



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0025535

(51)⁷ A01C 1/00; A01N 63/00; A01P 3/00;
A01N 25/00

(13) B

(21) 1-2015-03759

(22) 07/03/2014

(86) PCT/JP2014/056059 07/03/2014

(87) WO/2014/136967 12/09/2014

(30) 2013-047121 08/03/2013 JP

(45) 25/09/2020 390

(43) 25/12/2015 333A

(73) NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION TOKYO UNIVERSITY OF
AGRICULTURE AND TECHNOLOGY (JP)

3-8-1, Harumi-cho, Fuchu-shi, Tokyo 183-8538, Japan

(72) ARIE Tsutomu (JP); TERAOKA Tohru (JP); NONAKA Youko (JP); KATO Akihiro
(JP); TANAKA Jun (JP); TOKUNAGA Tomomi (JP); KURAUCHI Kenichi (JP);
SUZUKI Tomotaka (JP).

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

(54) PHƯƠNG PHÁP TẠO RA HẠT GIỐNG CỦA CÂY CÓ ĐẶC TÍNH KHÁNG CÁC
BỆNH TRÊN CÂY GIỐNG CON

(57) Để phát triển chất diệt loài gây hại dựa trên vi sinh vật với chi phí không đắt và an toàn có hiệu quả kháng cao đối với các bệnh trên cây giống con như bệnh mốc hồng để đảm bảo sản xuất và cung cấp thực phẩm ổn định, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra hạt giống của cây có đặc tính kháng các bệnh trên cây giống con, bao gồm bước cho vi sinh vật không gây bệnh tương ứng với nguồn gây bệnh trong hạt giống tiếp xúc với phần hoa của cây chủ xung quanh thời điểm ra hoa và bước thu gom hạt giống của cây chủ đã được xâm nhập bởi vi sinh vật không gây bệnh thu được sau bước tiếp xúc, và phương pháp sử dụng hạt này để kiểm soát các bệnh trên cây giống con.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp tạo ra hạt giống cây có đặc tính kháng các bệnh trên cây giống con sử dụng vi sinh vật không gây bệnh tương ứng với nguồn gây bệnh trong hạt giống, và kỹ thuật ngăn ngừa sự khởi phát và kiểm soát các bệnh trên cây giống con ở thế hệ sau sử dụng hạt giống cây có đặc tính kháng bệnh nêu trên.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Bệnh có trong hạt giống của cây trồng, cùng với bệnh trong đất, được phân vào nhóm các bệnh trên cây giống con. Nguồn gây bệnh trong hạt giống gây ra bệnh có trong hạt giống thường được truyền sang thế hệ sau thông qua hạt giống mang nguồn gây bệnh này và được phát tán bằng cách gây nhiễm các cây giống con ở thế hệ sau.

Ví dụ, bệnh mốc hồng là bệnh gây hại hạt thóc giống quan trọng trong nông nghiệp do nấm gây bệnh mốc hồng trên thóc thuộc *Fusarium fujikuroi* (tên trong giai đoạn phát triển hoàn chỉnh: *Gibberella fujikuroi*) gây ra. Khi thóc giống (các hạt thóc) nảy mầm bị nấm gây bệnh mốc hồng xâm nhập sẽ dẫn tới, không chỉ nguy cơ nấm gây bệnh bị truyền sang các cây mạ khỏe mạnh xung quanh mà còn làm cho các cây nhiễm bệnh có sự sinh trưởng mạnh khỏe bất thường và có triệu chứng úa vàng và héo sau đó. Ở cây bị héo, nhiều bào tử đỉnh của nấm được tạo ra trên bề mặt của bề lá dưới, và các bào tử này phát tán và dính vào phần hoa, nhụy, bao phấn, và xác bao phấn của nguyên liệu giống khỏe mạnh xung quanh gây nhiễm cho các hạt lúa. Mỗi hạt lúa này tạo ra nguồn lây nhiễm vào năm sau do hạt giống mang nguồn nấm nêu trên (Tài liệu không patent 1).

Bệnh này có thể được kiểm soát một cách hiệu quả bằng cách tẩy trùng hạt giống sử dụng hóa chất diệt loài gây hại như benomyl và pefurazoat, và do đó, kiểm chế được bệnh này trên cánh đồng trong một thời gian dài. Tuy nhiên, có một vấn đề đó là các chất này thường bị mất tác dụng do việc phụ thuộc quá mức vào hóa chất diệt

loài gây hại sẽ đẩy nhanh việc xuất hiện các chủng kháng các hóa chất này. Ngoài ra, việc sử dụng chất diệt nấm có cơ chế tác động khác như ipconazol cũng kiềm chế được bệnh này. Tuy nhiên, việc sử dụng hóa chất diệt loài gây hại thường tạo ra nguy cơ xuất hiện các chủng nấm kháng thuốc và cũng gây ra các vấn đề như ô nhiễm môi trường và dư lượng trong gạo. Do mối quan tâm đến môi trường ngày càng gia tăng, cần chuyển đổi sang nền nông nghiệp thân thiện với môi trường và phát triển bền vững, và ví dụ, phương pháp kiểm soát vật lý, như phương pháp ngâm nước nóng, và phương pháp kiểm soát sinh học sử dụng chất diệt loài gây hại dựa trên vi sinh vật bắt đầu được nhân rộng dưới dạng kỹ thuật kiểm soát thay thế cho việc dùng hóa chất diệt loài gây hại. Các phương pháp này đều tập trung vào việc đem lại cảm giác an toàn cho người tiêu dùng bằng cách cung cấp các sản phẩm nông nghiệp an toàn, làm giảm tác động đến môi trường bằng cách bảo vệ cây trồng, và kiểm soát sâu bệnh mà các hóa chất diệt loài gây hại gần như không thể sử dụng.

Tuy nhiên, trong khi hiệu quả của phương pháp kiểm soát vật lý và kiểm soát sinh học thông thường không ổn định so với hóa chất diệt loài gây hại và chúng có vấn đề là không có đủ khả năng ức chế việc phát bệnh có trong hạt giống bao gồm cả bệnh mốc hồng và vấn đề này làm tăng nhân lực khi xử lý. Ngoài ra, chất diệt loài gây hại dựa trên vi sinh vật gặp phải vấn đề về mặt chi phí, và phương pháp kiểm soát vật lý gặp phải vấn đề như việc xử lý phức tạp và tỷ lệ nảy mầm của hạt giống giảm.

Tài liệu được dùng làm tình trạng kỹ thuật

Tài liệu không patent

Tài liệu không patent 1: Sakumotsu Byogai Jiten (Từ điển bệnh trên cây trồng), được biên soạn bởi Kunihei Kishi, Zenkoku Nosonkyoiku Kyokai (Hiệp hội quốc gia về giáo dục nông thôn của Nhật Bản - National Rural Education Association of Japan)

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề được sáng chế giải quyết

Mục đích của sáng chế là phát triển vi sinh vật dùng làm tác nhân kiểm soát sinh học có thể được cung cấp với chi phí thấp, an toàn và có hiệu quả cao trong việc kiểm

soát các bệnh trên cây giống con kể cả bệnh có trong hạt giống và bệnh trong đất; cung cấp chất diệt loài gây hại dựa trên vi sinh vật sử dụng vi sinh vật nêu trên làm thành phần hoạt tính; và thiết lập phương pháp xử lý hiệu quả chất diệt loài gây hại dựa trên vi sinh vật nêu trên và kiểm soát một cách hiệu quả các bệnh trên cây giống con; cung cấp kỹ thuật có thể làm giảm nhân công và chi phí canh tác và cho phép canh tác ổn định các sản phẩm nông nghiệp an toàn, để sản xuất và cung cấp thực phẩm ổn định.

Cách thức để giải quyết vấn đề

Như được mô tả ở trên, vấn đề chính của phương pháp kiểm soát sinh học sử dụng chất diệt loài gây hại dựa trên vi sinh vật là ở chỗ hiệu quả của nó không ổn định. Một trong số các nguyên nhân đó là vi sinh vật làm thành phần hoạt tính khó xâm nhập vào các phần của cây hoặc vào mô, vùng rễ, và các bộ phận khác trong một khoảng thời gian cho đến khi vi sinh vật phát huy tác dụng kiểm soát.

Các tác giả sáng chế đã phát hiện kỹ thuật ứng dụng khả năng kiểm soát sinh học chống lại các bệnh trên cây giống con bằng cách tạo ra hạt giống đã bị vi sinh vật không gây bệnh xâm nhập trước đó bằng cách sử dụng vi sinh vật không gây bệnh tương ứng với nguồn gây bệnh trong hạt giống và có khả năng xâm nhập vào cây trồng sử dụng phương pháp như phun lên phần hoa của cây chủ vào thời điểm ra hoa, theo đó cho phép vi sinh vật không gây bệnh thâm nhập vào các bộ phận của cây ở thế hệ sau. Từ kết quả thử nghiệm, thấy rằng cây như cây giống con ở thế hệ sau có thể được vi sinh vật không gây bệnh xâm nhập và/hoặc đạt được đặc tính kháng với nguồn gây bệnh này nhờ đó việc xuất hiện các bệnh trên cây giống con kể cả bệnh trong đất cũng như bệnh có trong hạt giống bị ức chế một cách hiệu quả. Sáng chế dựa trên các phát hiện này và đề xuất các đối tượng sau.

(1) Phương pháp tạo ra hạt giống của cây có đặc tính kháng các bệnh trên cây giống con, bao gồm bước cho vi sinh vật không gây bệnh tương ứng với nguồn gây bệnh trong hạt giống tiếp xúc với phần hoa của cây chủ xung quanh thời điểm ra hoa, và bước thu gom hạt giống của cây chủ đã được xâm nhập bởi vi sinh vật không gây bệnh, thu được sau bước nêu trên.

(2) Phương pháp tạo ra hạt giống theo mục (1), trong đó cây chủ là cây họ cỏ.

(3) Phương pháp tạo ra hạt giống theo mục (2), trong đó cây họ cỏ là lúa.

(4) Phương pháp tạo ra hạt giống theo mục bất kỳ từ (1) đến (3), trong đó vi sinh vật không gây bệnh được chọn từ nhóm bao gồm nấm thuộc chi *Fusarium*, chi *Nectria*, chi *Gibberella*, chi *Calonectria*, chi *Hypomyces*, chi *Trichoderma*, chi *Penicillium*, chi *Talaromyces*, chi *Acremonium*, chi *Alternaria*, và chi *Verticillium* và vi khuẩn thuộc chi *Bacillus*, chi *Pseudomonas*, chi *Xanthomonas*, và chi *Streptomyces*.

(5) Phương pháp tạo ra hạt giống theo mục bất kỳ từ (1) đến (3), trong đó vi sinh vật không gây bệnh là nấm thuộc chi *Fusarium* được chọn từ nhóm bao gồm *Fusarium oxysporum*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium fujikuroi*, *Fusarium proliferatum*, và *Fusarium sacchari*.

(6) Phương pháp tạo ra hạt giống theo mục bất kỳ từ (1) đến (3), trong đó vi sinh vật không gây bệnh là vi sinh vật có số nộp lưu NITE BP-01538 hoặc NITE BP-01539.

(7) Hạt giống của cây có đặc tính kháng các bệnh trên cây giống con thu được bằng cách cho vi sinh vật không gây bệnh tương ứng với nguồn gây bệnh trong hạt giống tiếp xúc với phần hoa của cây chủ xung quanh thời điểm ra hoa.

(8) Hạt giống theo mục (7), trong đó cây chủ là cây họ cỏ.

(9) Hạt giống theo mục (7) hoặc (8), trong đó vi sinh vật không gây bệnh là vi sinh vật không gây bệnh như được xác định trong mục bất kỳ từ (4) đến (6).

(10) Phương pháp ngăn ngừa sự khởi phát và kiểm soát các bệnh trên cây giống con sử dụng hạt giống của cây có đặc tính kháng các bệnh trên cây giống con theo mục (7) hoặc (8).

(11) Phương pháp ngăn ngừa và kiểm soát theo mục (10), trong đó cây nêu trên là cây họ cỏ.

(12) Phương pháp ngăn ngừa và kiểm soát theo mục (10) hoặc (11), trong đó các bệnh trên cây giống con là bệnh có trong hạt giống và bệnh trong đất.

(13) Chất diệt loài gây hại dựa trên vi sinh vật dùng để kiểm soát các bệnh trên cây giống con bao gồm vi sinh vật không gây bệnh tương ứng với nguồn gây bệnh trong hạt giống làm thành phần hoạt tính.

(14) Chất diệt loài gây hại dựa trên vi sinh vật theo mục (13), trong đó chất diệt loài gây hại dựa trên vi sinh vật là để dùng cho cây họ cỏ.

(15) Chất diệt loài gây hại dựa trên vi sinh vật theo mục (13) hoặc (14), trong đó vi sinh vật không gây bệnh là vi sinh vật không gây bệnh như được xác định trong mục bất kỳ từ (4) đến (6).

Nội dung của bản mô tả và/hoặc các hình vẽ của đơn yêu cầu cấp Patent Nhật số 2013-047121, là đơn ưu tiên của đơn này được đưa vào đây.

Hiệu quả của sáng chế

Hạt giống của cây có đặc tính kháng các bệnh trên cây giống con theo sáng chế cho phép tạo ra và cung cấp cá thể cây giống con (cây giống) kháng các bệnh trên cây giống con.

Bằng phương pháp tạo ra hạt giống của cây có đặc tính kháng các bệnh trên cây giống con theo sáng chế, hạt giống của cây có đặc tính kháng các bệnh trên cây giống con có thể thu được một cách đơn giản và hiệu quả.

Bằng phương pháp ngăn ngừa sự khởi phát và kiểm soát các bệnh trên cây giống con theo sáng chế, sự khởi phát của các bệnh trên cây giống con có thể được ngăn ngừa và kiểm soát.

Chất diệt loài gây hại dựa trên vi sinh vật dùng để kiểm soát các bệnh trên cây giống con theo sáng chế cho phép cung cấp chất diệt loài gây hại dựa trên vi sinh vật không đắt tiền và hiệu quả cao để ngăn ngừa và kiểm soát một cách hiệu quả các bệnh trên cây giống con.

Mô tả chi tiết sáng chế

Cách thức tiến hành sáng chế

1. Phương pháp tạo ra (các) hạt giống của cây có đặc tính kháng các bệnh trên cây giống con

Khía cạnh thứ nhất của sáng chế đề cập đến phương pháp tạo ra (các) hạt giống của cây có đặc tính kháng các bệnh trên cây giống con (ở đây thường gọi là "phương pháp tạo ra"). Phương pháp tạo ra theo sáng chế cho phép tạo ra (các) hạt giống cây có

đặc tính kháng bệnh thu được giống như đặc tính của cây trồng kháng các bệnh trên cây giống con bằng cách sử dụng vi sinh vật dùng làm tác nhân kiểm soát sinh học, và cung cấp hạt giống cây nêu trên.

1-1. Định nghĩa

Các thuật ngữ được sử dụng ở đây sẽ được định nghĩa như sau.

"Bệnh trên cây giống con" là bệnh của cây được truyền hoặc xuất hiện trong giai đoạn phát triển cây giống, và bao gồm bệnh có trong hạt giống và bệnh trong đất.

"Bệnh có trong hạt giống" là bệnh của cây xuất hiện do việc nhiễm nguồn gây bệnh trong hạt giống và là bệnh được truyền cho nguyên liệu giống cây liên quan cũng như nguyên liệu giống xung quanh thông qua, ví dụ, hạt giống bị nguồn gây bệnh trong hạt giống xâm nhập trong khi ngâm hạt hoặc trong quá trình nảy mầm. Trái lại, "bệnh trong đất" là bệnh của cây xuất hiện do nhiễm nguồn gây bệnh có nguồn gốc sống trong đất.

"Nguồn gây bệnh trong hạt giống" chỉ vi sinh vật xâm nhập vào trong hạt sau khi gây nhiễm phần hoa được tạo thành ở cây chủ và tạo ra các triệu chứng bệnh ở cá thể cây giống con. Như được sử dụng ở đây, "cá thể cây giống con" chỉ cây giống con nảy mầm từ hạt giống hoặc cá thể cây thu được từ quá trình sinh trưởng của hạt. Như được sử dụng ở đây, "vi sinh vật" thường chỉ sinh vật quan sát được dưới kính hiển vi, khó nhận biết được bằng mắt thường, ví dụ, vi khuẩn và nấm. Nấm thuộc nhóm sinh vật nhân chuẩn thuộc giới nấm xét về phân loại sinh học, và đôi khi, được gọi là nấm thực hoặc nấm sợi. Nấm bao gồm cả vi sinh vật nhân chuẩn đơn bào, như nấm men, hoặc vi sinh vật nhân chuẩn đa bào, như nấm sợi mà tương đối khó quan sát bằng mắt thường (bao gồm nấm mốc) và nấm rơm.

Như được mô tả ở trên, nguồn gây bệnh trong hạt giống là nhóm có khả năng gây bệnh, thuộc các loài vi sinh vật nhất định. Ví dụ về các vi sinh vật bao gồm nguồn gây bệnh trong hạt giống kể cả vi khuẩn chi *Bacillus*, chi *Pseudomonas* (hiện nay bao gồm vi khuẩn thuộc chi *Burkholderia* và chi *Acidovorax*), chi *Xanthomonas*, và chi *Streptomyces*, và nấm thuộc chi *Fusarium*, chi *Nectria*, chi *Gibberella*, chi *Calonectria*, chi *Hypomyces*, chi *Trichoderma*, chi *Penicillium*, chi *Talaromyces*, chi *Acremonium*,

chi *Alternaria*, và chi *Verticillium*. Ví dụ về nấm thuộc chi *Fusarium* bao gồm *F. oxysporum*, *F. moniliforme*, *F. fujikuroi*, *F. proliferatum*, và *F. sacchari*. Chi *Fusarium* là tên chính của chi *Gibberella* ở giai đoạn chưa hoàn thiện, và chi *Gibberella* ở đây đồng nghĩa với chi *Fusarium*. Đường lây nhiễm và thời điểm lây nhiễm của nguồn gây bệnh trong hạt giống vào cây chủ thay đổi chút ít, phụ thuộc vào loại cây chủ, nhưng nguồn gây bệnh thường nhiễm vào phần hoa của cây chủ trong thời kỳ ra hoa và sau đó, xâm nhập vào trong hạt giống và/hoặc bầu (quả thóc đối với cây họ cỏ). Nguồn gây bệnh trong hạt giống xâm nhập vào mô, vùng rễ của cây nêu trên, và các phần tương tự khác trong quá trình nảy mầm của hạt giống mang nguồn gây bệnh và trong quá trình sinh trưởng của cá thể cây và còn được truyền sang nguyên liệu giống khỏe mạnh xung quanh và tăng sinh, dẫn tới sự khởi phát bệnh có trong hạt giống đặc trưng cho chủng gây bệnh. Ví dụ cụ thể về bệnh có trong hạt giống bao gồm bệnh mốc hồng (do *Gibberella fujikuroi* gây ra), bệnh đạo ôn (do *Magnaporthe oryzae* gây ra), bệnh thối nhũn cây con (do nấm thuộc chi *Fusarium*, chi *Pythium*, chi *Rhizoctonia*, hoặc chi *Trichoderma* gây ra), bệnh đốm *Helminthosporium* (do *Cochliobolus miyabeanus* gây ra), bệnh bạc lá cây giống con do vi khuẩn (do *Pseudomonas plantarii* gây ra (hiện nay là *Burkholderia plantarii*)), trấu bạc màu (do *Pseudomonas glumae* gây ra (hiện nay là *Burkholderia glumae*)), và bệnh sọc nâu do vi khuẩn (do *Pseudomonas avenae* gây ra (hiện nay là *Acidovorax avenae*)).

Các thực vật hạt kín và các thực vật hạt trần đều là cây chủ của nguồn gây bệnh có trong hạt. Các thực vật hạt kín có thể là lớp hai lá mầm hoặc lớp một lá mầm. Ví dụ về lớp một lá mầm bao gồm cây thuộc họ cỏ (*Poaceae*). Ví dụ về lớp hai lá mầm bao gồm thực vật thuộc họ hoa hồng (*Rosaceae*), cây họ cà (*Solanaceae*), cây họ đậu (*Fabaceae*), cây họ bầu bí (*Cucurbitaceae*), và cây thuộc họ hoa thập (*Brassicaceae*). Được ưu tiên là cây thuộc họ cỏ. Ví dụ về thực vật thuộc họ cỏ ở đây bao gồm các loài cây đóng vai trò quan trọng trong nông nghiệp như lúa (*Oryza sativa* và *O. glaberrima*), lúa mạch (*Triticum aestivum*, *T. compactum*, và *T. durum*), lúa mỳ (*Hordeum vulgare*), lúa mạch đen (*Secale cereale*), kê (*Panicum miliaceum*), kê đuôi chồn (*Setaria italica*), kê Nhật Bản (*Echinochloa esculenta*), cao lương (*Sorghum bicolor*), ngô (*Zea mays*),

và mía đường (*Saccharum officinarum*). Được ưu tiên là lúa, lúa mạch, lúa mỳ, ngô, và mía đường, được ưu tiên hơn là lúa.

"Vi sinh vật dùng làm tác nhân kiểm soát sinh học" có cùng nghĩa với "vi sinh vật không gây bệnh tương ứng với nguồn gây bệnh trong hạt giống" ở đây. Từ "tương ứng" như được sử dụng ở đây có nghĩa chủ yếu thuộc cùng loài hoặc cùng chi, hoặc gần nhau khi phân loại, có tác dụng kiểm soát sinh học. Do đó, "vi sinh vật không gây bệnh tương ứng với nguồn gây bệnh trong hạt giống" chỉ một nhóm trong các loài vi sinh vật nhất định không có khả năng gây bệnh mặc dù cùng loài với nguồn gây bệnh trong hạt giống khi phân loại. Ví dụ, nấm không gây bệnh thuộc chi *Fusarium*, ví dụ, *F. oxysporum* và *F. fujikuroi* đều thuộc nhóm nấm không gây bệnh tương ứng với nấm gây bệnh mốc hồng. Vi sinh vật dùng làm tác nhân kiểm soát sinh học có đặc tính là không gây ra các triệu chứng của bệnh ở cây chủ trong khi đó giữ được khả năng lây nhiễm và khả năng xâm nhập cao vào cây chủ. Cây chủ được xâm nhập bởi vi sinh vật dùng làm tác nhân kiểm soát sinh học sẽ trở nên kháng các bệnh thông thường trên cây giống con bao gồm không chỉ các bệnh có trong hạt giống mà còn cả bệnh trong đất. Ví dụ cụ thể về vi sinh vật dùng làm tác nhân kiểm soát sinh học bao gồm chủng không gây bệnh W3 của *Fusarium oxysporum* (Số nộp lưu: NITE BP-01538) hoặc chủng không gây bệnh W5 của *Fusarium oxysporum* (Số nộp lưu: NITE BP-01539). Các vi sinh vật dùng làm tác nhân kiểm soát sinh học này ban đầu được lưu giữ vào ngày 13/02/2013 tại Patent Microorganisms Depositary, National Institute of Technology and Evaluation (#122, 2-5-8 Kazusakamatari, Kisarazu-shi, Chiba 292-0818, Japan) ở Nhật Bản.

"Cây có đặc tính kháng các bệnh trên cây giống con" chỉ cây được xâm nhập bởi vi sinh vật dùng làm tác nhân kiểm soát sinh học, thể hiện đặc tính kháng các bệnh thông thường trên cây giống con bao gồm bệnh có trong hạt giống và bệnh trong đất và không thể hiện các triệu chứng rõ ràng của các bệnh này

1-2. Phương pháp phân lập vi sinh vật dùng làm tác nhân kiểm soát sinh học

Phương pháp phân lập vi sinh vật dùng làm tác nhân kiểm soát sinh học được sử dụng trong sáng chế được mô tả ở đây sẽ được mô tả. Như được mô tả ở trên, vi sinh

vật dùng làm tác nhân kiểm soát sinh học có thể được phân lập tương đối dễ từ các bộ phận của cây do vi sinh vật có mặt rộng rãi trong tự nhiên. Ví dụ, xem phương pháp như được mô tả trong tài liệu: Tateishi H. & Chida T. 2000, J. Gen. Plant Pathol., 66: 353-359.

(1) Nguồn phân lập

Nguồn phân lập vi sinh vật dùng làm tác nhân kiểm soát sinh học có thể là mô của cây (lá, trụ dưới lá mầm, bẹ lá, cuống lá, thân cây, cơ quan hoa, quả, rễ, hoặc các bộ phận khác) của nguyên liệu giống cùng loài khỏe mạnh sinh trưởng xung quanh nguyên liệu giống cây mắc bệnh có trong hạt giống trên cánh đồng xuất hiện bệnh này hoặc đất chứa vùng rễ của nó. Khi mô của cây nêu trên được sử dụng làm nguồn phân lập thì tốt hơn nếu bề mặt mô được tẩy trùng. Việc tẩy trùng này có thể được thực hiện, ví dụ, bằng cách ngâm miếng mô cây thu được có kích thước khoảng 1 cm² trong etanol 70% trong 30 giây và sau đó, trong axit hypoclorơ 1% trong 3 phút để tẩy trùng bề mặt mô, sau đó rửa bằng nước vô trùng. Tuy nhiên, nồng độ của etanol hoặc axit hypoclorơ và thời gian ngâm không bị giới hạn cụ thể và có thể được điều chỉnh phù hợp dựa trên kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, phụ thuộc vào vị trí của mô cây nêu trên và các yếu tố khác.

(2) Phương pháp phân lập

Khi vi sinh vật dùng làm tác nhân kiểm soát sinh học là nấm thực, mô cây đã tẩy trùng bề mặt được cắt và chia nhỏ thành các miếng mô có kích thước khoảng 1 cm² sử dụng nhíp đã khử trùng, dao phẫu thuật, hoặc các dụng cụ khác và đặt lên môi trường nuôi cấy. PSA (môi trường thạch súp khoai tây: 200 g/L súp khoai tây nấu, 0,5% [trọng lượng/thể tích] sucroza, 1,5% [trọng lượng/thể tích] thạch) hoặc WA (môi trường thạch tron: 1% thạch) có thể được sử dụng làm môi trường nuôi cấy. Ngoài ra, khi vi sinh vật dùng làm tác nhân kiểm soát sinh học được phân lập có tên chi rõ ràng thì có thể sử dụng môi trường chọn lọc tương hợp với chi vi sinh vật này. Để ngăn việc nhiễm khuẩn, tốt hơn là trước hết bôi axit lactic 20% lên môi trường này. Môi trường nuôi cấy mà mô cây nêu trên được đặt vào được nuôi cấy ở nhiệt độ từ 25 đến 30°C trong 2 đến 5 ngày. Các khuẩn lạc đơn (đối với vi sinh vật nhân chuẩn đơn tế bào), các chồi nhánh

của nấm (đối với nấm sợi hoặc nấm đảm), bào tử, hoặc bào tử đính sinh trưởng trên đĩa chứa môi trường nuôi cấy được chuyển lại vào đĩa chứa môi trường nuôi cấy mới để thiết lập chủng khuẩn lạc đơn.

Tương tự, khi vi sinh vật dùng làm tác nhân kiểm soát sinh học là vi khuẩn thì mô cây đã tẩy trùng bề mặt được cắt và chia nhỏ thành các miếng mô có kích thước khoảng 1 cm² sử dụng nhíp đã khử trùng, dao phẫu thuật, hoặc các dụng cụ khác và đặt lên môi trường nuôi cấy. Môi trường PSA hoặc King B (2% [trọng lượng/thể tích] pepton, 1% [trọng lượng/thể tích] glycerin, 0,15% [trọng lượng/thể tích] dikali hydro phosphat, 0,15% [trọng lượng/thể tích] magie sulfat heptahydrat, 1,5% [trọng lượng/thể tích] thạch) có thể được sử dụng làm môi trường nuôi cấy, và khi vi sinh vật dùng làm tác nhân kiểm soát sinh học được phân lập có tên chi rõ ràng thì có thể sử dụng môi trường chọn lọc tương hợp với chi vi sinh vật này. Môi trường nuôi cấy trên đó có đặt mô cây nêu trên được nuôi cấy ở nhiệt độ từ 25 đến 30°C trong 1 đến 3 ngày. Khuẩn lạc đơn đã tạo ra được lấy ra và chuyển lại vào đĩa chứa môi trường nuôi cấy mới để tạo ra khuẩn lạc sinh trưởng lại dưới dạng một chủng duy nhất.

(3) Phân lập các vi sinh vật không gây bệnh

Bất kể nguồn gây bệnh trong hạt giống phân lập được có phải là vi sinh vật không gây bệnh hay không, nghĩa là, vi sinh vật dùng làm tác nhân kiểm soát sinh học được sử dụng trong sáng chế, có thể được xác định bằng cách gây nhiễm cây giống con của cây chủ bằng vi sinh vật đã được tạo ra dưới dạng một chủng ở phần (2) ở trên và khẳng định việc không có mặt các triệu chứng bệnh đặc trưng ở cây giống con, để phân lập.

1-3. Các thành phần

Phương pháp tạo ra hạt giống của cây có đặc tính kháng các bệnh trên cây giống con theo sáng chế bao gồm bước tiếp xúc và bước thu gom. Từng bước này sẽ được mô tả cụ thể dưới đây.

(1) Bước tiếp xúc

"Bước tiếp xúc" là bước cho vi sinh vật dùng làm tác nhân kiểm soát sinh học tiếp xúc với phần hoa của cây chủ xung quanh thời điểm ra hoa.

Ở bước này, vi sinh vật dùng làm tác nhân kiểm soát sinh học bất kỳ được cho xâm nhập vào cây chủ trước khi nguồn gây bệnh trong hạt giống nhiễm vào phần hoa của cây chủ và xâm nhập vào trong hạt của nó.

Như được sử dụng ở đây, "thời điểm ra hoa" là giai đoạn trong đó cây chủ nở hoa. "Xung quanh thời điểm ra hoa" chỉ giai đoạn bao gồm trước khi bắt đầu việc nở hoa của cây chủ và sau khi kết thúc việc nở hoa. Giai đoạn này là giai đoạn bao gồm thời điểm ra hoa cũng như 2 tuần trước và sau, tốt hơn là 10 ngày trước và sau, tốt hơn là 1 tuần hoặc 5 ngày trước và sau thời điểm ra hoa. Ví dụ, khi cây chủ là lúa và giai đoạn này là giai đoạn bao gồm thời điểm ra hoa cũng như 2 tuần trước và sau thời điểm ra hoa, giai đoạn này bao gồm giai đoạn từ giai đoạn phát triển bông trong đó bông lúa sinh trưởng nhanh chóng cho đến khi kết thúc thời điểm ra hoa của nguyên liệu giống của nó và các hạt lúa chín.

Như được mô tả ở trên, thời điểm khi vi sinh vật dùng làm tác nhân kiểm soát sinh học được cho tiếp xúc với phần hoa của cây chủ diễn ra trước khi cây chủ bị nhiễm nguồn gây bệnh trong hạt giống xuất hiện hoặc có thể xuất hiện trong diện tích cụ thể. Điều này do nếu cây chủ bị nhiễm nguồn gây bệnh trong hạt giống trước khi được gây nhiễm bằng vi sinh vật dùng làm tác nhân kiểm soát sinh học thì có thể không thu được hiệu quả của sáng chế do hoạt động loại bỏ sự nhiễm các vi sinh vật khác bởi nguồn gây bệnh trong hạt giống (tác động cạnh tranh) loại trừ sự nhiễm vi sinh vật dùng làm tác nhân kiểm soát sinh học ở cây chủ.

Loại vi sinh vật dùng làm tác nhân kiểm soát sinh học được cho tiếp xúc không bị giới hạn cụ thể. Thông thường, việc gây nhiễm cây chủ đã nhiễm bằng vi sinh vật dùng làm tác nhân kiểm soát sinh học bất kỳ khiến cho các nguồn gây bệnh trong hạt giống khác khó nhiễm vào cây chủ do hoạt động xâm chiếm và cạnh tranh của vi sinh vật được dùng làm tác nhân kiểm soát sinh học và/hoặc do đặc tính kháng bệnh đã được tạo ra trong cây chủ khi nhiễm vi sinh vật dùng làm tác nhân kiểm soát sinh học. Sáng chế sử dụng nguyên tắc này, và việc tiếp xúc của vi sinh vật dùng làm tác nhân kiểm soát sinh học với cây chủ có thể kiểm soát sự lây nhiễm các nguồn gây bệnh trên cây giống con sau đó bao gồm nguồn gây bệnh trong hạt giống bất kể loài vi sinh vật

của chúng. Do đó, hạt giống của cây chủ thu được bằng phương pháp tạo ra theo sáng chế có thể kháng các bệnh trên cây giống con. Thông thường, vi sinh vật không gây bệnh có thể được sử dụng, vi sinh vật này tương ứng với nguồn gây bệnh trong hạt giống xuất hiện hoặc có thể xuất hiện trên diện tích gieo hạt của cây có đặc tính kháng các bệnh trên cây giống con. Ví dụ, trên cánh đồng xuất hiện bệnh mốc hồng trên hạt lúa, nấm không gây bệnh thuộc chi *Fusarium* tương ứng với nấm gây bệnh mốc hồng trên hạt lúa có thể được sử dụng làm vi sinh vật dùng làm tác nhân kiểm soát sinh học. Ví dụ, *Fusarium oxysporum* chủng W3 (Số nộp lưu: NITE BP-01538) hoặc *Fusarium oxysporum* chủng W5 (Số nộp lưu: NITE BP-01539) có thể được sử dụng, là các nấm không gây bệnh thuộc chi *Fusarium*. Tất nhiên, từ lý do nêu trên, cũng có thể thu được tác dụng tương đương ngay cả khi sử dụng vi sinh vật dùng làm tác nhân kiểm soát sinh học thu được từ nấm không gây bệnh tương ứng với nấm gây bệnh có trong hạt giống khác. Tuy nhiên, tốt hơn nếu vi sinh vật dùng làm tác nhân kiểm soát sinh học được cho tiếp xúc không phải là hỗn hợp của nhiều chủng khác nhau mà là một chủng duy nhất.

Số lần tiếp xúc với vi sinh vật dùng làm tác nhân kiểm soát sinh học của cây chủ không bị giới hạn. Đối với các loài trong đó các hoa nhỏ nằm nối tiếp nhau trong hoa thể kim, như cây họ cỏ, bước này có thể được tiến hành vài lần để làm cho tất cả các phần của hoa nhiễm nặng vi sinh vật dùng làm tác nhân kiểm soát sinh học. Tuy nhiên, vi sinh vật dùng làm tác nhân kiểm soát sinh học được cho tiếp xúc mỗi lần tốt hơn là cùng chủng vì lý do nêu trên.

Phương pháp cho vi sinh vật dùng làm tác nhân kiểm soát sinh học tiếp xúc với cây chủ không bị giới hạn cụ thể miễn là nó cho phép diễn ra việc tiếp xúc với vi sinh vật dùng làm tác nhân kiểm soát sinh học. Ví dụ về các phương pháp này bao gồm các phương pháp, như phun, phân tán, phủ, hoặc ngâm dung dịch nuôi cấy, huyền phù, chế phẩm dạng bột, và các dạng khác chứa vi sinh vật dùng làm tác nhân kiểm soát sinh học sẽ được mô tả dưới đây. Vị trí tiếp xúc của cây chủ có thể là một bộ phận hoặc toàn bộ cây chủ; tuy nhiên, đối với trường hợp một bộ phận của cây được cho tiếp xúc,

cần lưu ý rằng vị trí gắn với đường lây nhiễm của vi sinh vật dùng làm tác nhân kiểm soát sinh học trong cây chủ, nghĩa là, phần hoa, được cho tiếp xúc.

(2) Bước thu gom

"Bước thu gom" là bước thu gom (các) hạt giống của cây chủ được xâm nhập bởi vi sinh vật dùng làm tác nhân kiểm soát sinh học thu được từ bước tiếp xúc nêu trên. Vi sinh vật dùng làm tác nhân kiểm soát sinh học được cho tiếp xúc với phần hoa của cây chủ ở bước tiếp xúc thường xâm nhập vào trong mào, vỏ hạt, hoặc mô noãn. Cây chủ phát triển (các) hạt được xâm nhập bởi chủng đột biến không gây bệnh sau khi thụ phấn. Do đó, ở bước này, (các) hạt có độ chín đủ để có khả năng nảy mầm có thể được thu gom bằng phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Về nguyên tắc, hạt thu được từ cây chủ sau bước tiếp xúc về cơ bản có thể được coi là hạt giống của cây có đặc tính kháng các bệnh trên cây giống con.

Sau bước thu gom, nếu cần, các hạt giống này được làm khô để tăng tính ổn định khi bảo quản. Phương pháp làm khô có thể là phương pháp bất kỳ với điều kiện nó là phương pháp làm giảm hợp lý lượng nước trong các hạt đồng thời duy trì được khả năng nảy mầm của hạt mà không làm chết vi sinh vật dùng làm tác nhân kiểm soát sinh học đã xâm nhập vào hạt. Ví dụ về các phương pháp này bao gồm phương pháp làm khô tự nhiên bao gồm việc cho tiếp xúc với không khí, phương pháp làm khô bằng cách hút ẩm bao gồm việc đặt hạt trong các thùng chứa kín cùng với chất hút ẩm, phương pháp làm khô bằng không khí bao gồm làm khô bằng cách thổi không khí ấm hoặc luồng hơi lạnh sử dụng máy thổi hoặc thiết bị tương tự, và kết hợp các phương pháp này. Phương pháp bảo quản hạt sau đó có thể là phương pháp đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Nếu cần, cũng có thể xác nhận việc các hạt sau bước thu gom có phải là các hạt mang vi sinh vật được xâm nhập bởi vi sinh vật dùng làm tác nhân kiểm soát sinh học hay chưa. Điều này có thể được khẳng định dễ dàng bằng cách thu lấy axit nucleic từ một phần hoặc tất cả các hạt thử nghiệm mang vi sinh vật đó và sau đó, sử dụng kỹ thuật dựa trên phương pháp khuếch đại axit nucleic như PCR sử dụng các trình tự nucleotit đặc hiệu với gen của vi sinh vật dùng làm tác nhân kiểm soát sinh học đã cho

tiếp xúc, được thiết kế dưới dạng các đoạn môi. Ví dụ, khi vi sinh vật dùng làm tác nhân kiểm soát sinh học là *Fusarium oxysporum*, thì vùng IGS của ADN ribosom có thể là trình tự nucleotit đặc hiệu, cho phép xác định sự có mặt của vi sinh vật dùng làm tác nhân kiểm soát sinh học. Do đó, vùng nêu trên có thể được sử dụng làm bộ môi để khuếch đại. Các ví dụ cụ thể về các vùng này bao gồm FIGS11 (5'-GTAAGCCGTCCTTCGCCTCG-3': SEQ ID NO: 1) và FIGS12 (5'-GCAAAATTCAATAGTATGGC-3': SEQ ID NO: 2). Việc sử dụng bộ môi nêu trên khuếch đại mảnh ADN có trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 3 cho *Fusarium oxysporum* chủng W3 (Số nộp lưu: NITE BP-01538) và mảnh ADN có trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 4 cho *Fusarium oxysporum* chủng W5 (Số nộp lưu: NITE BP-01539). Do đó, có thể khẳng định và xác định chủng vi sinh vật dùng làm tác nhân kiểm soát sinh học thu được từ *Fusarium oxysporum* đã xâm nhập.

Cá thể cây giống con của cây có đặc tính kháng các bệnh trên cây giống con thu được có thể sinh trưởng dưới dạng nguyên liệu giống kháng các bệnh trên cây giống con mà không thể hiện các triệu chứng bệnh nhờ hoạt động cạnh tranh của vi sinh vật dùng làm tác nhân kiểm soát sinh học do hạt mang vi sinh vật dùng làm tác nhân kiểm soát sinh học.

1-4. Hiệu quả

Phương pháp tạo ra hạt giống của cây có đặc tính kháng các bệnh trên cây giống con theo sáng chế cho phép tạo ra và cung cấp một cách đơn giản hạt giống của cây có đặc tính kháng bệnh bất kỳ trên cây giống con giống như cá thể cây giống con này là giống kháng các bệnh trên cây giống con.

Do phương pháp tạo ra hạt giống của cây có đặc tính kháng các bệnh trên cây giống con theo sáng chế cần được thực hiện cho ít nhất là cây chỉ để thu gom hạt nên phương pháp này cho phép giới hạn diện tích áp dụng vi sinh vật dùng làm tác nhân kiểm soát sinh học ở diện tích tối thiểu và do đó, ít ảnh hưởng đến môi trường và cũng có hiệu quả tuyệt vời về mặt kinh tế.

Hạt giống của cây có đặc tính kháng các bệnh trên cây giống con theo sáng chế loại bỏ được nhu cầu áp dụng việc xử lý để kiểm soát hoặc ức chế sự khởi phát của

bệnh có trong hạt giống cho hạt giống trước khi gieo hạt và cho phép canh tác cây chủ không khởi phát của các bệnh trên cây giống con chỉ bằng cách gieo hạt bình thường, và do đó, cho phép giảm nhân lực và chi phí. Hạt giống này cũng loại bỏ được nhu cầu hoặc cho phép làm giảm, việc tẩy trùng hạt bằng hóa chất diệt loài gây hại.

Phương pháp tạo ra hạt giống của cây có đặc tính kháng các bệnh trên cây giống con theo sáng chế có độ an toàn cao và ít ảnh hưởng đến môi trường so với phương pháp sử dụng hóa chất diệt loài gây hại do nó sử dụng chất diệt loài gây hại dựa trên vi sinh vật sử dụng vi sinh vật không gây bệnh có trong tự nhiên.

2. Phương pháp ngăn ngừa sự khởi phát và kiểm soát bệnh trên cây giống con

Khía cạnh thứ hai của sáng chế đề cập đến phương pháp ngăn ngừa sự khởi phát và kiểm soát các bệnh trên cây giống con. Sáng chế có thể ngăn ngừa sự khởi phát và kiểm soát các bệnh trên cây giống con ở cá thể cây giống con kháng các bệnh trên cây giống con và các cá thể cây khác xung quanh cá thể cây giống con nêu trên.

2-1. Các thành phần

Phương pháp ngăn ngừa sự khởi phát và kiểm soát các bệnh trên cây giống con theo sáng chế (dưới đây, thường được gọi là "phương pháp ngăn ngừa và kiểm soát") sử dụng hạt giống của cây có đặc tính kháng các bệnh trên cây giống con được mô tả trong khía cạnh thứ nhất, đã được xâm nhập bởi vi sinh vật dùng làm tác nhân kiểm soát sinh học. Bước xử lý chính của phương pháp ngăn ngừa và kiểm soát theo sáng chế chỉ là tiến hành phương pháp canh tác thông thường đối với loài cây có đặc tính kháng các bệnh trên cây giống con. Tuy nhiên, không cần tiến hành việc tẩy trùng hạt trước đó.

Lấy lúa làm ví dụ, thóc giống kháng các bệnh trên cây giống con được tạo ra để nảy mầm và gieo trong thùng chứa chứa đất trồng (hộp trồng cây giống con hoặc dụng cụ tương tự) cho cây giống sinh trưởng. Sau đó, cấy các cây giống này ra đồng, sau đó canh tác sử dụng phương pháp thông thường.

Hạt giống của cây có đặc tính kháng các bệnh trên cây giống con được mô tả trong khía cạnh thứ nhất đã được xâm nhập bởi vi sinh vật dùng làm tác nhân kiểm soát sinh học. Tuy nhiên, vi sinh vật dùng làm tác nhân kiểm soát sinh học là vi sinh vật

không gây bệnh và do đó, nó không làm khởi phát các bệnh trên cây giống con. Do đó, cây giống này cho phép ngăn ngừa và kiểm soát một cách hiệu quả việc nhiễm các nguồn gây bệnh trên cây giống con bao gồm bệnh có trong hạt giống và bệnh trong đất.

Ngoài ra, vi sinh vật dùng làm tác nhân kiểm soát sinh học xâm nhập vào hạt giống của cây có đặc tính kháng các bệnh trên cây giống con giữ lại được tính lây nhiễm mặc dù nó không gây bệnh, và do đó, khi hạt giống của cây có đặc tính kháng các bệnh trên cây giống con được canh tác cùng với các hạt không nhiễm các nguồn gây bệnh trong hạt giống thì nó có thể được truyền sang cây giống con khỏe mạnh xung quanh trong giai đoạn từ ngâm hạt đến phát triển thành cây giống. Tuy nhiên, điều này dẫn đến việc xâm chiếm của vi sinh vật dùng làm tác nhân kiểm soát sinh học và đặc tính kháng nguồn gây bệnh được tạo ra trong chính cây bị nhiễm, và cho phép ngăn ngừa và kiểm soát một cách hiệu quả việc nhiễm nguồn gây bệnh trên cây giống con sau đó bao gồm bệnh có trong hạt giống và bệnh trong đất.

2-2. Hiệu quả

Phương pháp ngăn ngừa và kiểm soát theo sáng chế cho phép ngăn ngừa và kiểm soát một cách hiệu quả các bệnh trên cây giống con bao gồm bệnh có trong hạt giống và bệnh trong đất mà không cần xử lý đặc biệt.

Phương pháp ngăn ngừa và kiểm soát theo sáng chế cho phép giảm nhân công và chi phí, do nó làm cho việc tẩy trùng hạt thường được tiến hành trước khi gieo trở nên không cần thiết.

Phương pháp ngăn ngừa và kiểm soát theo sáng chế cho phép ngăn ngừa và kiểm soát một cách hiệu quả việc lây nhiễm nguồn gây bệnh trên cây giống con bao gồm bệnh có trong hạt giống và bệnh trong đất không chỉ ở cá thể cây giống con của cây có đặc tính kháng các bệnh trên cây giống con được mô tả trong khía cạnh đầu tiên mà còn ở các cá thể cây khỏe mạnh được canh tác cùng với các cá thể cây kháng bệnh này.

3. Chất diệt loài gây hại dựa trên vi sinh vật dùng để kiểm soát bệnh trên cây giống con

Khía cạnh thứ ba của sáng chế đề cập đến chất diệt loài gây hại dựa trên vi sinh vật dùng để kiểm soát các bệnh trên cây giống con. Chất diệt loài gây hại dựa trên vi

sinh vật dùng để kiểm soát các bệnh trên cây giống con theo sáng chế có thể được sử dụng cho cây mong muốn để tạo ra đặc tính kháng các bệnh trên cây giống con cho cây nêu trên.

3-1. Các thành phần

Chất diệt loài gây hại dựa trên vi sinh vật dùng để kiểm soát các bệnh trên cây giống con theo sáng chế chứa vi sinh vật dùng làm tác nhân kiểm soát sinh học làm thành phần hoạt tính.

Vi sinh vật dùng làm tác nhân kiểm soát sinh học có thể là vi sinh vật dùng làm tác nhân kiểm soát sinh học được mô tả trong khía cạnh đầu tiên. Ví dụ cụ thể về vi sinh vật dùng làm tác nhân kiểm soát sinh học bao gồm nấm không gây bệnh, *Fusarium oxysporum* chủng W3 (Số nộp lưu: NITE BP-01538) hoặc *Fusarium oxysporum* chủng W5 (Số nộp lưu: NITE BP-01539), là loài có mối quan hệ gần với *Fusarium fujikuroi* gây khởi phát bệnh mốc hồng. Để thu được hiệu quả của sáng chế, cần thiết phải duy trì khả năng xâm nhập vào cây chủ của vi sinh vật dùng làm tác nhân kiểm soát sinh học. Do đó, vi sinh vật dùng làm tác nhân kiểm soát sinh học trong chất diệt loài gây hại dựa trên vi sinh vật theo sáng chế phải được giữ ở trạng thái sống.

Lượng vi sinh vật dùng làm tác nhân kiểm soát sinh học trong mỗi liều chất diệt loài gây hại dựa trên vi sinh vật dùng để kiểm soát các bệnh trên cây giống con theo sáng chế phụ thuộc vào các điều kiện như loại vi sinh vật được dùng, loại cây đích cần dùng, dạng liều và phương pháp dùng (tiếp xúc). Thông thường, tốt hơn nếu vi sinh vật dùng làm tác nhân kiểm soát sinh học làm thành phần hoạt tính có mặt với lượng đủ để tiếp xúc và xâm nhập vào thực vật đích cần dùng, khi chất diệt loài gây hại dựa trên vi sinh vật theo sáng chế được sử dụng. Lượng vi sinh vật dùng làm tác nhân kiểm soát sinh học có thể được xác định, dựa trên việc đánh giá các điều kiện sao cho lượng vi sinh vật dùng làm tác nhân kiểm soát sinh học có mặt trong chất diệt loài gây hại dựa trên vi sinh vật theo sáng chế là lượng mong muốn cho cây đích cần dùng sau khi sử dụng dựa trên kiến thức kỹ thuật chung trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, khi vi sinh vật dùng làm tác nhân kiểm soát sinh học thu được từ chi *Fusarium* và chất diệt loài gây hại dựa trên vi sinh vật theo sáng chế ở trạng thái lỏng thì bào tử của nó có thể có

mặt với lượng $1,0 \times 10^4$ /mL hoặc lớn hơn, tốt hơn là $5,0 \times 10^4$ /mL hoặc lớn hơn trong dung dịch. Giới hạn trên không bị giới hạn cụ thể; tuy nhiên, $1,0 \times 10^9$ /mL hoặc tương tự sẽ thường là đủ ngay cả đối với vi sinh vật dùng làm tác nhân kiểm soát sinh học có tốc độ lây nhiễm thấp.

Chất diệt loài gây hại dựa trên vi sinh vật theo sáng chế có thể chứa chất mang có thể chấp nhận được trong chế phẩm diệt loài gây hại với lượng nằm trong khoảng không gây kích hãm hoặc ức chế hoạt tính lây nhiễm trên cây chủ của vi sinh vật dùng làm tác nhân kiểm soát sinh học.

"Chất mang có thể chấp nhận được trong chế phẩm diệt loài gây hại" chỉ hợp chất hỗ trợ việc dùng chất diệt loài gây hại dựa trên vi sinh vật, duy trì khả năng sống và lây nhiễm của vi sinh vật dùng làm tác nhân kiểm soát sinh học là thành phần hoạt tính và/hoặc kiểm soát tốc độ hoạt động của chất diệt loài gây hại dựa trên vi sinh vật, trong đó hợp chất này không có hoặc ít gây độc đến môi trường như chất lượng đất và nước hoặc không có ảnh hưởng gây hại hoặc có ảnh hưởng thấp đến các động vật, cụ thể là người khi được dùng để canh tác cây ngoài trời và trong nhà. Các ví dụ về các chất mang này bao gồm chất phụ gia. Các ví dụ được ưu tiên về chất phụ gia này bao gồm các khoáng chất tự nhiên được tán thành bột, các khoáng chất tổng hợp được tán thành bột, các chất nhũ hóa, các chất phân tán, chất hoạt động bề mặt và các chất tương tự.

Ví dụ về các khoáng chất tự nhiên được tán thành bột bao gồm, ví dụ, kaolin, đất sét, talc, và phấn.

Ví dụ về các khoáng chất tổng hợp được tán thành bột bao gồm, ví dụ, silic dioxid có khả năng phân tán cao và silicat. Ví dụ về các chất nhũ hóa bao gồm các chất nhũ hóa không ion và các chất nhũ hóa anion (ví dụ, ete của rượu béo và polyoxyetylen, các alkyl sulfonat, và các aryl sulfonat).

Ví dụ về các chất phân tán bao gồm, ví dụ, các dịch thải lignin-sulfit và metylxenluloza.

Ví dụ về các chất hoạt động bề mặt bao gồm axit lignosulfonic, axit naphthalensulfonic, axit phenolsulfonic, kim loại kiềm, kim loại kiềm thổ, và các muối

amoni của axit dibutylnaphtalensulfonic, các alkylarylsulfonat, các alkylsulfat, các alkylsulfonat, các muối sulfat của rượu béo, axit béo và ete của glycol và rượu béo được sulfat hóa, sản phẩm ngưng tụ của naphtalen được sulfonat hóa và các dẫn xuất của naphtalen với formaldehyt, sản phẩm ngưng tụ của naphtalen hoặc axit naphthalensulfonic với phenol và formaldehyt, polyoxyetylen octylphenylete, isooctyl phenol được etoxy hóa, octyl phenol, nonyl phenol, alkylphenyl polyglycol ete, tributylphenyl polyglycol ete, tristearylphenyl polyglycol ete, các rượu alkylaryl polyete, sản phẩm ngưng tụ của rượu và rượu béo/etylen oxit, dầu thầu dầu được etoxy hóa, polyoxyetylen alkyl ete, các polyoxypropylen được etoxy hóa, axetal ete của polyglycol rượu lauryl, sorbitol este, dịch thải lignin-sulfit, và metylxenluloza.

Chất diệt loài gây hại dựa trên vi sinh vật theo sáng chế có thể chứa một hoặc nhiều chất mang có thể chấp nhận được trong chế phẩm diệt loài gây hại được mô tả ở trên. Nó còn có thể chứa các thành phần hoạt tính có tác động được lý khác, nghĩa là, chất diệt cỏ, chất diệt nấm, chất diệt côn trùng, và phân bón (ví dụ, ure, amoni nitrat, hoặc superphosphat) với lượng không ảnh hưởng đến sự lây nhiễm của vi sinh vật dùng làm tác nhân kiểm soát sinh học.

Dạng liệu của chất diệt loài gây hại dựa trên vi sinh vật theo sáng chế có thể có trạng thái bất kỳ với điều kiện khả năng xâm nhập của vi sinh vật dùng làm tác nhân kiểm soát sinh học vào trong cây chủ có thể được duy trì ở trạng thái này, và ví dụ, nó có thể có trạng thái lỏng trong đó vi sinh vật dùng làm tác nhân kiểm soát sinh học được tạo huyền phù trong dung dịch thích hợp, trạng thái rắn (bao gồm trạng thái bột), hoặc hỗn hợp của chúng. Trạng thái lỏng chỉ cần là trạng thái trong đó vi sinh vật dùng làm tác nhân kiểm soát sinh học là thành phần hoạt tính được tạo huyền phù trong dung dịch thích hợp. Ví dụ về dung dịch thích hợp bao gồm nước, đệm, và môi trường nuôi cấy cho vi sinh vật dùng làm tác nhân kiểm soát sinh học. Trạng thái rắn không bị giới hạn cụ thể miễn là vi sinh vật dùng làm tác nhân kiểm soát sinh học là thành phần hoạt tính có thể tác động đến cây chủ ở trạng thái này. Các ví dụ của chúng bao gồm trạng thái hạt, trạng thái bột, trạng thái bán rắn như gel. Do thực tế là vi sinh vật bám vào cây

chủ bằng cách tiếp xúc hoặc cách tương tự, tăng sinh, và tác động, tốt hơn nếu trạng thái này là trạng thái bột (cụ thể, trạng thái bột có khả năng dính) hoặc trạng thái gel.

3-2. Hiệu quả

Chất diệt loài gây hại dựa trên vi sinh vật dùng để kiểm soát các bệnh trên cây giống con theo sáng chế có thể tạo ra sản phẩm không đắt và hiệu quả để sản sinh ra cây có đặc tính kháng các bệnh trên cây giống con hoặc ngăn ngừa sự nhiễm bệnh của cây chủ một cách đơn giản.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ về sáng chế sẽ được mô tả dưới đây có tham khảo các ví dụ cụ thể. Tuy nhiên, sáng chế không bị giới hạn ở các phương án của các ví dụ.

<Ví dụ 1>

Hiệu quả kiểm soát bệnh trên cây giống con ở cây có đặc tính kháng các bệnh trên cây giống con (1)

(Mục đích)

Các chất diệt loài gây hại dựa trên vi sinh vật dùng để kiểm soát các bệnh trên cây giống con theo sáng chế được tạo ra; các hạt giống được tạo ra bằng phương pháp tạo ra hạt giống của cây có đặc tính kháng các bệnh trên cây giống con sử dụng các chất diệt loài gây hại dựa trên vi sinh vật; và đã xác nhận được trên quy mô chậu trồng rằng các cá thể cây giống con này có đặc tính kháng các bệnh trên cây giống con.

(Nguyên liệu và Phương pháp)

Nấm không gây bệnh, *Fusarium oxysporum* chủng W3 (Số nộp lưu: NITE BP-01538) và W5 (Số nộp lưu: NITE BP-01539) được sử dụng làm vi sinh vật dùng làm tác nhân kiểm soát sinh học.

Mỗi vi sinh vật dùng làm tác nhân kiểm soát sinh học được nuôi cấy lắc ở 28°C trong 5 ngày trong môi trường PSB (súp khoai tây) (200 g/L súp khoai tây, 0,5% [trọng lượng/thể tích] sacaroza). Bào tử dính trong dung dịch nuôi cấy được thu gom bằng cách ly tâm (1.500 × g, 20 phút); và hỗn dịch chứa bào tử được pha loãng đến $1,0 \times 10^5$

đến $1,0 \times 10^7$ /mL bằng nước vô trùng được sử dụng làm chất diệt loài gây hại dựa trên vi sinh vật dùng để kiểm soát các bệnh trên cây giống con.

Cây chủ được sử dụng là lúa (giống: Tangin-bozu). Sau khi đặt 80 g đất trồng vô trùng làm đất trồng trong chậu nhựa 200-mL, sau đó tưới nước, 2 hạt thóc giống được gieo để làm các hạt thóc giống bố mẹ, phủ 20 g đất canh tác vô trùng, và lại tưới nước. Sau khi gieo hạt, tiến hành trồng trong phòng khí tượng nhân tạo được đặt ở 26°C trong các điều kiện của ánh sáng tự nhiên trong 100 ngày.

Phương pháp cho từng chất diệt loài gây hại dựa trên vi sinh vật tiếp xúc với lúa bố mẹ liên quan, 1 tuần sau khi lúa bố mẹ trở bông lần thứ nhất, phun trực tiếp chất diệt loài gây hại dựa trên vi sinh vật lên phần bông sử dụng bình xịt tay ở một thời điểm nhất định trong buổi sáng (khoảng 10 đến 11 giờ) khi lúa trở bông (bước tiếp xúc). Lượng được phun là khoảng 5 mL/bông. Lúa bố mẹ đã được xử lý bằng cách phun được canh tác trong phòng khí tượng nhân tạo được đặt ở 26°C trong điều kiện ánh sáng tự nhiên cho đến khi lúa chín. Vào khoảng thời gian khi phần trên mặt đất của lúa bố mẹ ngả vàng, lúa bố mẹ được đập để thu gom các hạt thóc (bước thu gom). Các hạt thóc được thu gom khi xử lý sau đây được gọi là "hạt thóc được xử lý bằng W3" và "hạt thóc được xử lý bằng W5" (tương ứng với hạt giống của cây có đặc tính kháng các bệnh trên cây giống con theo sáng chế). Mặt khác, các hạt thóc đối chứng được thu gom bằng hoạt động tương tự ngoại trừ việc phun nước vô trùng thay cho chất diệt loài gây hại dựa trên vi sinh vật sau đây gọi là "các hạt thóc không xử lý". Từng hạt thóc được xử lý và hạt thóc không xử lý được làm khô trước khi xử lý nảy mầm.

Các hạt thóc tương ứng được ngâm trong hỗn dịch chứa bào tử của *Fusarium fujikuroi* gây bệnh là nấm gây ra bệnh mốc hồng ($1,0 \times 10^3$ /mL, phương pháp pha chế giống như đối với hỗn dịch chứa bào tử của vi sinh vật dùng làm tác nhân kiểm soát sinh học) ở tỷ lệ bẻ 1:1 để xử lý ngâm ở 15°C trong 4 ngày. Sau đó, việc xử lý nảy mầm cưỡng bức được tiến hành ở 30°C trong 1 ngày. Sau khi đặt 80 g đất trồng vô trùng làm đất trồng trong chậu nhựa 200 ml, sau đó tưới nước, các hạt thóc đã xử lý và hạt thóc không xử lý tương ứng được gieo vào chậu, phủ bằng 20 g đất trồng vô trùng, và lại tưới nước. Lượng hạt thóc trên mỗi chậu vào khoảng 2 g (khoảng 70 hạt) tính

theo trọng lượng khô trước khi xử lý ngâm. Các chậu trong đó các hạt thóc được xử lý bằng W3, các hạt thóc được xử lý bằng W5, và các hạt thóc không được xử lý được gieo được gọi là khu vực xử lý W3, khu vực xử lý W5, và khu vực không xử lý, tương ứng. Sau khi gieo, tiến hành trồng trong phòng khí tượng nhân tạo được đặt ở 28°C trong điều kiện ánh sáng tự nhiên trong 14 ngày, và hiệu quả của sáng chế được đánh giá bằng cách so sánh mức độ sinh trưởng của các cây lúa trong các chậu.

Khi đánh giá triệu chứng bệnh, nguyên liệu giống trong đó hiện tượng phát triển mạnh khỏe của chiều dài cây và hiện tượng ngả vàng được quan sát thấy, được xác định là cây giống bị bệnh mốc hồng trên hạt thóc, và tỷ lệ nhiễm bệnh mốc hồng trên hạt của cây giống và hiệu quả kiểm soát được tính toán sử dụng các phương trình sau đây.

Tỷ lệ nhiễm bệnh của cây giống con (%) = Số cây giống con bị bệnh / Tổng số cây giống con $\times 100$

Hiệu quả kiểm soát = (Tỷ lệ nhiễm bệnh của cây giống con khi không xử lý – Tỷ lệ nhiễm bệnh của cây giống khi xử lý) / Tỷ lệ nhiễm bệnh của cây giống con khi không xử lý $\times 100$

Không khác biệt đáng kể về tỷ lệ nảy mầm giữa các khu vực được xử lý, trong đó các tỷ lệ nêu trên vào khoảng 90% hoặc lớn hơn.

(Các kết quả)

Các kết quả được thể hiện trong Bảng 1.

Xử lý	Tỷ lệ nhiễm bệnh của cây giống con (%)	Hiệu quả kiểm soát
Không xử lý	30,50	-
Xử lý bằng W3	3,91	87,2
Xử lý bằng W5	4,29	85,9

Như được thể hiện trong Bảng 1, khoảng 30,5% cây lúa giống có sự khởi phát của bệnh mốc hồng trên hạt lúa ở khu vực không được xử lý làm đối chứng âm, trong khi đó tỷ lệ các cây giống con nhiễm bệnh ở cây lúa giống trong khu vực được xử lý bằng W3 và khu vực được xử lý bằng W5 trong đó hạt thóc giống có đặc tính kháng các bệnh trên cây giống con được gieo ở mỗi khu vực nhỏ hơn 5%. Điều này cho thấy

các hạt giống thu được bằng các phương pháp tạo ra hạt giống của cây có đặc tính kháng các bệnh trên cây giống con sử dụng chất diệt loài gây hại dựa trên vi sinh vật theo sáng chế thu được tính kháng cực cao đối với các bệnh trên cây giống con. Do hạt giống của cây lúa kháng các bệnh trên cây giống con thu được bằng cách xử lý bằng nấm *Fusarium oxysporum* không gây bệnh, chủng W3 hoặc W5, cho thấy đặc tính kháng bệnh mốc hồng do *Fusarium fujikuroi* thuộc các loài khác nhau gây ra, đã thể hiện rằng hạt giống của lúa kháng các bệnh trên cây giống con thu được bằng cách xử lý với mỗi vi sinh vật dùng làm tác nhân kiểm soát sinh học và việc xâm nhập của vi sinh vật cũng tạo ra hoạt tính ngăn ngừa và kiểm soát cao, chống lại bệnh trên cây giống con gây ra bởi nấm gây bệnh thuộc loài khác với vi sinh vật dùng làm tác nhân kiểm soát sinh học.

<Ví dụ 2>

Hiệu quả kiểm soát bệnh trên cây giống con ở cây có đặc tính kháng các bệnh trên cây giống con (2)

(Mục đích)

Chất diệt loài gây hại dựa trên vi sinh vật dùng để kiểm soát các bệnh trên cây giống con theo sáng chế được tạo ra; các hạt giống được tạo ra bằng phương pháp tạo ra hạt giống của cây có đặc tính kháng các bệnh trên cây giống con sử dụng chất diệt loài gây hại dựa trên vi sinh vật; và đã xác nhận được trên quy mô cánh đồng rằng các cá thể cây này kháng các bệnh trên cây giống con.

(Nguyên liệu và Phương pháp)

Nấm không gây bệnh, *Fusarium oxysporum* chủng W5 (Số nộp lưu: NITE BP-01539) được sử dụng làm chất diệt loài gây hại dựa trên vi sinh vật dùng để kiểm soát các bệnh trên cây giống con, theo Ví dụ 1. Lượng bào tử dính trong dung dịch nuôi cấy là $1,0 \times 10^5$ /mL.

Lúa (giống: Tangin-bozu) được sử dụng làm cây chủ và được canh tác theo phương pháp sau đây để tiếp xúc với nấm không gây bệnh. Thao tác cơ bản là theo Ví dụ 1. Các hạt thóc của cây lúa bố mẹ đầu tiên được ngâm trong chất tẩy trùng gồm dung dịch đã pha loãng 1:200 của 250 mg/L ipconazol/230 mg/L bột có thể làm ẩm của

đồng hydroxit để tẩy trùng các hạt thóc giống này. Thóc giống của cây lúa bố mẹ đã được xử lý tẩy trùng thu được được gieo trồng thành cây giống con theo phương pháp đã biết (phương pháp thông thường) trong lĩnh vực kỹ thuật. Không tiến hành kiểm soát bệnh mốc hồng trên hạt thóc ngoại trừ việc xử lý bằng chất tẩy trùng nêu trên.

Lúa (giống: Koshihikari) đã nhiễm bệnh mốc hồng trên hạt thóc tự nhiên được sử dụng làm nguồn lây nhiễm bệnh mốc hồng trên hạt thóc trên cánh đồng. Các hạt thóc mang nguồn lây nhiễm này được phát triển thành cây giống mà không tẩy trùng hạt.

Cả hai loại cây giống nêu trên được đặt trong cánh đồng lớn vào ngày thứ 32 sau khi gieo trước khi bắt đầu.

Nấm không gây bệnh theo sáng chế được cho tiếp xúc với lúa bố mẹ bằng cách phun trực tiếp nấm không gây bệnh lên phần bông sử dụng bình xịt tay ở một thời điểm nhất định vào buổi sáng (khoảng 10 đến 11 giờ) khi cây lúa bố mẹ trở bông hai lần, nghĩa là, ở giai đoạn trở vào ngày thứ 88 sau khi đặt, ở thời điểm này tỷ lệ trở đạt từ 40 đến 50% và ở giai đoạn trở hoàn toàn vào ngày thứ 91 sau khi đặt khi đó tỷ lệ trở đạt 80 đến 90%. Lượng nấm được phun vào khoảng 140 mL/m². Cây lúa bố mẹ đã được xử lý phun nấm được canh tác theo phương pháp thông thường. Vào ngày thứ 155 sau khi đặt cây lúa bố mẹ, những cây lúa này chín và được đập để thu gom các hạt thóc.

Tỷ lệ nhiễm bệnh mốc hồng được xác nhận đối với các hạt thóc đã thu. Hoạt động cơ bản là theo Ví dụ 1. Tuy nhiên, trong ví dụ này, do việc lây nhiễm tự nhiên từ Koshihikari bị nhiễm bệnh mốc hồng trên cánh đồng được sử dụng làm nguồn lây nhiễm, về nguyên tắc không cần phải chủng các hạt thóc bằng nấm gây bệnh này. Do đó, chỉ thực hiện xử lý ngâm các hạt thóc bằng cách sử dụng nước vô trùng thay cho hỗn dịch chứa bào tử của nấm gây bệnh mốc hồng và hiệu quả ức chế sự khởi phát bệnh được đánh giá theo Ví dụ 1. Khi đánh giá triệu chứng bệnh, nguyên liệu giống, trong đó hiện tượng phát triển mảnh khảnh của độ dài cây và hiện tượng ngả vàng được quan sát thấy, được xác định là cây giống bị nhiễm bệnh, và tỷ lệ nhiễm bệnh của cây giống và hiệu quả kiểm soát được tính toán sử dụng các phương trình được mô tả trong Ví dụ 1.

(Các kết quả)

Các kết quả được thể hiện trong Bảng 2.

[Bảng 2]

Xử lý	Tỷ lệ nhiễm bệnh của cây giống con (%)	Hiệu quả kiểm soát
Không xử lý	89,76	-
Xử lý bằng W3	29,38	67,3
Xử lý bằng W5	6,59	92,7

Như được thể hiện trong Bảng 2, tỷ lệ nhiễm bệnh mốc hồng trên hạt thóc của cây giống ở cây lúa giống trong khu vực xử lý bằng nấm không gây bệnh W3 hoặc khu vực xử lý bằng nấm không gây bệnh W5, trong đó hạt thóc của cây lúa kháng các bệnh trên cây giống con được gieo, vẫn là khoảng 30% với hiệu quả kiểm soát cao hơn 65% đối với khu vực xử lý bằng W3, và chỉ vào khoảng 6,6% với hiệu quả kiểm soát cao hơn 90% đối với khu vực xử lý bằng W5. Thử nghiệm này cho thấy hiệu quả của sáng chế ngay cả trên quy mô cánh đồng.

<Ví dụ 3>

Hiệu quả kiểm soát bệnh trên cây giống con ở cây có đặc tính kháng các bệnh trên cây giống con (3)

(Mục đích)

Đã xác nhận được rằng các cá thể cây giống con của các cây có đặc tính kháng các bệnh trên cây giống con theo sáng chế có đặc tính kháng các bệnh trên cây giống con nhờ việc chủng nấm gây bệnh trong các điều kiện nghiêm ngặt hơn các điều kiện trong Ví dụ 2.

(Nguyên liệu và Phương pháp)

Các nguyên liệu và thao tác cơ bản là theo Ví dụ 1 và 2. Tuy nhiên, trong Ví dụ này, việc xử lý bằng nấm không gây bệnh được tiến hành trên cánh đồng và các hạt thóc được tạo ra bằng cách sử dụng việc lây nhiễm tự nhiên từ Koshihikari bị nhiễm bệnh mốc hồng làm nguồn lây nhiễm như trong Ví dụ 2, nhưng trong xử lý này mầm cưỡng bức, các hạt thóc còn được chủng thêm bằng nấm gây bệnh bằng cách không ngâm trong nước vô trùng mà ngâm trong hỗn dịch chứa bào tử của nấm gây bệnh mốc

hồng trên hạt thóc, *Fusarium fujikuroi* trong cùng điều kiện như trong Ví dụ 1. Đây là thử nghiệm kiểm soát được tiến hành giả định rằng vẫn có một số hạt giống bị nhiễm nấm gây bệnh mốc hồng trên hạt và bệnh mốc hồng trên hạt này sẽ lây lan sang các cây giống bên cạnh trong khi trồng cây giống.

(Các kết quả)

Các kết quả được thể hiện trong Bảng 3.

[Bảng 3]

Xử lý	Tỷ lệ nhiễm bệnh của cây giống con(%)	Hiệu quả kiểm soát
Không xử lý	52,33	-
Xử lý bằng W3	19,88	62,0
Xử lý bằng W5	14,29	72,7

Mặc dù việc xử lý trong các điều kiện khởi phát nghiêm ngặt hơn được tiến hành bằng cách chủng bằng bào tử của nấm gây bệnh mốc hồng trên hạt thóc ở dạng hỗn dịch ngoài việc lây nhiễm tự nhiên giống như trong Ví dụ 2, tỷ lệ nhiễm bệnh mốc hồng trên hạt thóc của các cây giống vào khoảng 20% với hiệu quả kiểm soát bằng 62% ở vùng xử lý bằng nấm không gây bệnh W3, và tỷ lệ nhiễm bệnh mốc hồng trên hạt thóc của cây giống vào khoảng 15% với hiệu quả kiểm soát lớn hơn 70% ở khu vực xử lý bằng nấm không gây bệnh W5. Do đó, hiệu quả của sáng chế đã được chứng minh, bất kể sự khác nhau về mức độ nghiêm ngặt của điều kiện lây nhiễm của nấm gây bệnh trên cây giống con.

<Ví dụ 4>

Hiệu quả kiểm soát bệnh trên cây giống con ở cây có đặc tính kháng các bệnh trên cây giống con (4)

(Mục đích)

Đã xác nhận được trên quy mô chậu trồng bằng cách sử dụng chủng nấm thuộc chi *Trichoderma* rằng các cá thể cây giống con của các cây có đặc tính kháng các bệnh trên cây giống con theo sáng chế trở nên kháng các bệnh trên cây giống con ngay cả khi chủng nấm này khác với nấm thuộc chi *Fusarium* được sử dụng.

(Nguyên liệu và Phương pháp)

Các nguyên liệu và thao tác cơ bản theo Ví dụ 1. Tuy nhiên, trong Ví dụ này, *Trichoderma atroviride* chủng SKT-1 có thể mua được trên thị trường dưới dạng chất diệt loài gây hại dựa trên vi sinh vật (tên sản phẩm: Ecohope, Kumiai Chemical Industry Co., Ltd.) được sử dụng cùng với nấm không gây bệnh, *Fusarium oxysporum* chủng W5. Bào tử dính được sử dụng bằng cách cạo các bào tử được tạo thành không ở trong môi trường nuôi cấy lỏng mà ở trong môi trường nuôi cấy đĩa. Nồng độ của bào tử dính là $1,0 \times 10^5$ /mL, và việc phun lên phần bông được tiến hành 4 lần trong tổng số mỗi 2 ngày từ ngày thứ 87 sau khi cấy.

(Các kết quả)

Các kết quả được thể hiện trong Bảng 4.

[Bảng 4]

Xử lý	Tỷ lệ nhiễm bệnh của cây giống (%)	Hiệu quả kiểm soát
Không xử lý	13,0	-
Xử lý bằng W5	1,8	86,5
Xử lý bằng <i>Trichoderma</i>	6,0	53,6

Như được thể hiện trong Bảng 4, ở khu vực xử lý bằng nấm *Trichoderma*, tỷ lệ nhiễm bệnh của cây giống con vẫn là khoảng 6,0% với hiệu quả kiểm soát lớn hơn 50%. Thử nghiệm này cho thấy hiệu quả của sáng chế không chỉ khi nấm không gây bệnh *Fusarium oxysporum*, chủng W3 hoặc W5, được dùng mà cả khi nấm thuộc chi *Trichoderma* được dùng. Do đó, sáng chế được đánh giá là có thể ứng dụng được bằng cách sử dụng phổ rộng nấm bao gồm nấm thuộc chi *Fusarium* và chi *Trichoderma*.

Tất cả các ấn phẩm, patent và các đơn yêu cầu cấp patent được trích dẫn trong đơn này được kết hợp ở đây bằng cách viện dẫn đến toàn bộ nội dung của chúng.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp tạo ra hạt giống của cây có đặc tính kháng bệnh trên cây giống con, trong đó phương pháp này bao gồm các bước;

a) cho vi sinh vật không gây bệnh đã phân lập tiếp xúc với phần hoa của cây chủ xung quanh thời điểm ra hoa, trong đó vi sinh vật không gây bệnh đã phân lập này được sử dụng với lượng đủ để tiếp xúc với và xâm nhập vào trong cây chủ để kiểm soát sự nhiễm nguồn gây bệnh có trong hạt giống sau đó,

trong đó vi sinh vật không gây bệnh đã phân lập này thuộc cùng loài hoặc cùng chi với nguồn gây bệnh có trong hạt giống; và

b) thu gom hạt của cây chủ đã bị xâm nhập bởi vi sinh vật không gây bệnh, thu được sau bước a), trong đó vi sinh vật không gây bệnh đã phân lập này là *Fusarium oxysporum* chủng không gây bệnh W3 Số nộp lưu NITE BP-01538 hoặc *Fusarium oxysporum* chủng không gây bệnh W5 Số nộp lưu NITE BP-01539.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó cây chủ là cây họ cỏ.

3. Phương pháp theo điểm 2, trong đó cây họ cỏ là lúa.

4. Phương pháp theo điểm 1, trong đó vi sinh vật không gây bệnh đã phân lập này là ở trạng thái lỏng chứa 1×10^4 bào tử dính, hoặc nhiều hơn.