



(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) 
1-0023221

(51)⁷ **A01C 1/06, C05F 11/08, C09K 17/00,** (13) **B**
C05G 3/04, C12N 1/14

(21)	1-2011-00852	(22)	01.10.2009		
(86)	PCT/CA2009/001390	01.10.2009	(87)	WO2010/037228	08.04.2010
(30)	08165591.2	01.10.2008	EP		
(45)	25.02.2020	383	(43)	27.06.2011	279
(73)	NOVOZYMES BIOAG LIMITED (CA) 3935 Thatcher Ave Saskatoon, Saskatchewan S7R 1A3, Canada				
(72)	HNATOWICH, Garry Lawrence (CA), STECKLER, Shelagh Jean (CA), LEGGETT, Mary Elizabeth (CA), PRIEST, Kari Lynn (CA)				
(74)	Công ty TNHH T&T INVENMARK Sở hữu trí tuệ Quốc tế (T&T INVENMARK CO., LTD.)				

(54) **PHƯƠNG PHÁP LÀM TĂNG SỰ SẴN CÓ PHOSPHO ĐỂ CHO CÂY HẤP THU TỪ ĐẤT TRỒNG VÀ CHẾ PHẨM ĐỂ CUNG CẤP CHO ĐẤT TRỒNG**

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp làm tăng sự sẵn có phospho để cho cây hấp thu từ đất trồng, trong đó phương pháp này bao gồm việc đưa vào đất trồng nguyên liệu cấy của ít nhất hai chủng khác nhau của nấm *Penicillium* được chọn từ nhóm bao gồm *P. bilaiae*, *P. gaestrivorus* và hỗn hợp của chúng. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến chế phẩm để cung cấp cho cây trồng.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế này đề cập đến phương pháp làm tăng sự có sẵn phospho để cho cây hấp thu từ đất trồng và chế phẩm để cung cấp cho đất trồng.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Để duy trì sự tăng trưởng khỏe mạnh, thì cây phải hút nhiều nguyên tố khác nhau từ đất trồng nuôi chúng. Các nguyên tố này bao gồm phospho và vi chất dinh dưỡng (ví dụ, đồng, sắt và kẽm), nhưng nhiều loại đất trồng thiếu các nguyên tố này hoặc chúng chỉ chứa các hợp chất này ở dạng không thể hấp thu dễ dàng bởi cây (thường các nguyên tố thiết yếu không thể được hấp thu dễ dàng bởi cây trừ khi chúng ở dạng hòa tan trong đất trồng).

Để chống lại việc thiếu hụt này, các nguồn nguyên tố thiếu hụt thường được cung cấp vào đất trồng để cải thiện tốc độ tăng trưởng và sản lượng của cây trồng. Ví dụ, phosphat thường được thêm vào đất trồng để chống lại sự thiếu phospho có sẵn. Phosphat được thêm vào đất trồng dưới dạng phân bón có bán sẵn trên thị trường (ví dụ, mono-amoni phosphat hoặc trisuphosphat) là dễ dàng có sẵn cho cây trồng, nhưng nhanh chóng chuyển vào đất trồng thành dạng tương đối không có sẵn. Ước tính rằng chỉ từ 10 đến 30% lượng phân bón phosphat được cung cấp trong năm được cây trồng sử dụng, và từ 1/3 đến 1/2 lượng phân bón phosphat được dùng có thể không bao giờ được lấy lại bởi cây trồng.

Trong quá khứ các cố gắng đã được thực hiện để sử dụng các vi sinh vật để cải thiện sự sẵn có của các nguyên liệu thiết yếu trong hệ thống đất trồng. Cụ thể, các loài nấm *Penicillium* đã được sử dụng cho mục đích này. Tài liệu patent US 5,026,417 mô tả chủng *P. bilaiae* được phân lập có khả năng cải thiện sự hấp thu phospho của cây khi nó được cung cấp cho đất trồng.

Tuy nhiên, vẫn có nhu cầu về các hệ thống để cải thiện điều kiện tăng trưởng của cây, cụ thể bằng cách làm tăng mức phospho có sẵn trong hệ thống đất trồng.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế này dựa vào việc khám phá rằng các loài *Penicillium* khác nhau, khi được dùng một mình có thể có nhiều khả năng cải thiện sự có sẵn phospho từ các nguồn phosphat không tan và các phân bón được sản xuất, có thể khi kết hợp sẽ làm tăng đến tác dụng hiệp đồng vượt trội mà có thể được mong đợi từ các kết quả riêng rẽ.

Cụ thể, sáng chế này tin rằng điều đó đúng với các loài *Penicillium* thuộc chủng *P. bilaiae*.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập đến phương pháp làm tăng sự có sẵn phospho trong đất trồng để cho cây hấp thu, trong đó phương pháp này bao gồm việc đưa vào đất trồng nguyên liệu cấy của ít nhất hai chủng cây khác nhau của nấm *Penicillium*.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề cập đến phương pháp làm tăng điều kiện tăng trưởng của cây, trong đó phương pháp này bao gồm bước trồng cây trên đất trồng chứa, ở phần gần rễ cây, cả nguồn phospho và ít nhất hai chủng được xác định bởi số lưu trữ NRRL 50169 và NRRL 50162.

Theo khía cạnh thứ ba, sáng chế đề cập đến chế phẩm để cung cấp cho đất trồng, trong đó chế phẩm bao gồm: i) nguyên liệu cấy của ít nhất hai chủng cây của nấm *Penicillium*, cụ thể là *P. bilaiae* và/hoặc *P. gaestrivorus*; và ii) chất mang cho nấm tương thích với đất trồng.

Theo khía cạnh thứ tư, sáng chế đề cập đến hạt giống của cây có màng bao chứa ít nhất hai chủng cây của nấm *Penicillium*, cụ thể là *P. bilaiae* và/hoặc *P. gaestrivorus*, và chất mang rắn cho nấm tương hợp với đất trồng.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 thể hiện hiệu quả của việc cấy vi sinh vật làm hòa tan phosphat trên sản lượng ngô. *P. bilaiae* (Novozymes P-201) tương ứng với chủng NRRL 50169, và *P. bilaiae* (Úc, P-208) tương ứng với chủng NRRL 50162.

Fig. 2 thể hiện sự hòa tan hydroxyl apatit bởi các chủng *P. bilaiae* đơn lẻ và bởi hỗn hợp của chúng trong chủng nuôi cấy lỏng. Số trong ngoặc đơn chỉ ra tỷ lệ ủ (số bào tử trong một bình thí nghiệm).

Fig. 3 thể hiện hiệu quả của việc cấy với các vi sinh vật làm hòa tan phosphat trên trọng lượng chồi cây khô của đậu tương được phát triển trong các điều kiện của

phòng tăng trưởng. *P. bilaiae* (Novozymes) tương ứng với chủng NRRL 50169, *P. bilaiae* (Úc) tương ứng với chủng NRRL 50162, và hỗn hợp *P. bilaiae* tương ứng với hỗn hợp trộn của hai chủng này với tỷ lệ 1:1.

Fig. 4 thể hiện hiệu quả của việc cấy với các vi sinh vật làm hòa tan phosphat trên trọng lượng chồi cây khô của ngô được tăng trưởng trong các điều kiện của phòng tăng trưởng. *P. bilaiae* (Novozymes) tương ứng với chủng NRRL 50169, *P. bilaiae* (Úc) tương ứng với chủng NRRL 50162, và hỗn hợp *P. bilaiae* tương ứng với hỗn hợp trộn của hai chủng này với tỷ lệ 1:1.

Mô tả chi tiết sáng chế

Nấm *Penicillium bilaiae* là một vi sinh vật đã được biết mà trước đây đã được ký gửi ở American Type Culture Collection ở Rockville, Md., Mỹ với số lưu trữ ATCC 22348 (bản in năm 1974 của mục lục ATCC). Trong bản mục lục năm 1984, số lưu trữ này được sử dụng cho *P. bilaii* và một chủng khác được xác định bằng số lưu trữ 18309.

Các chủng phân lập khác của nấm này đã được phát hiện trong đất trồng từ vị trí (vĩ độ 49⁰, 48' Bắc, kinh độ 113⁰, 6' Tây) ở Nam Alberta, Canada. Chủng này trước đây đã cho thấy cải thiện hoạt tính làm hòa tan phosphat so với các chủng trước đó được ký gửi ở ATCC. Chủng cải thiện này được ký gửi ở ATCC với số lưu trữ 20851 theo thuật ngữ của hiệp ước Budapest. Trong lần ký gửi này, nấm có tên là *P. bilaji* và các chi tiết về sự phân loại và việc sử dụng nó đã được mô tả trong patent Mỹ 5,026,417. Chủng này bây giờ được ký gửi lại với số NRRL 50169. Xem thông tin đầy đủ của chủng ký gửi ở trang cuối cùng của bản mô tả này.

Tên của các loài này sau đó được thay đổi lần nữa và bây giờ được thừa nhận là *P. bilaiae*. Do đó, tên này sẽ được sử dụng xuyên suốt bản mô tả.

Chủng *P. bilaiae* được phân lập mới đã được phát hiện ở Úc. Nó được phân lập đầu tiên vào năm 2002 từ rễ lúa mì và được trồng trên mẫu đất lấy từ Coonalpyn ở Nam Úc (Wakelin et al., 2004. Biol Fertil Soils 40:36-43). Chủng cải tiến này được ký gửi với số lưu trữ NRRL 50162. Xem thông tin đầy đủ về chủng ký gửi này ở trang cuối của bản mô tả và chi tiết về sự phân loại và việc sử dụng được đề xuất của chủng phân lập này được mô tả trong đơn yêu cầu cấp patent Mỹ tạm thời được nộp vào ngày 10 tháng 1 năm 2008 với tên là CSIRO.

Loài *Penicillium* khác được tìm thấy là cụ thể có ích theo sáng chế này là chủng *P. gaestrivorus*. Một chủng như vậy được phân lập vào năm 2002 từ rễ lúa mì trong các mẫu đất trồng được lấy từ New South Wale, Úc (Wakelin et al., 2004. Biol Fertil Soils 40:36-43), và được ký gửi với số NRRL 50170. Xem thông tin đầy đủ về chủng ký gửi này ở trang cuối của bản mô tả này.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến phương pháp làm tăng điều kiện tăng trưởng của cây, bao gồm bước trồng cây trên đất trồng chứa, ở phần gần rễ cây, cả nguồn phospho và ít nhất hai chủng của nấm *Penicillium*. Cụ thể, nấm *Penicillium* được chọn từ chủng *P. bilaiae* và/hoặc *P. gaestrivorus*. Cụ thể, sự tăng trưởng tăng bằng cách làm tăng sự có sẵn phospho trong đất trồng để cho cây hấp thu.

Theo một phương án cụ thể, các chủng *Penicillium* được chọn từ chủng được ký gửi với số NRRL 50169 và NRRL 50162.

Việc sử dụng hỗn hợp của ít nhất hai chủng *Penicillium* khác nhau có các lợi ích sau đây. Khi được cung cấp cho đất trồng đã chứa các phosphat không tan (hoặc ít tan), thì việc sử dụng hỗn hợp các chủng nấm sẽ làm tăng lượng phospho có sẵn để cho cây hấp thu so với việc sử dụng chỉ một chủng *Penicillium*. Điều này lần lượt có thể làm tăng hấp thu phosphat và/hoặc tăng sản lượng của cây được trồng trên đất trồng so với việc sử dụng từng chủng một mình. Ví dụ nếu phospho không phải là yếu tố giới hạn thì có thể không cần kéo theo sự tăng sản lượng như kết quả của việc tăng lượng phospho có sẵn. Hỗn hợp các chủng cũng cho phép sử dụng các phosphat từ đá không tan làm phân bón hữu hiệu cho đất trồng mà không có đủ lượng phospho có sẵn.

Do đó theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến phương pháp làm tăng sự có sẵn phospho trong đất trồng để cho cây hấp thu, trong đó phương pháp này bao gồm việc đưa ít nhất hai chủng cây khác nhau của nấm *Penicillium* vào đất trồng. Sự có mặt của hai chủng *Penicillium* sẽ làm tăng sự có sẵn phospho để cho cây hấp thu.

Phospho này có thể được cung cấp từ nguồn được chọn từ nhóm gồm có các nguồn ban đầu có trong đất trồng, các nguồn được thêm vào đất trồng dưới dạng chất bổ sung và việc kết hợp các nguồn này.

Thuật ngữ "chủng cây" như được sử dụng trong bản mô tả này được dự định có nghĩa là dạng tế bào nấm bất kỳ, hệ sợi nấm hoặc bào tử, mà có khả năng nhân lên trên hoặc trong đất trồng khi các điều kiện nhiệt độ, độ ẩm, .v.v. thích hợp cho sự sinh trưởng của nấm.

"Nguồn" của nguyên tố cụ thể có nghĩa là hợp chất của nguyên tố đó mà, ít nhất trong điều kiện đất trồng đang quan tâm, không tạo ra nguyên tố này đủ có sẵn để cho cây hấp thu.

Cụ thể, nấm *Penicillium* được chọn từ nhóm gồm có *P. bilaiae*, *P. albidum*, *P. aurantiogriseum*, *P. chrysogenum*, *P. citreonigrum*, *P. citrinum*, *P. digitatum*, *P. frequentas*, *P. fuscum*, *P. gaestrivorus*, *P. glabrum*, *P. griseofulvum*, *P. implicatum*, *P. janthinellum*, *P. lilacinum*, *P. minioluteum*, *P. montanense*, *P. nigricans*, *P. oxalicum*, *P. pinetorum*, *P. pinophilum*, *P. purpurogenum*, *P. radicans*, *P. radicum*, *P. raistrickii*, *P. rugulosum*, *P. simplicissimum*, *P. solitum*, *P. variable*, *P. velutinum*, *P. viridicatum*, *P. glaucum*, *P. fussiporus*, và *P. expansum*.

Theo một phương án cụ thể, loài *Penicillium* là *P. bilaiae*. Theo một phương án cụ thể khác, loài *Penicillium* là *P. gaestrivorus*. Theo một phương án cụ thể khác nữa, ít nhất hai chủng là một chủng *P. bilaiae* và một chủng *P. gaestrivorus*.

Thậm chí, theo một phương án cụ thể khác, chủng *P. bilaiae* được chọn từ nhóm gồm có ATCC 20851, NRRL 50169, ATCC 22348, ATCC 18309, NRRL 50162.

Theo một phương án khác nữa, ít nhất hai chủng là NRRL 50169 và NRRL 50162.

Theo một phương án khác nữa, ít nhất hai chủng là NRRL 50169 và NRRL 50170.

Theo một phương án khác nữa, ít nhất hai chủng là NRRL 50162 và NRRL 50170.

Nấm *Penicillium* theo sáng chế và cụ thể là các chủng cụ thể, ATCC20851, NRRL 50169, NRRL 50170 và NRRL 50162 có thể được sinh trưởng bằng cách sử dụng sự lên men trạng thái rắn hoặc lỏng và nguồn cacbon thích hợp. Các chủng *Penicillium* được phân lập có thể được sinh trưởng bằng cách sử dụng phương pháp thích hợp bất kỳ đã được biết bởi chuyên gia trong lĩnh vực. Ví dụ, nấm có thể được nuôi cấy trên môi trường sinh trưởng rắn như thạch dextroza khoai tây hoặc thạch dịch chiết mạch nha, hoặc trong các bình thí nghiệm chứa môi trường lỏng thích hợp như môi trường Czapek-Dox hoặc canh thang dextroza khoai tây. Các phương pháp nuôi cấy này có thể được sử dụng để bào chế chủng cấy của loài *Penicillium* để bao hạt giống và/hoặc gắn vào chất mang được cung cấp cho đất trồng.

Việc sản xuất bào tử *Penicillium* ở trạng thái rắn có thể đạt được bằng cách cấy vào môi trường rắn như than bùn hoặc cơ chất có bản chất là chất khoáng bón cây, hoặc ngũ cốc bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, yến mạch, lúa mì, lúa mạch, hoặc gạo. Môi trường vô trùng (đạt được qua hấp hoặc chiếu xạ) được cấy hỗn dịch bào tử (1×10^2 - 1×10^7 cfu/ml) của loài *Penicillium* thích hợp và độ ẩm được điều chỉnh đến nằm trong khoảng từ 20 đến 50 %, tùy thuộc vào cơ chất. Nguyên liệu được ủ trong khoảng từ 2 đến 8 tuần ở nhiệt độ trong phòng. Các bào tử có thể cũng được tạo ra bằng cách lên men lỏng (Cunningham et al., 1990. Can J Bot 68:2270-2274). Việc sản xuất lỏng có thể đạt được bằng cách nuôi cấy nấm trong môi trường thích hợp bất kỳ, như canh thang dextroza khoai tây hoặc môi trường dịch chiết men bia sucroza, dưới điều kiện pH và nhiệt độ thích hợp (như có thể được thực hiện bởi chuyên gia trong lĩnh vực).

Nguyên liệu thu được có thể được sử dụng trực tiếp làm xử lý hạt giống, hoặc các bào tử có thể được thu hoạch, cô đặc bằng quay ly tâm, tạo thành công thức, và sau đó làm khô bằng cách sử dụng các kỹ thuật sấy khí, sấy đông khô, hoặc sấy tầng sôi (Friesen T., Hill G., Pugsley T., Holloway G., và Zimmerman D. 2005, Experimentall determination of viability loss of *Penicillium bilaiae* conidia during convective air-drying Appl Microbiol Biotechnol 68: 397-404) để tạo ra bột thấm ướt. Sau đó, bột thấm ướt được tạo huyền phù trong nước, được cung cấp trên bề mặt hạt giống, được cho làm khô trước khi trồng cây. Bột thấm ướt có thể được sử dụng kết hợp với các biện pháp xử lý hạt giống khác, như, nhưng không bị giới hạn ở, biện pháp xử lý hạt giống bằng hóa chất, chất mang (ví dụ, talc, đất sét, kaolin, gel silic, kaolinit) hoặc polyme (ví dụ, metylxenluloza, polyvinylpyrrolidon). Theo một cách khác, hỗn dịch bào tử của loài *Penicillium* thích hợp có thể được gắn với chất mang tương thích với đất trồng thích hợp (ví dụ, bột hoặc hạt gắn trên than bùn) đến hàm ẩm cuối cùng thích hợp. Nguyên liệu được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong khoảng từ 2 đến 8 tuần, và sau đó có thể được cung cấp cho đất trồng trong luống cày cùng với hạt giống.

Như được nêu trên, đã tìm thấy rằng hỗn hợp của ít nhất hai chủng *Penicillium* làm tăng lượng phospho có sẵn từ phân bón phospho có bán sẵn trên thị trường để cho cây hấp thu so với việc chỉ sử dụng duy nhất một chủng vì phân bón có bán sẵn trên thị trường có thể được thêm vào đất trồng thay cho (hoặc thậm chí cũng như) phosphat từ đá tự nhiên.

Theo các phương án khác của sáng chế, nguồn phospho bao gồm nguồn phospho tự nhiên có trong đất trồng hoặc theo một phương án khác, nguồn phospho được thêm vào đất trồng.

Theo một phương án, nguồn này là phosphat từ đá. Theo một phương án khác, nguồn này là phân bón đã được sản xuất.

Các phân bón phosphat đã được sản xuất có bán sẵn trên thị trường có nhiều loại. Một số loại thông thường là các phân bón chứa monoamoni phosphat (MAP), triple superphosphat (TSP), diamoni phosphat, superphosphat thông thường và amoni polyphosphat. Tất cả các phân bón này được tạo ra bằng quy trình xử lý hóa học các phosphat đá tự nhiên không tan trong các nhà máy sản xuất phân bón quy mô lớn và sản phẩm này là đất tiền. Theo phương pháp của sáng chế này, có thể giảm lượng dùng các phân bón cho đất trồng trong khi vẫn giữ được lượng phospho hấp thu từ đất trồng tương tự.

Theo một phương án cụ thể khác, nguồn phospho là phospho hữu cơ. Phân bón hữu cơ là chất bổ sung cho đất trồng có nguồn gốc từ các nguồn tự nhiên mà đảm bảo về, ít nhất, phần trăm nitơ, phosphat, và kali cacbonat tối thiểu. Các ví dụ bao gồm các sản phẩm phụ thực vật và động vật, bột đá, rong biển, chùn cây, và các chất xử lý. Chúng thường có sẵn ở các trung tâm của nghề làm vườn và qua các công ty cung cấp cho nghề làm vườn. Cụ thể, nguồn phospho hữu cơ này là từ bột xương, bột thịt, phân bón động vật, phân ủ, cặn dầu thải, hoặc phân chim.

Các loại phân bón khác, như các nguồn nitơ, hoặc các chất bổ sung cho đất trồng khác tất nhiên có thể cũng được thêm vào đất trồng ở gần thời điểm cung cấp nấm *Penicillium* vào hoặc ở các thời điểm khác, miễn là các nguyên liệu khác đó không độc đối với nấm.

Do nấm có tác dụng làm hòa tan phosphat mà có thể có sẵn trong đất trồng (nghĩa là, chúng tự nhiên có trong đất trồng) và cả các loại được thêm vào đất trồng, nên nấm có thể được cung cấp một mình cho đất trồng mà chứa nguồn phospho tự nhiên, hoặc có thể được cung cấp cho đất trồng bất kỳ cùng với các nguồn phospho thêm khác. Chùn cây bao gồm các chùn nấm theo sáng chế như được nêu trên có thể được tạo ra bằng cách lên men ở trạng thái rắn hoặc lỏng và một nguồn cacbon thích hợp.

Lượng chủng cây được cung cấp cho đất trồng không bị giới hạn ở lượng cụ thể bất kỳ nào. Rõ ràng, nếu lượng sử dụng không đủ, thì sẽ không thu được hiệu quả đáng chú ý. Nói cách khác, sử dụng một lượng lớn chủng cây sẽ lãng phí bởi vì lượng phospho và/hoặc vi chất dinh dưỡng có sẵn trong đất trồng đạt đến lượng tối đa với một tỷ lệ dùng nhất định và việc bổ sung thêm ngoài tỷ lệ này cũng không mang lại các lợi ích khác nữa. Tỷ lệ dùng thích hợp thay đổi theo kiểu đất trồng, kiểu cây trồng, số lượng của nguồn phospho và/hoặc vi chất dinh dưỡng có trong đất trồng hoặc được thêm vào đất trồng, .v.v. và tỷ lệ thích hợp có thể được tìm thấy không khó bằng thử nghiệm đơn giản và các thử nghiệm sai số cho mỗi trường hợp cụ thể. Thông thường, tỷ lệ dùng nằm trong khoảng từ 0,001 đến 1,0 kg bào tử nấm và hệ sợi nấm (theo trọng lượng tươi) trên một hecta, hoặc 10^2 - 10^6 đơn vị tạo khuẩn lạc (cfu) cho một hạt giống (khi sử dụng các hạt giống được bao), hoặc cung cấp trên chất mang dạng hạt từ 1×10^6 đến 1×10^{11} đơn vị tạo khuẩn lạc trên một hecta. Thậm chí, mặc dù chủng cây được sử dụng theo sáng chế này là hỗn hợp của ít nhất hai chủng cây khác nhau của *Penicillium* thì tổng lượng bào tử hoặc đơn vị tạo khuẩn lạc trong hỗn hợp được kết hợp cũng được đề cập đến trong suốt bản mô tả này.

Các tế bào nấm ở dạng, ví dụ, bào tử và tùy ý một chất mang có thể được thêm vào luống đất trồng gieo hạt giống ở gần rễ hoặc có thể được sử dụng để bao hạt giống trước khi trồng. Khi bào tử được thêm vào đất trồng, thì bào tử ở dạng hạt sẽ được ưu tiên. Các dạng công thức như lỏng, than bùn, hoặc bột thấm ướt sẽ thích hợp cho việc bao hạt giống. Khi được sử dụng để bao hạt giống, nguyên liệu có thể được trộn với nước, được cung cấp trên hạt giống và cho làm khô.

Các chất mang khác cho bào tử có thể được sử dụng để bao hạt giống. Ví dụ, bào tử có thể được tăng trưởng trên cám ẩm, được làm khô, rây và cung cấp trên các hạt giống trước khi được bao bằng chất dính, ví dụ gồm arabic.

Chất mang tốt hơn nên là chất mang tương thích với đất trồng. Thuật ngữ "tương thích với đất trồng" nghĩa là chất bất kỳ mà có thể thêm vào đất trồng mà không gây ra tác dụng có hại cho sự tăng trưởng của cây, cấu trúc đất trồng, sự tiêu nước của đất trồng hoặc tác dụng tương tự. Chất mang thích hợp bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, vỏ trấu lúa mì, cám, rơm rế lúa mì, bột hoặc hạt có nguồn gốc than bùn, hạt có nguồn gốc thạch cao, và đất sét (ví dụ, kaolin, bentonit, monmorillonit).

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến chế phẩm chứa ít nhất hai chủng của nấm *Penicilium fungus* theo sáng chế, và chất mang. Chất mang thích hợp bao gồm nước, dung dịch chứa nước, hồ nhão, chất rắn (ví dụ, than bùn, lúa mì, cám, chất khoáng bón cho cây, và đất trồng đã tiệt trùng) hoặc bột khô.

Chế phẩm theo sáng chế có thể được cung cấp thích hợp trong phương pháp của sáng chế để làm tăng sự có sẵn phospho trong đất trồng để cho cây hấp thu.

Theo một phương án cụ thể, ít nhất hai chủng *Penicilium* được chứa trong chế phẩm được chọn từ nhóm gồm có *Penicilium bilaiae* và *Penicilium gaestrivorus*. Cụ thể hơn, các chủng *Penicilium* được chọn từ nhóm gồm có NRRL 50169, NRRL 50162, NRRL 50170. Theo một phương án cụ thể khác, hai chủng là NRRL 50169 và NRRL 50162. Theo một phương án khác, hai chủng là NRRL 50162 và NRRL 50170.

Cụ thể theo một phương án, chất mang có thể là chất mang lỏng chứa chất dinh dưỡng cho nấm.

Vẫn theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến hạt giống của cây có màng bao chứa ít nhất hai chủng cây của nấm *Penicillium*, cụ thể là *P. bilaiae* và/hoặc *P. gaestrivorus*, và chất mang rắn cho nó tương hợp với đất trồng. Cụ thể hơn, các chủng *Penicillium* được chọn từ nhóm gồm có NRRL 50169, NRRL 50162, NRRL 50170. Theo một phương án cụ thể khác, hai chủng là NRRL 50169 và NRRL 50162. Theo một phương án khác, hai chủng là NRRL 50162 và NRRL 50170.

Chế phẩm có thể chứa thêm các chất phụ khác bao gồm chất đệm, chất làm ẩm, chất bao, và chất mài mòn.

Phương pháp theo sáng chế có khả năng có ích để cải thiện điều kiện tăng trưởng dẫn đến tăng lượng phospho được hấp thu và/hoặc sản lượng cho kiểu cây trồng bất kỳ. Theo một phương án cụ thể, cây được chọn từ nhóm bao gồm ngũ cốc, cây đậu, *Brassica* spp., hoa quả, rau, hạt, hoa, và lớp đất mặt. Cụ thể, ngũ cốc là lúa mì, ngô, gạo, yến mạch, lúa mạch đen, lúa mạch. Cụ thể, cây họ đậu là đậu lăng, đậu hời, đậu, đậu tương, đậu Hà lan, và cỏ linh lăng.

Theo một phương án cụ thể khác, cây được chọn từ nhóm bao gồm cỏ linh lăng, gạo, lúa mì, lúa mạch, lúa mạch đen, yến mạch, bông, hướng dương, lạc, ngô, khoai tây, khoai tây ngọt, đậu, đậu Hà lan, đậu hời, đậu lăng, rau diếp xoăn, rau diếp, rau diếp quăn, cải bắp, cải bruxen, củ cải đường, củ cải vàng, củ cải trắng, súp lơ, cây bông cải xanh, củ cải trắng, củ cải, rau bina, hành, tỏi, cây cà, cây ớt, cần tây, cà rốt, cây bí,

bí ngô, bí xanh, dưa chuột, táo, lê, dưa hấu, cam, dâu tây, nho, cây mâm xôi, dứa, đậu tương, thuốc lá, cà chua, cây lúa miến, và cây mía.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Đặc điểm của chủng phân lập

Phân tích gen vùng D2 của 28S rADN đã khẳng định rằng hai chủng ATCC 20851 (chủng P-201; cũng như NRRL 50169) và NRRL 50162 (chủng P-208) là thuộc *P. bilaiae*, cùng với việc thực hiện ở CSIRO (Úc) chứng minh chúng là các chủng khác nhau. Các chủng *P. bilaiae* được sắp xếp trình tự bởi phòng thí nghiệm MIDI ở Newark, DE bằng cách sử dụng toàn bộ đoạn môi của vùng D2 của gen 28S rADN. Thực hiện các phép tính so sánh về sự phát sinh loài bằng cách sử dụng chương trình CLUSTAX để sắp thẳng hàng trình tự với các loài có liên quan gần khác bằng phân tích trình tự BLAST khởi đầu. Mỗi lần tạo ra hồ sơ nhiều sự sắp thẳng hàng trình tự, thì xây dựng được cây liên kết cạnh nhau, và khuôn khoảng cách được tính làm cơ sở để xác định giống và các loài của chủng. Tất cả các việc sắp thẳng hàng và sự phát sinh loài được thực hiện bằng Mega 4.0. Các trình tự được nhập vào chương trình Alignment Explorer trong Mega, và sau đó được sắp thẳng hàng bằng cách sử dụng ClustalW. Cây phát sinh loài được xây dựng lên bằng cách sử dụng việc tạo bẫy ống để kiểm tra sự mạnh khỏe của cây.

Hai chủng đã được xác nhận là *Penicillium bilaiae* theo sự phân loại sau:

Giới	Nấm
Phân giới	<i>Dikarya</i>
Ngành	<i>Ascomycota</i>
Dưới ngành	<i>Pezizomycotina</i>
Lớp	<i>Eurotiomycetes</i>
Phân lớp	<i>Eurotiomycetidae</i>
Bậc	<i>Eurotiales</i>
Họ	<i>Trichocomaceae</i>
Phân họ	mitosporic (có tính tiệt biến) <i>Trichocomaceae</i>
Giống	<i>Penicillium</i>
Loài	<i>bilaiae</i>

Ví dụ 2: Thử nghiệm trên đồng ruộng về việc xử lý bằng hỗn hợp chủng

Các thử nghiệm trên đồng ruộng được thực hiện vào năm 2007 ở bốn vị trí nghiên cứu ở Mỹ để sàng lọc hiệu quả của việc cấy các chủng làm hòa tan phosphat *P. bilaiae* trên sản lượng thu hoạch ngô. Việc xử lý bao gồm hai chủng *P. bilaiae* riêng rẽ và hỗn hợp của chúng cũng như nhóm chứng không được cấy chủng.

Các thử nghiệm được thực hiện ở bốn khu vực ở Mỹ như các lô hoàn toàn ngẫu nhiên mà được tiến hành lặp lại 6 lần trong một thử nghiệm. Các thử nghiệm ở Mỹ được thực hiện bởi bốn công ty nghiên cứu độc lập ở bốn bang của nước Mỹ. Các người chủ nghiên cứu và các vị trí nghiên cứu là trung tâm nghiên cứu Viger Ag (Fergus Falls, MN), trung tâm nghiên cứu Benson (York, NE), trung tâm nghiên cứu Northern Plains Ag (Gardner, ND), và trung tâm nghiên cứu South Dakota Ag (Centerville, SD).

Thử nghiệm bao gồm bốn nhóm xử lý bao gồm nhóm xử lý dùng hai chủng *Penicillium* riêng rẽ là NRRL 50169 (chủng P-201 Novozymes) và NRRL 50162 (chủng P-208 Úc), nhóm xử lý dùng cả hai chủng, và nhóm đối chứng mà không cấy chủng. Tất cả các chủng *Penicillium* được tạo thành dưới dạng hạt than bùn.

Hạt than bùn đạt được sản xuất bằng cách cấy cơ chất với hỗn dịch bào tử lỏng. Chủng nuôi cấy *Penicillium* được lấy từ dạng bảo quản ở -80°C và đã sinh trưởng trên thạch dextroza khoai tây. Bào tử được lấy bằng cách sử dụng que thủy tinh để cạo trên bề mặt chủng nuôi cấy bào tử (thu được sau hai tuần ủ ở nhiệt độ trong phòng) trong nước vô khuẩn được bổ sung với 0,1% v/v Tween 80. Hỗn dịch bào tử của loài *Penicillium* thích hợp được thêm vào các hạt than bùn, mà sau đó được trộn kỹ để làm đồng đều việc cấy chủng, được bảo quản trong các túi giấy được lót chất dẻo, và được ủ trong từ 2 đến 8 tuần ở nhiệt độ trong phòng (khoảng từ 22 đến 27°C). Các túi được lấy mẫu ngẫu nhiên và phân tích đến gần đúng đơn vị tạo thành khuẩn lạc nấm cho mỗi lô hạt được cấy chủng. Ngắn gọn, thực hiện sự pha loãng hàng loạt bằng cách sử dụng nước vô khuẩn được bổ sung 0,1% v/v Tween 80. Các phần dung dịch pha loãng được đặt trên thạch dextroza khoai tây được bổ sung Rose Bengal và clotetrayclin. Các khuẩn lạc được đếm sau khi ủ từ 3 đến 5 ngày ở khoảng 25°C . Đối với nhóm xử lý dùng hỗn hợp chủng, thì các hạt chủng cấy được trộn để thu được hỗn hợp của các chủng phân lập *P. bilaiae* có tỷ lệ 1:1 bằng cách chuẩn độ.

Việc tạo ra mảnh đất thí nghiệm nhỏ trên đồng ruộng là cụ thể cho mỗi vị trí (xem bảng 1). Khoảng cách giữa các hàng gieo hạt là 30 inxơ, với 2 hàng ngang ngô cộng với hai hàng chắn trên mảnh đất thí nghiệm nhỏ. Việc bón phân bao gồm chương trình bón phân nitơ chuẩn (tại vị trí cụ thể), cộng với 10kg ha⁻¹ P₂O₅ được cung cấp cùng với hạt giống. Các chủng *Penicillium* được tạo thành dưới dạng hạt than bùn và cung cấp vào luống cây với tỷ lệ 4,5kg ha⁻¹ (từ 2,07 đến 2,17E+10 đơn vị tạo khuẩn lạc trên 1 ha).

Bảng 1. Mô tả chi tiết việc tạo ra mảnh đất thí nghiệm nhỏ trên đồng ruộng ở bốn vị trí ở Mỹ.

Vị trí	Giống hạt	Kích cỡ hạt (g 100 kernels ⁻¹)	Tỷ lệ gieo hạt (hạt giống ac ⁻¹)	Kích cỡ mảnh đất thí nghiệm nhỏ
Fergus Falls, MN	DK 40-07	21,25	34,000	10 x 20 ft
York, NE	Giống lai Cornhusker 1	28,33	33,000	525 ft ²
Gardner, ND	Mycogen 2K154	32,66	32,000	7,3 x 30 ft
Centerville, SD	NK 51-T8	29,46	28,000	10 x 30 ft

Phân tích thử nghiệm dùng hỗn hợp chủng cho thấy sản lượng ngô của nhóm dùng hỗn hợp *P. bilaiae* cao hơn đáng kể so với nhóm chứng không cấy chủng (Fig. 1). Hỗn hợp *P. bilaiae* tạo ra sản lượng vượt xa so với sản lượng được tạo ra khi sử dụng các chủng *P. bilaiae* riêng rẽ. Hỗn hợp các chủng *P. bilaiae* là nhóm xử lý có tác dụng mạnh nhất trên sản lượng ngô trong các nghiên cứu này.

Ví dụ 3: Hoà tan phosphat không tan

Các chủng *P. bilaiae* làm hòa tan phosphat được dùng trong các thử nghiệm trong phòng thí nghiệm kiểm tra khả năng các sinh vật này hòa tan các canxi phosphat không tan. Thử nghiệm này bao gồm hai chủng *P. bilaiae* riêng rẽ và hỗn hợp ở hai nồng độ khác nhau, cũng như cả một nhóm chứng không cấy chủng.

Cân hydroxyapatit vào các bình thí nghiệm Erlenmeyer 300mL với tỷ lệ 100mg P cho một bình. Môi trường muối tối thiểu được điều chế như sau (g L⁻¹): 0,1 NaCl, 0,4 NH₄Cl, 0,78 KNO₃, 0,1 CaCl₂·2H₂O, 1,0 MgSO₄·7H₂O, 10,0 sucroza. Thêm

100mL môi trường vào mỗi bình, và các bình được nút lại bằng một nút bọt và hấp (121°C và 1,2 atm trong 30 phút). Ba bình được cấy với dung dịch bào tử gốc đến tỷ lệ cấy mục tiêu là $4,00E+06$ bào tử trong một bình. Đối với nhóm xử lý dùng hỗn hợp *P. bilaiae*, các bình được cấy $4,00E+06$ bào tử của mỗi chủng trong một bình, hoặc tổng nồng độ bào tử là $4,00E+06$ bào tử trong một bình (nghĩa là, $2,00E+06$ bào tử của mỗi chủng trong một bình). Các bình được ủ ở nhiệt độ môi trường trong phòng trong bình lắc quay được đặt với tốc độ 175 vòng/phút. Các mẫu con được lấy một cách vô khuẩn ở các thời điểm 3, 5, 7, và 10 ngày sau khi cấy chủng và được phân tích lượng phosphat hòa tan bằng cách sử dụng phương pháp xanh-malachit.

Hỗn hợp các chủng *P. bilaiae* có khả năng hòa tan hydroxyapatit nhiều hơn đáng kể so với dùng các chủng một mình, như được chỉ ra bởi các lượng phosphat hòa tan tăng lên, và tỷ lệ cấy chủng nhỏ không gây tác dụng (Fig. 2).

Ví dụ 4: Thử nghiệm dùng hỗn hợp chủng cấy trong phòng tăng trưởng

Thử nghiệm trong phòng tăng trưởng được thiết lập vào năm 2009 để sàng lọc hiệu quả cấy các chủng *P. bilaiae* làm hòa tan phosphat trên lượng chất khô tích lũy của đậu tương và ngô. Các thử nghiệm bao gồm hai chủng *P. bilaiae* riêng rẽ và hỗn hợp của chúng cũng như một nhóm chứng không cấy chủng.

Thử nghiệm được thiết lập dưới dạng giai thừa ngẫu nhiên được lặp lại 8 lần cho một thử nghiệm. Hai nhân tố là phân bón phosphat và chủng cấy. Lượng phân bón cho đậu tương là 0, 20, 40, và 80 lb P_2O_5 ac^{-1} , và cho ngô là 0, 40, 80, và 160 lb P_2O_5 ac^{-1} . Nhân tố chủng cấy bao gồm không cấy chủng, hai chủng cấy *Penicillium* riêng rẽ [NRRL 50169 (chủng P-201 Novozymes) và NRRL 50162 (chủng P-208 Úc)], và hai chủng cấy của *Penicillium* với số lượng bằng nhau.

Các bình chất dẻo được dán nhãn theo cách xử lý và một vải trồng cây màu đen hình vuông vô khuẩn được đặt vào đáy của mỗi bình để ngăn cản hỗn hợp kết lại do rò rỉ qua các lỗ tiêu nước. Các bình được đổ đầy hỗn hợp cát thạch anh công nghiệp và chất khoáng bón cây được nghiền mịn với tỷ lệ 1:1. Mỗi bình được xử lý với một tỷ lệ hỗn dịch phosphat thích hợp được điều chế bằng cách sử dụng hydroxyapatit, được hàn kín bên trong túi có khóa kéo, và để cho cân bằng trong 7 ngày trước khi gieo hạt.

Các chủng cấy dùng thử nghiệm được cung cấp dưới dạng hạt giống lỏng. Dung chủng nuôi cấy *Penicillium* được lấy từ dạng bảo quản ở -80°C và đã tăng trưởng trên thạch dextroza khoai tây. Bào tử được lấy bằng cách sử dụng que thủy tinh

cạo trên bề mặt chủng nuôi cấy bào tử (thu được sau hai tuần ủ ở nhiệt độ trong phòng) vào nước vô khuẩn được bổ sung 0,1% v/v Tween 80. Hỗn dịch bào tử được chuẩn độ, trộn kỹ, và các lô hạt giống đã được cân trước được thêm vào các túi chất dẻo với tỷ lệ $1,50E+05$ đơn vị tạo khuẩn lạc cho một hạt giống. Đối với hỗn hợp chủng cấy, thì hỗn hợp các chủng phân lập *P. bilaiae* với tỷ lệ 1:1 đạt được bằng việc chia đôi thể tích hỗn dịch bào tử được yêu cầu để đạt đến tỷ lệ cấy mục tiêu cho mỗi chủng (nghĩa là, tỷ lệ cấy cuối cùng giữ nguyên là $1,50E+05$). Nhóm thử nghiệm đối chứng không có chủng cấy được xử lý bằng nước vô khuẩn. Các túi chất dẻo được hàn kín và lắc mạnh trong từ 1 đến 2 phút để bao đều các hạt giống. Các túi lại được mở ra, và hạt giống được làm khô trong từ 20 đến 30 phút trước khi trồng cây.

Mỗi bình được trồng 5 hạt giống đậu tương và ngô. Dung dịch chất dinh dưỡng không có phosphat được thêm vào các bình ở thời điểm gieo hạt, và ở các thời điểm cứ sau hai tuần trong khoảng thời gian thử nghiệm. Các bình được đặt vào phòng tăng trưởng với sự sắp đặt ngày/đêm là 16/8 giờ và ở 20/15°C, và được cấp nước theo yêu cầu. Các bình được làm thưa đến mức ba cây giống sau khi trồng từ một đến hai tuần. Thu hoạch cây sau khi trồng khoảng 7 và 6 tuần tương ứng cho đậu tương và ngô. Các cành non phía trên mặt đất trồng được cắt bỏ, đặt vào trong các túi giấy đã được cân bì trước, và làm khô trong 10 ngày ở 72°C để xác định trọng lượng cành non khô.

Với tất cả các lượng phân bón, đậu tương đã thể hiện lượng cành non khô tích lũy trong nhóm xử lý bằng hỗn hợp *P. bilaiae* cao hơn so với nhóm chứng không cấy chủng (Fig. 3). Nhóm xử lý bằng hỗn hợp *P. bilaiae* cũng thể hiện kết quả này tốt hơn so với các nhóm xử lý bằng các chủng *P. bilaiae* riêng rẽ.

Ngô đã cho thấy lượng cành non khô tích lũy của nhóm xử lý bằng hỗn hợp *P. bilaiae* cao hơn so với nhóm chứng không cấy chủng ở tất cả các lượng phân bón (Fig. 4). Nhóm xử lý bằng hỗn hợp *P. bilaiae* cũng cho thấy kết quả này tốt hơn nhóm xử lý bằng các chủng *P. bilaiae* một mình ở các tỷ lệ phân bón là 40 và 80 lb P_2O_5 ac⁻¹.

Việc lưu giữ nguyên liệu sinh học

Nguyên liệu sinh học dưới đây được lưu giữ theo các điều kiện của hiệp ước Budapest với trung tâm thu thập chủng nuôi cấy patent dùng cho dịch vụ nghiên cứu về nông nghiệp (Agricultural Research Service Patent Culture Collection - NRRL),

trung tâm nghiên cứu phía bắc (Northern Regional Research Center), 1815 N. University Street, Peoria, Illinois, 61604, Mỹ, và được nhận số truy cập sau:

<u>Nguyên liệu ký gửi</u>	<u>Số truy cập</u>	<u>Ngày ký gửi</u>
---------------------------	--------------------	--------------------

<i>Penicillium bilaiae</i>	NRRL 50169	28 tháng 8 năm 2008
----------------------------	------------	---------------------

Nguyên liệu sinh học dưới đây được lưu giữ theo các điều kiện của hiệp ước Budapest với trung tâm thu thập chủng nuôi cấy patent dùng cho dịch vụ nghiên cứu về nông nghiệp (Agricultural Research Service Patent Culture Collection - NRRL), trung tâm nghiên cứu phía bắc (Northern Regional Research Center), 1815 N. University Street, Peoria, Illinois, 61604, Mỹ, và được nhận số truy cập sau:

<u>Nguyên liệu ký gửi</u>	<u>Số truy cập</u>	<u>Ngày ký gửi</u>
---------------------------	--------------------	--------------------

<i>Penicillium bilaiae</i>	NRRL 50162	11 tháng 8 năm 2008
----------------------------	------------	---------------------

Nguyên liệu sinh học dưới đây được lưu giữ theo các điều kiện của hiệp ước Budapest với trung tâm thu thập chủng nuôi cấy patent dùng cho dịch vụ nghiên cứu về nông nghiệp (Agricultural Research Service Patent Culture Collection - NRRL), trung tâm nghiên cứu phía bắc (Northern Regional Research Center), 1815 N. University Street, Peoria, Illinois, 61604, Mỹ, và được nhận số truy cập sau:

<u>Nguyên liệu ký gửi</u>	<u>Số đầu vào</u>	<u>Ngày ký gửi</u>
---------------------------	-------------------	--------------------

<i>Penicillium gaestrivorus</i>	NRRL 50170	28 tháng 8 năm 2008
---------------------------------	------------	---------------------

Các chủng được lưu giữ trong các điều kiện đảm bảo rằng chủng nuôi cấy sẽ sẵn sàng được tiếp cận trong thời gian đơn yêu cầu cấp patent này chưa được giải quyết do luật patent nước ngoài. Nguyên liệu lưu giữ là chủng nuôi cấy hầu như tinh khiết của chủng lưu giữ. Nguyên liệu lưu giữ có sẵn như được yêu cầu bởi luật patent nước ngoài ở các nước là đối tác của đơn yêu cầu cấp patent này, hoặc các nước khác mà nó được nộp vào. Tuy nhiên, nên hiểu rằng sự sẵn có của nguyên liệu lưu giữ này không tạo ra quyền thực hành sáng chế này mà vi phạm quyền patent được cấp bởi chính phủ.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp làm tăng sự sẵn có phospho để cho cây hấp thu từ đất trồng, trong đó phương pháp này bao gồm việc đưa vào đất trồng nguyên liệu cây của ít nhất hai chủng khác nhau của nấm *Penicillium* được chọn từ nhóm bao gồm *P. bilaiae*, *P. gaestrivorus* và hỗn hợp của chúng.
2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó *P. bilaiae* được chọn từ nhóm bao gồm NRRL 50169, ATCC 20851, ATCC 22348, ATCC 18309 và NRRL 50162.
3. Phương pháp theo điểm 2, trong đó các chủng được lựa chọn là NRRL 50169 và NRRL 50162.
4. Phương pháp theo điểm 1, trong đó phương pháp này còn bước bổ sung thêm nguồn phospho vào đất trồng.
5. Phương pháp theo điểm 4, trong đó nguồn phospho này là đá phosphat (rock phosphate).
6. Phương pháp theo điểm 4, trong đó nguồn phospho này là một loại phân bón được sản xuất.
7. Phương pháp theo điểm 6, trong đó phân bón được sản xuất này được lựa chọn từ nhóm bao gồm monoamoni phosphat, trisupephosphat, diamoni phosphat, supephosphat thông thường và amoni polyphosphat.
8. Phương pháp theo điểm 4, trong đó nguồn phospho này là phospho hữu cơ.
9. Phương pháp theo điểm 8, trong đó nguồn phospho hữu cơ này bao gồm bột xương, bột thịt, phân động vật, phân hữu cơ, bùn thải, phân chim hoặc hỗn hợp của chúng.
10. Phương pháp theo điểm 1, trong đó nguyên liệu cây được bổ sung thêm vào đất trồng với lượng nằm trong khoảng từ 10^6 đến 10^{11} đơn vị tạo khuẩn lạc trên một hecta.

11. Phương pháp theo điểm 1, trong đó nấm *Penicillium* được đưa vào đất trồng làm lớp phủ hạt chứa một lượng nằm trong khoảng từ 10^1 đến 10^8 đơn vị tạo khuẩn lạc cho một hạt.

12. Phương pháp theo điểm 1, trong đó cây trồng được lựa chọn từ nhóm bao gồm ngũ cốc, cây họ đậu, *Brassica* spp., trái cây, rau, hạt, hoa và cỏ.

13. Phương pháp theo điểm 11, trong đó nấm *Penicillium* được đưa vào đất trồng làm lớp phủ hạt chứa một lượng nằm trong khoảng từ 10^2 đến 10^6 đơn vị tạo khuẩn lạc cho một hạt.

14. Phương pháp làm tăng điều kiện tăng trưởng của cây trồng, trong đó phương pháp này bao gồm bước trồng cây trên đất trồng chứa, ở phần gần rễ cây, có cả nguồn phospho và ít nhất hai chủng được xác định bởi số hiệu lưu trữ NRRL 50169 và NRRL 50162.

15. Chế phẩm để cung cấp cho đất trồng, trong đó chế phẩm này chứa:

- i) nguyên liệu cấy của ít nhất hai chủng của nấm *Penicillium* được lựa chọn từ nhóm bao gồm *P. bilaiae*, *P. gaestrivorus* và hỗn hợp của chúng; và
- ii) chất mang cho các nấm tương thích với đất trồng.

16. Chế phẩm theo điểm 15, trong đó các chủng này được xác định bởi số lưu trữ NRRL 50169 và NRRL 50162.

17. Chế phẩm theo điểm 15, trong đó chế phẩm ở dạng lớp phủ cho hạt cây trồng.

18. Hạt của cây trồng có lớp phủ chứa nguyên liệu cấy của ít nhất hai chủng của nấm *Penicillium* được lựa chọn từ nhóm bao gồm *P. bilaiae*, *P. gaestrivorus* và hỗn hợp của chúng; và chất mang rắn tương thích với đất trồng.

19. Hạt của cây theo điểm 18, trong đó các chủng *Penicillium* được xác định bởi số lưu trữ NRRL 50169 và NRRL 50162.

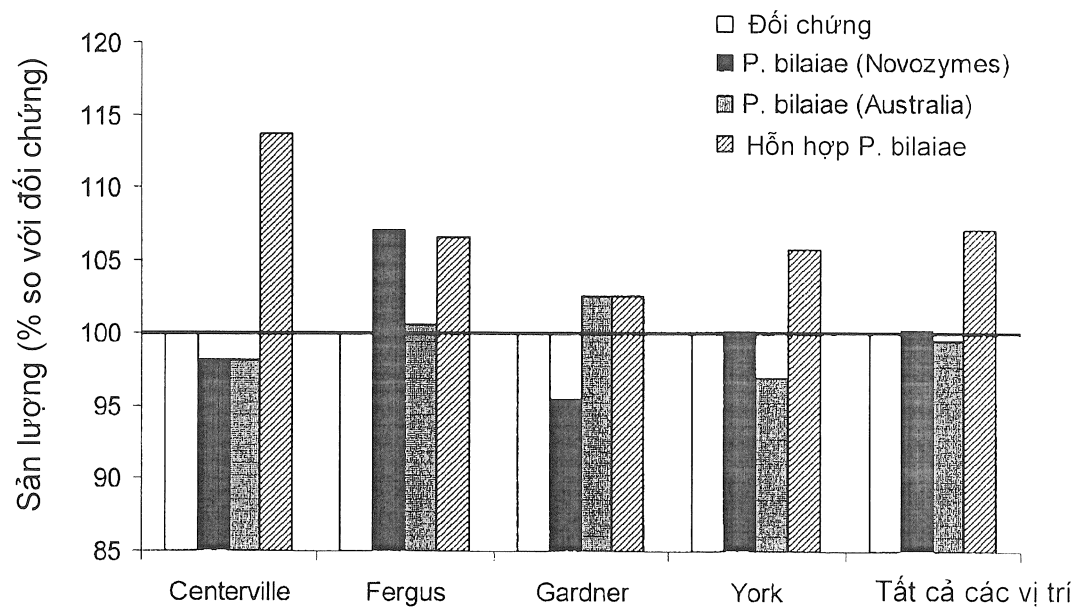


Fig.1

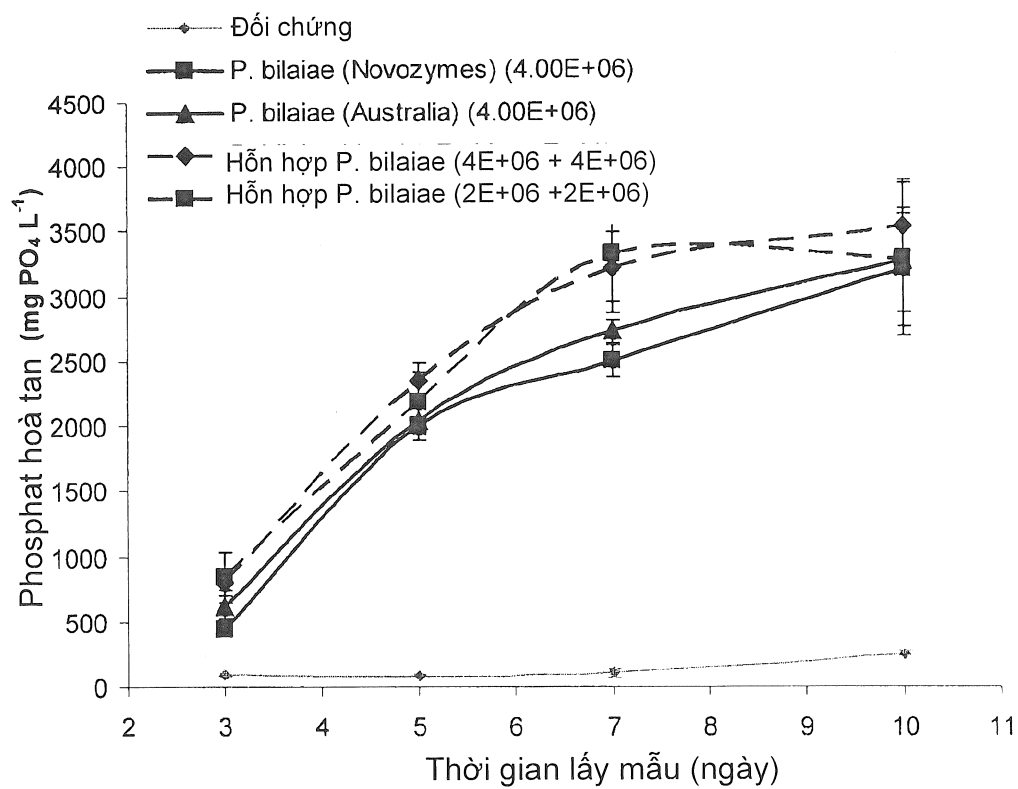


Fig.2

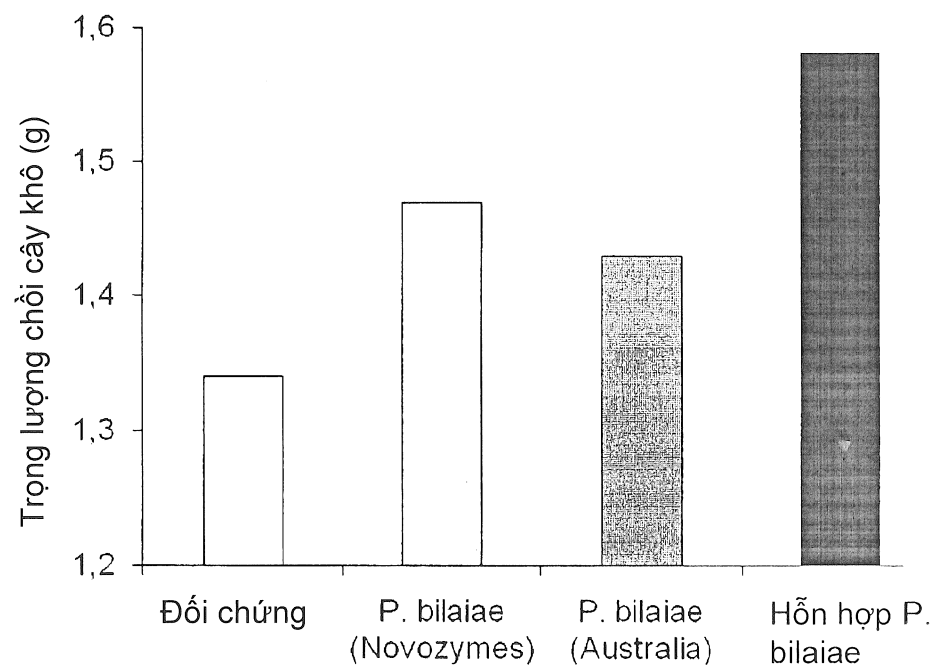


Fig.3

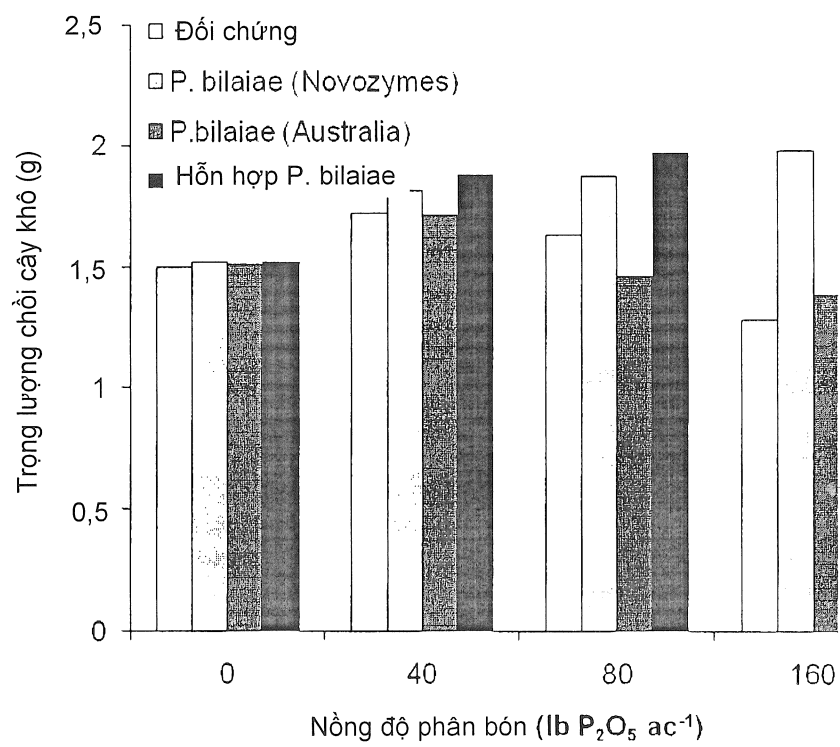


Fig.4