩm khoáng chất cô đặc có công thức (I), trong đó trước khi phun lên lá, chế phẩm có công thức (I) được pha loãng trong nước với tỷ lệ chế phẩm (I):nước hoặc chất lỏng nằm trong khoảng từ 0,1:500 (thể tích) đến 10:500 (thể tích), tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 0,5:500 (thể tích) đến 2:500 (thể tích).

Trên thực tế, tốt hơn là chế phẩm pha loãng nêu trên được áp dụng cho thực vật bằng cách phân tán vào phần trên không của thực vật, tốt hơn là bằng cách phun lên lá.

Theo phương án nhất định, chế phẩm pha loãng nêu trên được áp dụng bằng cách phân tán vào phần trên không của thực vật với lượng nằm trong khoảng từ 0,5l đến 20l trên một hecta bề mặt thực vật cần xử lý, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 1l

đến 10l trên một hecta bề mặt thực vật cần xử lý, trong thời gian một năm, trong một hoặc vài lần.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ngoài ra, sáng chế được thể hiện bằng các hình vẽ và ví dụ sau không nhằm mục đích giới hạn sáng chế.

A. Nguyên liệu và các phương pháp

A.1 Nguyên liệu thực vật

Các cây con thuộc kiểu sinh thái *Arabidopsis thaliana* Col 0 (wild) hoặc kiểu sinh thái No0 (biểu hiện chuyển gen đầu dò aequorin canxi) 10 ngày tuổi.

Các cây con được trồng in vitro trong đĩa Petri trên thạch dinh dưỡng (Murashige and Skoog MS môi trường) hoặc trên hỗn hợp đất trồng cây trong chậu hoặc trong chậu Jiffy.

Để trồng cây con in vitro, các hạt giống *Arabidopsis thaliana* đã được tiệt trùng trước được trồng theo hàng, mỗi hàng có khoảng 100 hạt giống.

A.2. Đo đáp ứng canxi của cây con *Arabidopsis thaliana*

Một ngày trước khi tiến hành đo, 50 cây con khoảng 10 ngày tuổi được lấy từ môi trường in vitro và cho 3 cây một vào đĩa Petri trong 500µl nước chứa 2µM coelentarazin, sau đó ủ trong bóng tối ở nhiệt độ môi trường qua đêm. Vào ngày tiếp theo, việc đo được tiến hành bằng máy đo độ sáng bằng cách chuyển mẽ 3 cây con vào đĩa Petri chứa 1ml dung dịch chế phẩm có công thức (III) với nồng độ đã chọn và bằng cách ghi tín hiệu được aequorin phát ra sau khi cho cây con tiếp xúc (bằng cách ngâm) với sản phẩm này. Sau khi ghi tín hiệu trong thời gian 15 phút, aequorin được loại bỏ bằng cách bơm dung dịch phân giải chứa 100mM CaCl₂ để hiệu chỉnh tín hiệu.

A.3. Đo lượng H₂O₂ được sản xuất của cây con *Arabidopsis thaliana*

Việc sản xuất H_2O_2 của cây con *Arabidopsis thaliana* 10 ngày tuổi được đánh giá bằng huỳnh quang được tạo ra bởi quá trình oxy hoá luminol. Mẽ 3 cây con được cho vào đĩa Petri trong máy đo độ sáng, sau đó huỳnh quang được đánh giá trong thời gian 10 phút sau khi bơm môi trường phản ứng (20 μ M luminol, 4 đơn vị peroxidaza, 5mM Tris-HCl pH=7,8) được bổ trợ 350mM manitol hoặc 10 μ g/ml chitin, được sử dụng ở đây làm chất đối chứng dương có khả năng gây ra việc sản xuất H_2O_2 .

A.4. Đo sự phát triển của rễ của cây con được trồng in vitro được xử lý sơ bộ bằng chế phẩm có công thức (I)

Đối với mỗi thử nghiệm, một hàng cây con 10 ngày tuổi đã được xử lý bằng cách phun chế phẩm có công thức (III) với nồng độ 2%, sau đó được chuyển vào môi trường bình thường hoặc môi trường gây ra stress (100mM NaCl hoặc 350mM Manitol). Sau đó, sự phát triển của rễ được theo dõi hằng ngày.

A.5. Quan sát sự phát triển của cây con *Arabidopsis thaliana* trong các điều kiện stress sau khi xử lý sơ bộ bằng chế phẩm có công thức (I)

Hạt giống *Arabidopsis thaliana* được trồng trong chậu trên hỗn hợp đất trồng cây, sau đó được trồng trong phytotron (nhiệt độ=22/20°C, chu kỳ sáng/tối 9/15, độ ẩm 70%) trong 10 ngày (*A. thaliana*).

Sau đó, các cây con này được xử lý bằng cách phun lên lá bằng nước (đối chứng) hoặc chế phẩm có công thức (III) với nồng độ 2% trong nước, sau đó chúng được cho vào trong các điều kiện stress: stress do thẩm thấu (tưới hằng ngày bằng 350mM manitol), stress do muối (tưới bằng 100mM NaCl) hoặc stress do nước (không tưới).

Sau đó sự phát triển của cây con được theo dõi hằng ngày cách chụp ảnh.

Ví dụ 1: Điều chế chế phẩm có công thức (I)

Chế phẩm có công thức (I) được điều chế theo công thức (III) sau:

- tổng nitơ amoniac (N%)	0,09%
- kali tính theo K_2O (%)	4%
- magie tính theo MgO (%)	0,45%
- natri tính theo Na_2O (%)	1,40%
- canxi tính theo CaO (%)	0,05%
- tổng sulphat tính theo SO_3 (%)	3,85%
- tổng phospho tính theo P_2O_5 (%)	0%
- clorua Cl (%)	1,40%
- hydro cacbonat (% của HCO_3)	1,7%
- bo (%)	0,12%
- đồng (%)	0,023%
- mangan (%)	0,00005%
- iot (%)	0,028%
- kẽm (%)	0,00005%
- sắt (%)	0,0003
- nước	với lượng đủ đến 100%

trong đó tỷ lệ phần trăm được tính theo tỷ lệ phần trăm theo khối lượng so với tổng khối lượng chế phẩm.

Chế phẩm có công thức (III) được điều chế theo quy trình được tổng kết trong the bảng dưới đây.

Thành phần	Lượng muối (g)	Nồng độ cuối cùng của muối được cho vào (g/l)
Nước lấy từ vòi	2.500,00	
KI	1,00	0,40
NaCl	24,00	9,60
H ₃ BO ₃	20,00	8,00
NaHCO ₃	72,50	29,00
MgCl ₂	65,00	26,00
K ₂ SO ₄	247,50	99,00
CuSO ₄ .5H ₂ O	2,50	1,00
(NH ₄) ₂ SO ₄	62,50	25,00
Tổng	495,00	198,00

Các thành phần khác nhau được cho vào nước lấy từ vòi, ở nhiệt độ môi trường, sau đó dung dịch này được trộn kỹ cho đến khi thu được chế phẩm lỏng ổn định.

Sau đó, lọc chế phẩm lỏng này để thu được chế phẩm hòa tan ổn định dùng trực tiếp trong suốt có công thức (III). Để lọc, có thể sử dụng giấy lọc xenluloza không tàn PRAT DUMAS® có đường kính lỗ nằm trong khoảng từ 7 đến 10 micromet.

Trong các ví dụ sau, chế phẩm có công thức (III) được sử dụng với các nồng độ pha loãng khác nhau trong nước lấy từ vòi nằm trong khoảng từ 0,01% đến 8,00% (thể tích) và chế phẩm pha loãng thu được được sử dụng để phun lên lá.

Ví dụ 2: Đo đáp ứng canxi của cây con *Arabidopsis thaliana* khi sử dụng chế phẩm có

công thức (I) cho lá của nó

Tác giả sáng chế thể hiện rằng việc sử dụng chế phẩm có công thức (III) gây ra các dạng biến thể của canxi trong các tế bào, chứng minh chế phẩm có công thức (III) được thực vật tiếp nhận dưới dạng tác nhân kích thích gây ra khả năng thích ứng trong thực vật.

Kết quả được thể hiện trên các Fig. 1A và 1B, thể hiện các dạng biến thể của canxi được gây ra trong cây con *Arabidopsis thalian* 10 ngày tuổi bằng chế phẩm có công thức (III) với các nồng độ khác nhau (mũi tên = thời gian tiếp xúc của cây con với sản phẩm này).

Để thực hiện việc này, cây con *Arabidopsis thalian* biểu hiện gen aequorin trong phần bào tan được sử dụng. Các dung dịch chế phẩm có công thức (III) được pha loãng với nồng độ từ 0,01 đến 8% (thể tích) trong nước được thử nghiệm và đối chứng bằng nước được thực hiện. Khi cây con được tiếp xúc với dung dịch này, sự biến đổi tín hiệu nhanh quan sát được được quy cho chính sự thao tác của họ (sốc cơ học) và độc lập với nồng độ sản phẩm (điều này cũng quan sát được với đối chứng nước).

Kết quả này chứng tỏ rằng chế phẩm có công thức (III) dẫn đến đáp ứng canxi phụ thuộc liều lượng kiểu kép, với pic giữa thời điểm 30 giây và một phút sau khi cho cây con tiếp xúc với sản phẩm này, tiếp đó là pha trở lại từng bước xuống hàm lượng gốc đối với dung dịch pha loãng có nồng độ nhỏ hơn 2% (thể tích) hoặc trạng thái ổn định được kéo dài đối với các dung dịch pha loãng có nồng độ lớn hơn 2% (thể tích). Cần phải hiểu rằng khi nồng độ của chế phẩm có công thức (III) lớn hơn 2% (thể tích), đáp ứng canxi nhanh, mạnh và với lượng tạp âm cao.

Do đó, từ thử nghiệm này có thể kết luận rằng:

1) Chế phẩm có công thức (III), mặc dù được pha rất loãng đến 0,01% (thể tích), có tác dụng kích thích đối với đáp ứng canxi của thực vật. Sản phẩm gây ra các dạng biến thể của canxi trong phần bào tan tế bào biến thiên theo nồng độ và như vậy theo lượng của chế phẩm có công thức (III) được áp dụng cho lá.

2) Đối với các nồng độ lớn hơn 2% (thể tích), đáp ứng canxi có đặc điểm khác với đáp ứng thu được của các nồng độ nhỏ hơn 2%. Đối với các nồng độ lớn hơn 2% (thể tích), đáp ứng canxi chủ yếu có pha ổn định ($\Delta [Ca^{2+}] > 0,5\%$), có thể kéo theo các đáp ứng sinh học cuối cùng khác nhau với tín hiệu canxi "chất truyền tin thứ hai" này.

Ví dụ 3: Nghiên cứu tác dụng trong thời gian dài của việc áp dụng chế phẩm có công thức (I) cho lá đối với đáp ứng canxi của cây con *Arabidopsis thalian* với sốc lạnh

Để xác định tác dụng của việc xử lý sơ bộ cây con *Arabidopsis thalian* bằng chế phẩm có công thức (III) đối với đáp ứng canxi được gây ra bởi sốc lạnh, cây con 10 ngày tuổi được phun dung dịch chứa 2% chế phẩm có công thức (III) hoặc nước (đối chứng) một ngày trước khi đo. Khoảng ba giờ sau khi xử lý, các cây con này được gom và cho vào tủ áp trong coelentarazin qua đêm, như mô tả trong phần Nguyên liệu và các phương pháp. Vào ngày tiếp theo, ghi lại đáp ứng canxi gây ra trong này cây con do sốc lạnh.

Sốc lạnh, thu được bằng cách ngâm cây con trong nước ở nhiệt độ 4°C đã được biết là gây ra đáp ứng canxi nhanh và mạnh trong thời gian ngắn.

Các Fig. 2A và 2B thể hiện kết quả trung bình thu được trong hai dãy thử nghiệm độc lập được tiến hành ba lần, 24 và 48 giờ sau khi xử lý sơ bộ bằng chế phẩm có công thức (III).

Sau 24 giờ, quan sát được sự khác biệt đáng kể về cường độ của đáp ứng do stress gây ra phụ thuộc vào việc xử lý sơ bộ (bằng chế phẩm có công thức (III) hoặc nước).

Đã phát hiện ra rằng việc xử lý bằng chế phẩm có công thức (III) làm tăng một cách đáng kể đáp ứng với lạnh.

Trong dãy thử nghiệm thứ hai, việc xử lý bằng chế phẩm có công thức (III) gây ra sự khử nhạy đáng kể với lạnh so với thực vật được xử lý bằng nước.

Tùy thuộc vào thử nghiệm được xem xét, chế phẩm có công thức (III) như vậy có tác dụng khuếch đại hoặc ức chế đáp ứng mà không thể rút ra kết luận về tác dụng của nó. Sau 48 giờ trong hai dãy thử nghiệm, có thể thấy rõ ràng là việc xử lý bằng PRP không hề khác biệt so với việc xử lý bằng nước (đối chứng).

Cuối cùng, kết quả của Ví dụ 3 chứng tỏ rằng việc xử lý sơ bộ bằng chế phẩm có công thức (III) với nồng độ 2% (thể tích) gây ra sự thay đổi phản ứng đáp ứng canxi với sốc lạnh của thực vật nếu hợp chất này được áp dụng không muộn hơn tối đa 24 giờ.

Ví dụ 4: Nghiên cứu tác dụng trong thời gian dài của chế phẩm có công thức (I) đối với việc sản xuất H_2O_2 ở cây con *Arabidopsis thalian* để đáp ứng với sốc thẩm thấu hoặc với việc xử lý chất gây tiết bằng chất do vi sinh vật gây bệnh tạo ra

Mục đích của Ví dụ 4 nhằm xác định tác dụng của việc xử lý sơ bộ cây con *Arabidopsis thalian* bằng chế phẩm có công thức (III) đối với đáp ứng H_2O_2 được gây ra bởi sốc thẩm thấu hoặc do chất gây tiết do vi sinh vật nấm tạo ra, là chitin. Chitin được sử dụng ở đây làm chất đối chứng dương đã biết là gây ra việc sản xuất H_2O_2 và stress bất chước do tác nhân gây bệnh gây ra có khả năng gây ra phản ứng phòng thủ đối với một trong số các gen đánh dấu sản xuất H_2O_2 .

Để thực hiện điều này, một ngày trước khi đo, cây con 10 ngày tuổi được phun dung dịch chứa 2% chế phẩm có công thức (III) hoặc nước (đối chứng). Vào ngày tiếp theo, việc sản xuất H_2O_2 gây ra bởi sốc thẩm thấu (Fig. 3) hoặc chitin (Fig. 4) được đánh giá trên các cây con này, như được mô tả trong phần Nguyên liệu và các phương pháp.

Kết quả được thể hiện trên các Fig. 3 và Fig. 4. Các Fig. 3 và Fig. 4 thể hiện việc sản xuất H_2O_2 để đáp ứng với sốc thẩm thấu (Fig. 3) hoặc chitin (Fig. 4) ở cây con *Arabidopsis thalian* được xử lý sơ bộ 24 giờ trước đó bằng nước hoặc chế phẩm có công thức (III) với nồng độ 2% (thể tích).

Trong đáp ứng với manitol là stress bất chước do nước, cường độ của đáp ứng

quan sát được rất khác nhau. Cường độ đo được trên cây con được xử lý sơ bộ bằng chế phẩm có công thức (III) nhỏ hơn cường độ đo được ở cây con được xử lý sơ bộ bằng nước. Tuy nhiên, manitol không gây ra việc sản xuất H_2O_2 khác biệt một cách đáng kể với kết quả thu được bằng cách áp dụng nước thay cho manitol trên thực vật trước được phun nước (đối chứng H_2O) hoặc được phun chế phẩm có công thức (III) (PRP).

Về việc sản xuất H_2O_2 được gây ra bởi chitin, cần lưu ý rằng ở cây con được xử lý sơ bộ bằng chế phẩm có công thức (III), chitin gây ra việc sản xuất H_2O_2 cao hơn từ 4 đến 5 lần kết quả của cây con được xử lý sơ bộ bằng chế phẩm có công thức (III) nhưng được ủ với sự có mặt của nước (PRP).

Trong trường hợp cây con được xử lý sơ bộ bằng nước và được kích thích bằng chitin, việc sản xuất H_2O_2 không khác đáng kể việc kích thích cùng cây con này bằng nước (đối chứng H_2O).

Cuối cùng, kết quả từ Ví dụ 4 chứng tỏ rằng việc xử lý sơ bộ cây con bằng chế phẩm có công thức (III) có tác dụng kích thích việc sản xuất H_2O_2 để đáp ứng với chitin. Điều này chỉ ra rằng cây con được xử lý sơ bộ bằng chế phẩm có công thức (III) có khả năng gia tăng phản ứng phòng thủ của chúng để đáp ứng với sự nhiễm trùng có thể bởi chất gây bệnh chứa hoặc tạo ra chitin, như nấm.

Ví dụ 5: Tác dụng trong thời gian dài của chế phẩm có công thức (I) đối với quá trình phát triển của rễ của cây con *Arabidopsis thalian* được trồng in vitro

Trong nghiên cứu của Ví dụ 5, cây con *Arabidopsis thalian* được sinh trưởng trong đĩa thạch được phun chế phẩm có công thức (III) với lượng 2% (thể tích) hoặc nước.

Ngày tiếp theo, cây con được chuyển vào đĩa mới chứa môi trường bình thường hoặc môi trường gây ra stress chứa 100mM NaCl hoặc 350mM manitol.

Sau đó, độ dài của rễ cái của cây con đo được hằng ngày.

Fig. 5 thể hiện kết quả của việc đo được tiến hành 24 giờ sau khi chuyển, từ 20 đến 30 cây con trên một mẻ. Mặc dù độ dài rất khác nhau, quan sát thấy tác dụng chung rất đáng kể ($p < 0,01$) của sản phẩm PRP-EPV đối với sự phát triển của rễ. Sự gia tăng độ dài của rễ cái ở cây con được xử lý sơ bộ bằng chế phẩm có công thức (III) lớn hơn ở cây con đã được xử lý bằng H_2O , cho dù trong các điều kiện đối chứng (không gây stress) hoặc các điều kiện stress (NaCl hoặc manitol). Từ đồ thị có thể thấy rõ ràng là cây con được xử lý sơ bộ chịu được stress tốt hơn cây con đối chứng.

Cuối cùng, kết quả của Ví dụ 5 chứng tỏ rằng chế phẩm có công thức (III) có tác dụng dương tính đối với quá trình sinh trưởng của rễ cái. Sự phát triển tốt hơn trong các điều kiện stress làm cho sự chịu đựng stress do nước tốt hơn.

Ví dụ 6: Tác dụng trong thời gian dài của chế phẩm có công thức (I) đối với quá trình sinh trưởng của cây con *Arabidopsis thalian* được trồng trong chậu

Để đánh giá tác dụng của chế phẩm có công thức (III) đối với khả năng chịu đựng của cây con *Arabidopsis thalian* với các stress khác nhau, thực vật được trồng trong chậu 10 ngày tuổi được xử lý bằng cách phun chế phẩm có công thức (III) với lượng 2% (thể tích) hoặc nước (đối chứng), sau đó được tưới vào ngày tiếp theo bằng nước chứa 350mM manitol (stress do thẩm thấu tái tạo stress do nước) hoặc 100mM NaCl (stress do muối) hoặc không tưới (stress do nước).

Sau 2 tuần xử lý stress, các cây con được tưới theo cách bình thường bằng nước tinh khiết.

Quan sát thấy rằng việc xử lý có tác dụng như nhau đối với quá trình sinh trưởng của cây con cho dù chúng có được xử lý bằng chế phẩm có công thức (III) hay không.

Trái lại, dường như sau khi gây stress do nước bằng cách dùng tưới, sự phục hồi phát triển sau khi thủy hóa được cải thiện ở cây con đã được xử lý sơ bộ bằng chế phẩm có công thức (III). Sự phục hồi được cải thiện này rõ rệt hơn nhiều sau 10 ngày thủy hóa.

Kết luận: kết quả của Ví dụ 5 chứng tỏ rằng việc xử lý sơ bộ bằng chế phẩm có công thức (III) cải thiện sự phục hồi của thực vật sau khi bị stress do nước nặng (các bộ phận trên không bị khô).

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm khoáng dạng lỏng dùng để phun lên lá, nhằm cải thiện khả năng thích ứng của thực vật đối với sự thay đổi của các điều kiện môi trường, trong đó chế phẩm này có công thức (I) sau:

tổng nitơ amoniac (N%):	từ 0,08% đến 2%
kali tính theo K_2O (%):	từ 3% đến 6%
magie tính theo MgO (%):	từ 0,4% đến 0,8%
natri tính theo Na_2O (%):	từ 1% đến 2%
canxi tính theo CaO (%):	từ 0% đến 0,5%
tổng sulphat tính theo SO_3 (%):	từ 3% đến 6%
tổng phospho tính theo P_2O_5 (%):	0%
clorua Cl (%):	từ 1% đến 2%
bicacbonat (% của HCO_3):	từ 1,2% đến 3,0%
bo (%):	từ 0,1 đến 0,2%
đồng (%):	từ 0,018% đến 0,03%
mangan (%):	từ 0,00005% đến 0,006%
iot (%):	từ 0,02% đến 0,04%
kẽm (%):	từ 0,00005% đến 0,006%
sắt (mg/kg):	từ 0,0002 đến 0,003
nước:	với lượng đủ đến 100%

trong đó tỷ lệ phần trăm là tỷ lệ phần trăm theo khối lượng so với tổng khối lượng chế phẩm.

2. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó khả năng thích ứng của thực vật đối với stress sinh học hoặc stress không phải sinh học được cải thiện.

3. Chế phẩm theo điểm 2, trong đó stress không phải sinh học được chọn từ nhóm bao gồm stress do nước, stress do thâm thấu, stress do nhiệt, stress do tiếp xúc quá lâu với bức xạ ion hóa hoặc phi ion hóa, sự thiếu hụt dưỡng chất, stress do chất độc gây ra.

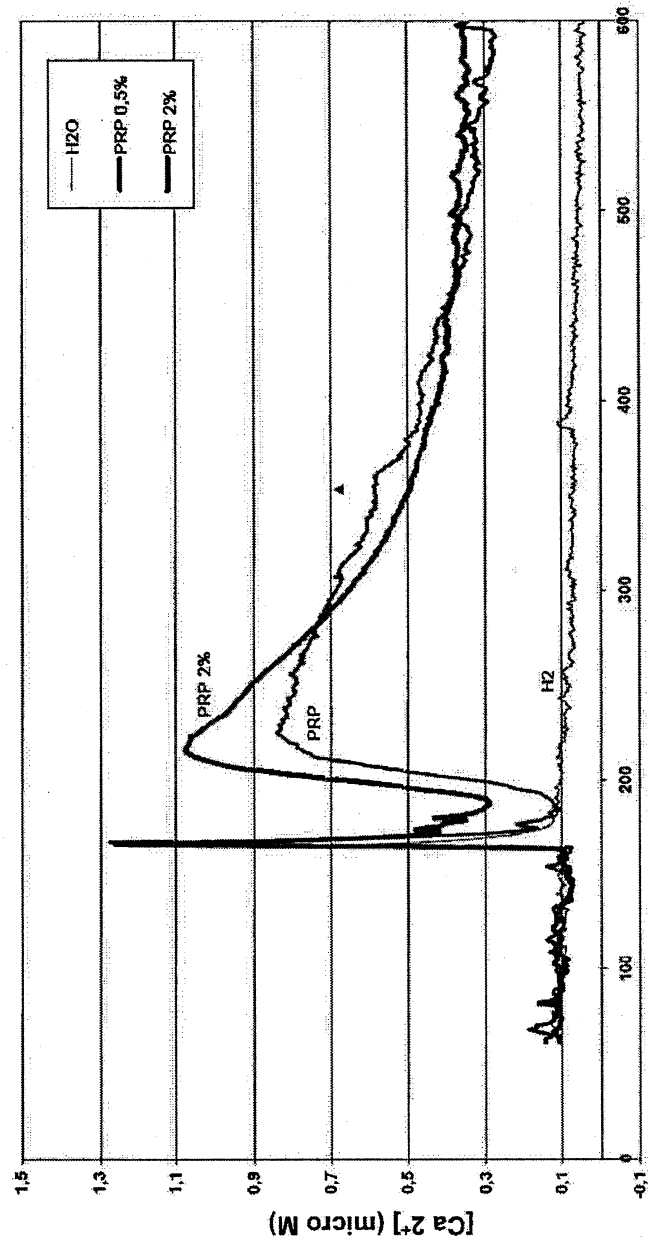
4. Chế phẩm theo điểm 2, trong đó stress sinh học được chọn từ nhóm bao gồm vi khuẩn, virus, nấm, sinh vật ăn thực vật, côn trùng và mầm bệnh.

5. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó chế phẩm có công thức (I) cũng làm tăng sự phát triển rễ của thực vật.

6. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó trước khi phun lên lá, chế phẩm có công thức (I) được pha loãng trong nước hoặc trong chất lỏng với tỷ lệ chế phẩm có công thức (I):nước hoặc chất lỏng nằm trong khoảng từ 0,1:500 (thể tích/thể tích) đến 10:500 (thể tích/thể tích).

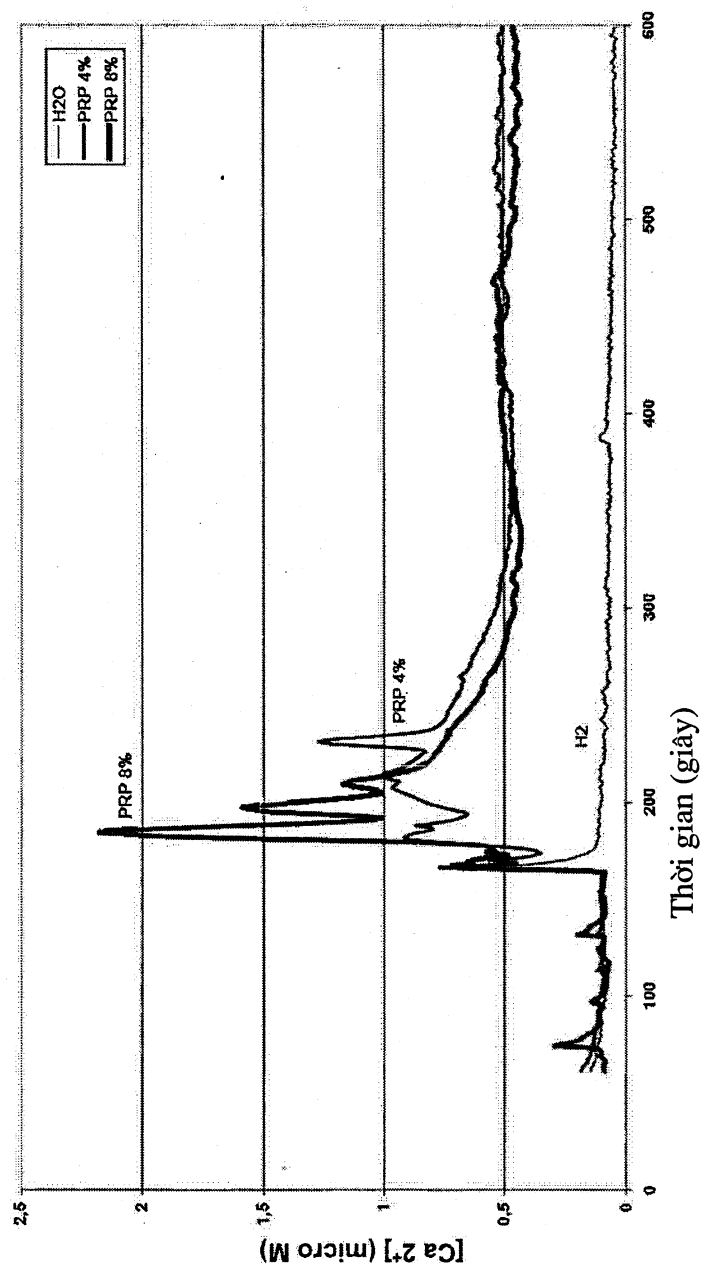
7. Chế phẩm theo điểm 6, trong đó chế phẩm có công thức (I) được pha loãng trong nước hoặc trong chất lỏng với tỷ lệ chế phẩm có công thức (I):nước hoặc chất lỏng nằm trong khoảng từ 0,5:500 (thể tích/thể tích) đến 2:500 (thể tích/thể tích).

1/7

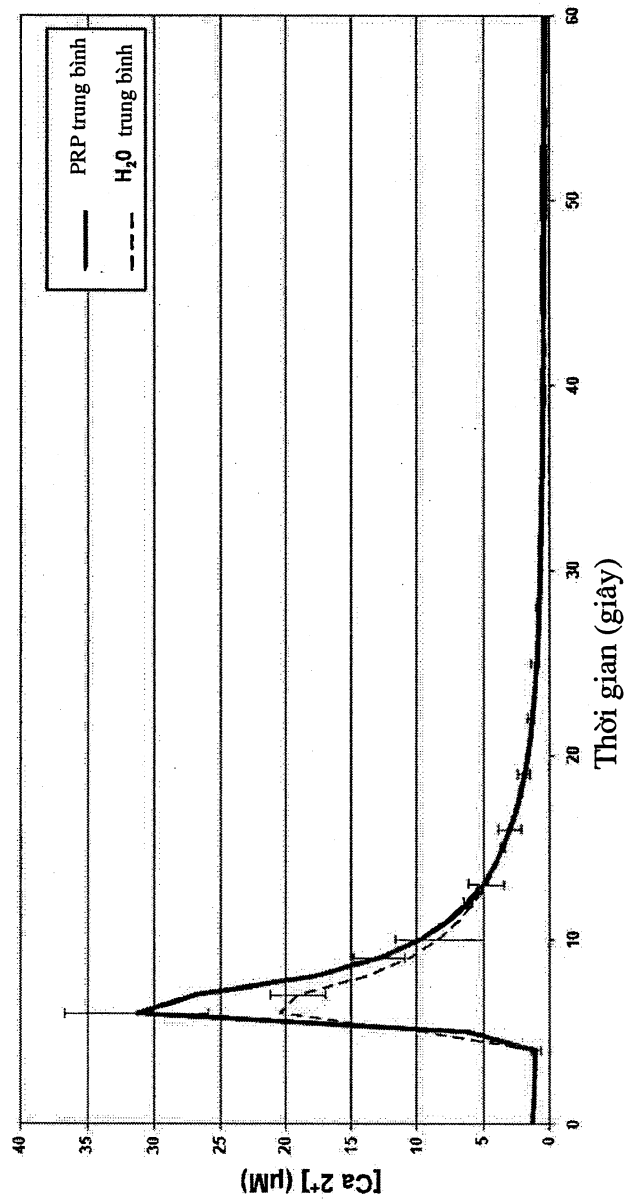


Thời gian (giây)

Hình 1A

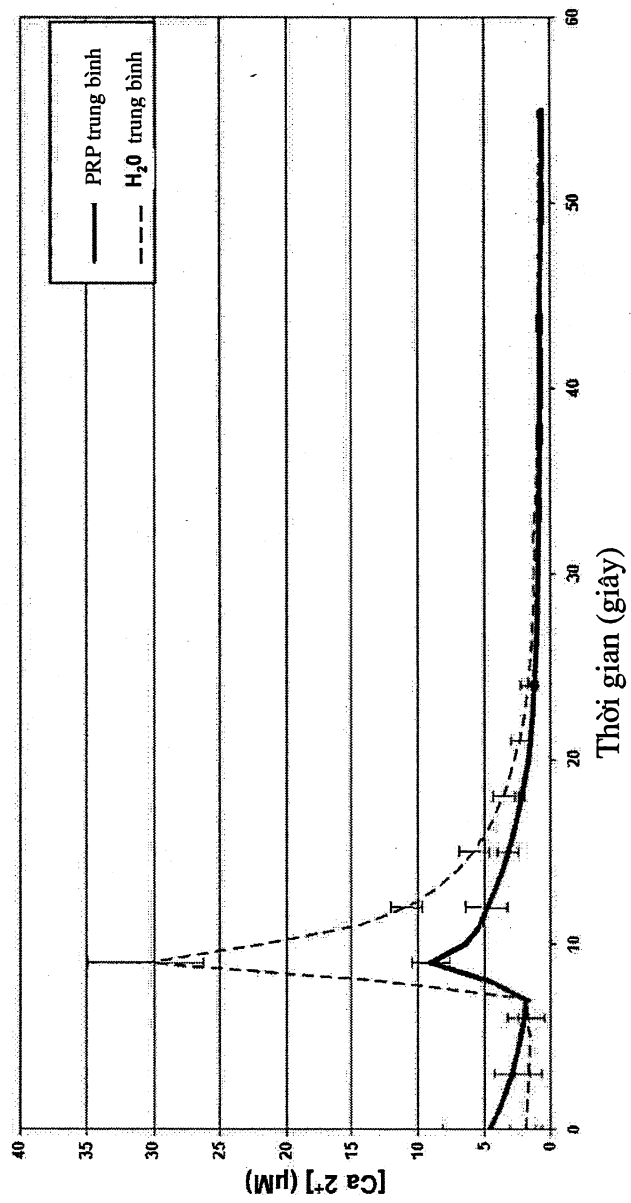


Hình 1B

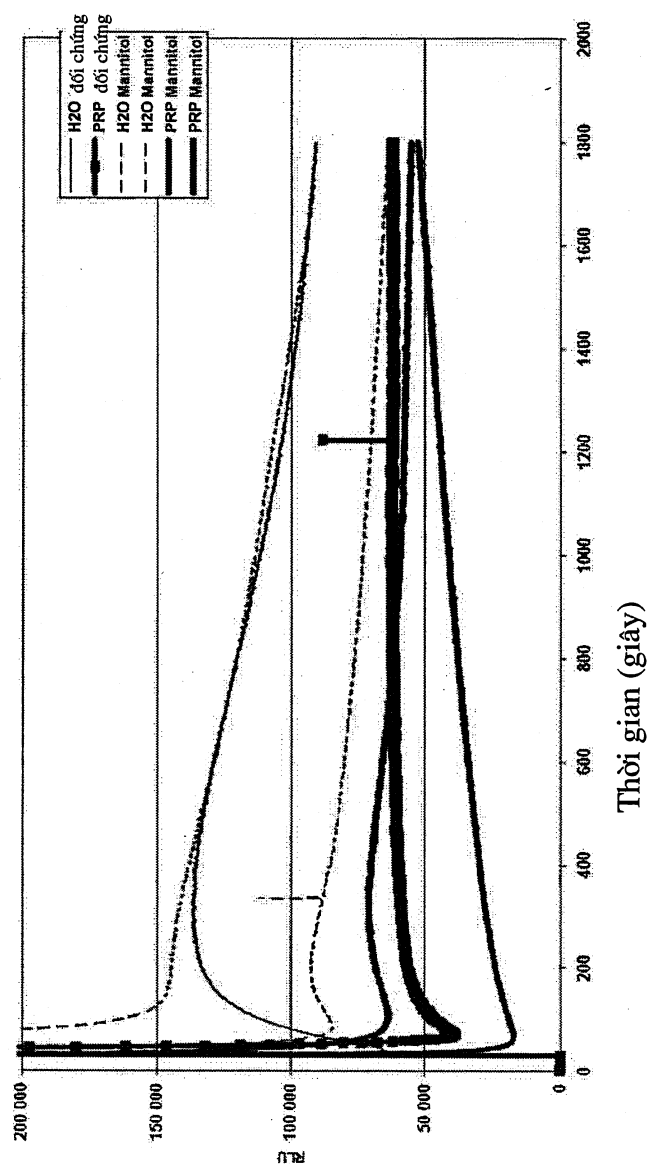


Hình 2A

4/7

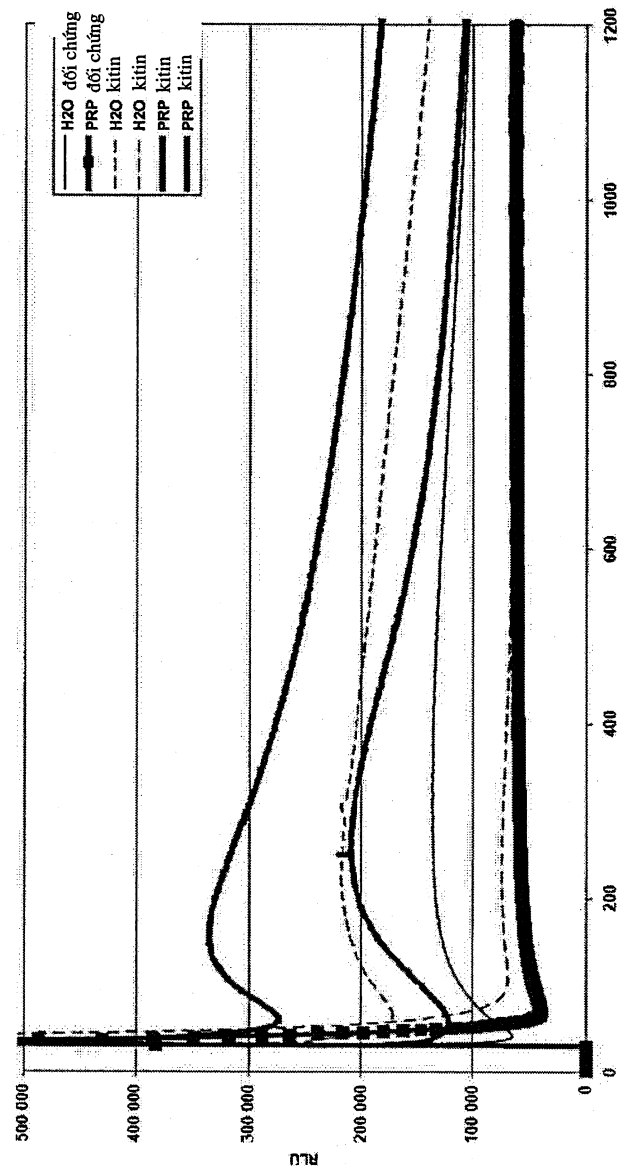


Hình 2B



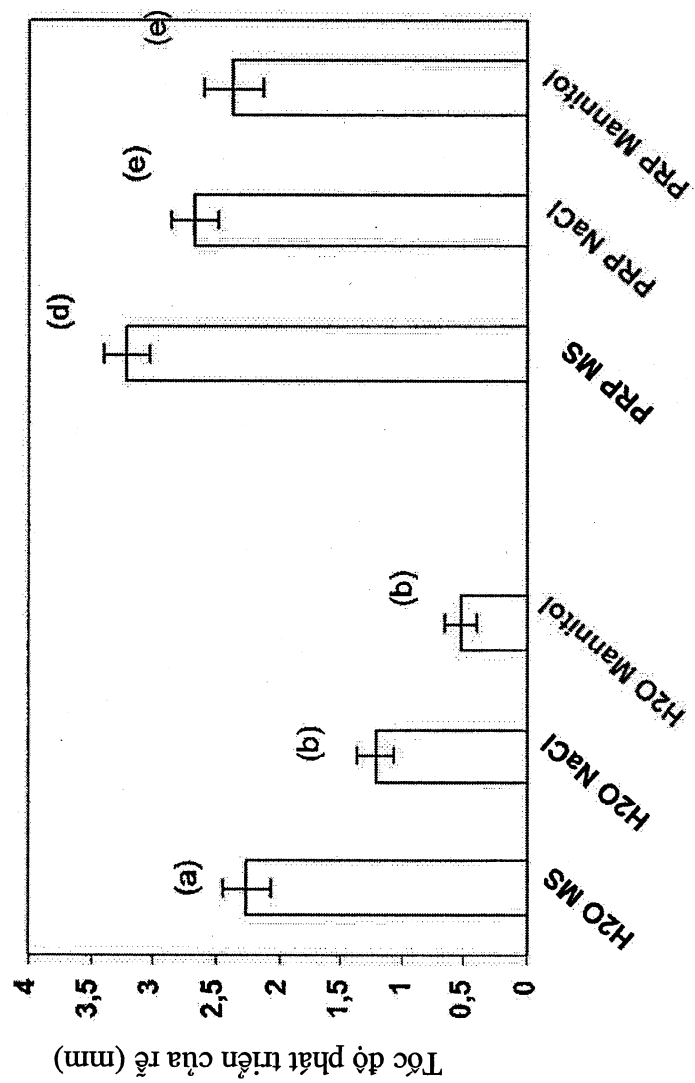
Hình 3

6/7



Thời gian (giây)

Hình 4



Hình 5