



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2009 00142**

(22) Data de depozit: **16.02.2009**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30.04.2013** BOPI nr. **4/2013**

(41) Data publicării cererii:
30.08.2010 BOPI nr. **8/2010**

(73) Titular:
• **INSTITUTUL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
PROTECȚIA PLANTELOR,**
*BD.ION IONESCU DE LA BRAD NR.8,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO*

(72) Inventatori:
• **OANCEA FLORIN, STR.PAȘCANI NR.5,**
*BL.D7, SC.E, ET.2, AP.45, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;*

• **DINU SORINA,**
*BD.ION IONESCU DE LA BRAD NR.8,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;*
• **POPESCU ANA, STR.ROTUNDĂ NR.4BIS,**
*BL.H19B, SC.B, ET.2, AP.32, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;*
• **MATHE ISTVAN,**
*PIAȚA MAJLATH GUSZTAV KAROLY NR.4,
SC.A, AP.24, MIERCUREA CIUC, HR, RO;*
• **BEATA ABRAHAM, STR.CULMEI NR.11,**
SC.C, AP.16, MIERCUREA CIUC, HR, RO;
• **LANYI SZABOLCS, STR.MIKO NR.21,**
MIERCUREA CIUC, HR, RO

(56) Documente din stadiul tehnicii:
EP 0227336 B1; US 4878936

(54) **TULPINĂ DE PAENIBACILLUS GRAMINIS CARE
FAVORIZEAZĂ NODULAREA PLANTELOR LEGUMINOASE**



RO 125651 B1

1 Inventția se referă la o tulpină de *Paenibacillus graminis* care, aplicată ca bioinoculant,
2 pentru tratamentul solului și/sau al seminței, are o acțiune de favorizare a formării nodozi-
3 tăților fixatoare de azot, la plantele leguminoase.

4 Sunt cunoscute tulpini de microorganisme care au o acțiune de favorizare a formării
5 nodozităților plantelor leguminoase. **EP 0227336 B1** descrie o serie de caracteristici ale
6 acestui tip de rizobacterii, respectiv, chemotaxia față de asparagină; capacitatea ridicată de
7 colonizare a rădăcinilor plantelor; stimularea formării nodozităților (creșterea numărului și a
8 masei nodulilor formați pe rădăcinile plantelor); sporirea eficacității de fixare a azotului
9 (mărirea activității acetilenreductazice). În urma aplicării acestor criterii, au fost selectate mai
10 multe tulpini aparținând speciilor *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas putida*, *Ps. fluorescens*,
11 *Serratia liquefaciens*, *Serratia fonticola*. Respectiv tulpini au fost depozitate la ATCC și
12 brevetate ca tulpini de favorizare a nodulării (*NPB - nodulation promotion bacteria*).

13 Tulpina de *Bacillus cereus* ATCC 53522 (**US 4878936**) este principalul component
14 al unui procedeu biotehnologic de ameliorare a nodulării rădăcinilor de legume. Tulpina
15 *Streptomyces lydicus* WYEC 108 (prezentată ca un agent de control biologic de **US 5403584**)
16 a fost descrisă și ca având o acțiune semnificativă de stimulare a nodulării plantelor de
17 mazăre (Tokala et al., "Novel Plant-Microbe Rhizosphere Interaction Involving *Streptomyces*
18 *lydicus* WYC108 and the Pea Plant (*Pisum sativum*)", *Appl. Environ. Microbiol.*,
19 68:2161...2171, 2002).

20 **US 5484464 A** prezintă o serie de tulpini de *Penicillium bilaji* (cunoscut și ca
21 *Penicillium bilaii*), cu numerele de depozit ATCC 22348, ATCC 18309 și ATCC 20851, care
22 cresc beneficiile aduse productivității legumelor de inocularea semințelor cu rizobii.

23 **US 5951978** descrie tulpina SAB MKB, de *Azospirillum brasilense* (număr de acces
24 NRRL B-30082), care are și capacitatea de a stimula formarea nodozităților de către plantele
25 de fasole, lupin și soia, inoculate cu tulpini de *Rhizobium* specifice.

26 Problema pe care urmărește să o rezolve invenția de față este creșterea producției
27 agricole la culturile de leguminoase, fără impact negativ asupra mediului.

28 Prezenta invenție descrie o tulpină de *Paenibacillus graminis* FL400 (cu număr de
29 depozit NCAIM (P) B 001365) care, având capacitatea de a se dezvolta endofit în
30 nodozitățile formate de plantele leguminoase cu rizobii, reprezintă o soluție pentru stimularea
31 formării nodozităților la plantele de leguminoase și creșterea eficienței fixării biologice a
32 azotului în nodozități.

33 Tulpina de *Paenibacillus graminis* FL400 prezintă următoarele avantaje:

34 - creștere bogată pe mediile uzuale, inclusiv, pe cele cu polioli, utilizate pentru
35 creșterea rizobilor;

36 - capacitate de a forma consorții microbiene de consens cu rizobii și alte bacterii
37 utilizate ca bioinoculanți, datorită capacității de formare de biofilme mixte și a producerii de
38 glucani ciclici;

39 - stimularea creșterii plantelor de leguminoase (și, în special, a celor de fasole).

40 Prezenta invenție se ilustrează prin următorul exemplu.

41 **Exemplu.** Tulpina FL400 de *Paenibacillus graminis* a fost izolată din noduli de pe
42 rădăcinile unei plante de năut. Plantele de năut au fost prelevate dintr-o cultură de năut
43 amplasată în NE localității Unirea, la 44° 26' 9,1" N și 27° 46' 11,4" E. Din nodulii recoltați de
44 pe rădăcinile plantelor de năut, s-au separat cei de culoare roz, care au fost dezinfectați prin
45 spălări repetate cu soluție 0,01% de clorură de alchil-dimetil-benzil amoniu (obținută prin
46 diluarea de 1000 ori a unei soluții concentrate de dezinfectant tehnic 10%) și apă distilată
47 sterilă. După sterilizarea la suprafață, nodulii au fost sfărâmați aseptice în tampon fosfat salin
steril, în raport 1 g noduli la 10 ml TFS steril. Din suspensia rezultată, s-au realizat diluții

RO 125651 B1

zecimale. Din diluția 1:1000, s-au prelevat 0,1 ml, care au fost răspândiți uniform, cu spatula Drigalski, pe suprafața unui mediu YEM - roșu de Congo. Coloniile identificate prin nepreluarea colorantului au fost reluate și purificate prin pasaje repetate pe mediu agarizat, cu următoarea formulă: manitol - 10 g/l; K₂HPO₄ - 0,5 g/l; MgSO₄ · 7H₂O - 0,2 g/l; NaCl - 0,2 g/l; CaSO₄ - 0,1 g/l; MnSO₄ - 0,005 g/l; (NH₄)₂MoO₄ · 2H₂O - 0,002 g/l; extract de drojdii - 1 g/l, agar 20 g/l, pH 6,8.

Tulpina FL400 a prezentat o creștere abundentă, pe mediul agarizat de mai sus, formând colonii netede, bombate, mucoase, cu margini bine delimitate. Microscopic, se prezintă ca bacili, de 0,5...1 x 3...4 μm, care apar izolați sau în lanțuri scurte. Celulele bacteriene ale acestei tulpini produc spori ovali - elipsoidali, localizați în porțiunea terminală a celulei sporulante. Au o colorație gram pozitivă. Coloniile formate pe nutrient agar sunt de culoare alb-crem, netede, cu margini regulate și dimensiuni de 1...2 mm. Pe medii cu 2% glucoză sau cu polioli, produc exopolizaharide, iar coloniile sunt mucoase. Produc catalază și nu produc oxidază. Hidrolizează esculina, iar nitratul este redus la nitrit. În tulpina FL400 de *Paenibacillus graminis*, este prezentă gena nifH, care se evidențiază fenotipic, prin reducerea acetilenei la etilenă.

Pentru evidențierea genelor nifH la bacteriile fixatoare de azot, s-a procedat la izolarea ADN-ului bacterian și la amplificarea genei nifH, prin tehnica PCR, folosind primerii nifH 40F și nifH 817R (Vinuesa și colab., 2005). Amestecul de reacție utilizat a fost următorul: 10 x tampon PCR 2,5 μl; dNTP 5 μl; Primer nifH 40F (GGNATCGGCAAGTCSACSAC) 0,25 μl; Primer nifH 817R (TCRAMCAGCATGTCTCSAGCTC) 0,25 μl; Taq polimerază 1 μl, MgCl₂ 2 μl; BSA 0,5 μl; H₂O 12,5 μl; ADN 1 μl. Volumul final de reacție a fost de 25 μl.

Programul de amplificare utilizat a fost de 30 cicluri de: denaturare la 94°C, 30 s; atașarea primerilor la 55°C, 30 s; extensie la 72°C, 60 s, urmată de o extensie finală la 72°C, pentru 7 min. În final, s-a procedat la detectarea genelor nifH prin electroforeză în gel de agaroză de 1%, demonstrându-se că tulpina FL400 conține această genă.

Principalele caracteristici fenotipice sunt prezentate în tabelul 1, comparativ pentru tulpina FL400 (cu număr de depozit NCAIM (P) B 001365) și tulpina tip RSA-19 (ATCC BAA-95, BCCM/LMG 19080).

Tabelul 1

Caracteristicile fenotipice ale tulpinii FL400 de *Paenibacillus graminis*, comparativ cu tulpina tip RSA-19 (ATCC BAA-95, BCCM/LMG 19080)

Caracter fiziologic	Tulpina tip RSA-19 ATCC BAA-95, BCCM/LMG 19080	Tulpina FL400
Creștere anaerobă	+	+
Oxidază	-	-
Reducere nitrați	+	+
Gaz din carbohidrați	+	+
Acid din:		
Metil α-D-glucozidă	+	+
Metil α-D-manozidă	-	-

RO 125651 B1

Tabelul 1 (continuare)

1
3
5
7
9
11
13
15
17
19

Caracter fiziologic	Tulpina tip RSA-19 ATCC BAA-95, BCCM/LMG 19080	Tulpina FL400
D-Arabinoză	-	-
D-Xiloză	+	+
Glicerol	+	+
Inulină	V	+
L-Arabinoză	+	+
Lactoză	+	+
Manitol	+	+
Melezitoză	+	+
Ramnoză	-	-
Riboză	-	-
Metil D-xilozidă	+	+
Trehaloză	+	+
Creștere la:		
5°C	V	+
10°C	+	+
Conținut GC (mol%)	52±1	52,4

21
23
25
27
29
31
33

Pentru încadrarea taxonomică exactă a tulpinii FL400, s-a procedat la secvențierea genei care codifică pentru ARN-ul ribozomal de 16S (16S rADN).

Izolarea ADN-ului bacterian s-a realizat conform următorului procedeu:

- s-au adus 25 µl soluție NaOH 0,5 N peste 0,1 ul de sediment bacterian;
- s-a incubat la temperatura camerei, timp de 15 min;
- s-au adăugat 25 µl tampon TRIS (pH = 8) și 300 µl apă distilată;
- s-a centrifugat la 10000 g;
- s-a separat și s-a păstrat supernatantului (care conține ADN-ul) la temperatura de -20°C;
- pe un alicot din ADN-ul izolat, s-a evidențiat puritatea ADN-ului prin electroforeză în gel de agaroză de 1%.

Amplificarea segmentelor de gene 16S rADN prin tehnica PCR s-a realizat prin folosirea primerilor 27 Forward, respectiv, 1492 Reverse, care au caracteristicile descrise în tabelul 2.

Caracteristicile primerilor folosiți pentru amplificarea segmentelor de gene 16S rADN prin tehnica PCR

Denumire primeri	Structura*	Lungime (perechi de baze - pb)	Tm (°C)	GC (%)
27F	5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3'	20	54,2	47,5
1492R	5TACGGYTACCTTGTTACGACTT3'	22	55-57,1	40,9-45,5

* M = A sau C; Y = C sau T

Amestecul de reacție pentru PCR este cel de mai jos: 10 x PCR buffer 5 µl; 1 mM dNTP 10 µl; Primer 27F (32,5 µM) 0,5 µl; Primer 1492R (32,5 µM) 0,5 µl; Taq polimerază 1 µl; 25 mM MgCl₂ 4 µl; H₂O 28 µl; ADN 1 µl. Volumul final a fost de 50 µl. Programul de amplificare folosit a fost: denaturare la 94°C, 30 s; atașarea primerilor la 55°C, 30 s; extensie la 72°C, 60 s, urmată de o extensie finală la 72°C, pentru 7 min. După amplificare, s-au evidențiat produșii de amplificare (16S rADN) prin electroforeză în gel de agaroză 1%.

Înainte de secvențiere, a fost utilizat kitul de secvențiere ciclică a ADN-ului AmpliTaq® FS Big Dye™ Terminators (Applied Biosystems). Amestecul de reacție utilizat a fost următorul: 5 x Big Dye buffer 3 µl; Big Dye 2 µl; Primer 519 Reverse 1 µl; ADN 7 µl; H₂O 7 µl. Volumul final a fost de 20 µl.

Precipitarea cu etanol a 16S rADN-ului amplificat s-a realizat după următorul procedeu:

- a) s-a făcut un premix, cu următoarea compoziție: etanol absolut 62,5 µl; H₂O 14,5 µl, acetat de sodiu 3 µl; ADN 20 µl. Volum final al premixului rezultat a fost de 100 µl;
- b) s-a agitat premix-ul;
- c) s-a incubat la temperatura camerei, timp de 15 min;
- d) s-a centrifugat (14000 rpm, 20 min, 4°C);
- e) s-a îndepărtat supernatantul;
- f) s-au adăugat 250 µl etanol de 70%;
- g) s-a agitat;
- h) s-a centrifugat (14000 rpm, 10 min, 4°C);
- i) s-a îndepărtat supernatantul;
- j) s-a uscat în centrifugă (sub vid) - timp de 15...20 min.

Secvențierea 16S rADN a fost realizată cu metoda Dye Terminator Cycle Sequencing (Perkin Elmer, 1998), folosind un secvențiator automat de tip ABI PRISM 310 (Perkin Elmer). Secvențele rezultate au fost analizate, folosind programul CHROMAS 2.33 (Technelysium Pty Ltd). Compararea secvențelor 16S rADN obținute cu secvențele existente în Banca de gene NCBI (National Center for Biotechnology Information) s-a realizat cu ajutorul programului BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). BLAST este un algoritm utilizat de o familie de cinci programe, care vor alinia secvența dată față de secvențele deja introduse în baza de date moleculară. Sunt folosite metode statistice, pentru a aprecia semnificația potrivirilor. Alinierea raportată (adică secvențele din baza de date care pot fi identice cu secvența dată) sunt raportate în ordinea semnificativității, respectiv, a gradului de similaritate. Dacă similaritatea secvențelor 16S rADN al bacteriilor studiate cu secvențele existente în banca de gene este mai mare de 99%, atunci tulpinile pot fi considerate ca făcând parte din aceeași specie.

RO 125651 B1

1 Pe baza rezultatelor comparării secvențelor 16S rADN ale tulpinii FL400 cu sec-
vențele existente în Banca de gene NCBI (folosind programul BLAST), s-a demonstrat că
3 tulpina aparține speciei *Paenibacillus graminis*. Secvențele 16S rADN ale tulpinii FL400 (464
perechi de baze) prezintă o asemănare de peste 99,7% cu secvența tulpinii bacteriene
5 *Paenibacillus graminis* IM-2 din Banca de gene NCBI (nr. de referință: AB28571-
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=170172237>), tulpină fixa-
7 toare de azot, care a fost izolată în Japonia (Nagashima și Uozumi 2008), din spațiul
intercelular al rădăcinii plantei *Poa acroleuca*.

9 Specia bacteriană *Paenibacillus graminis* a fost descrisă în anul 2002, de către Berge
și colab. (*Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 52, 697-616), tulpina tip fiind considerată RSA-19
11 (ATCC BAA-95, BCCM/LMG 19080).

Lungimea și compoziția nucleotidică a secvenței 16S rADN (464 perechi de baze) de
13 la tulpina FL400 de *Paenibacillus graminis* (descrisă în cadrul acestei invenții), care a fost
utilizată pentru încadrarea taxonomică, este prezentată în tabelul 3.

Tabelul 3

Lungimea și compoziția nucleotidică a secvențelor 16S rADN la tulpina FL400 de
Paenibacillus graminis, utilizată pentru încadrarea taxonomică

Lungimea secvenței 16S rADN obținut (perechi de baze - pb)	Compoziția nucleotidică a secvenței 16S rADN
464 pb	CTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAATACATGCAAGTCGAGCGGAT TTACTGGAGTGCTTGCACTCCAGTAGGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACG TAGGCAACCTACCCTCTAGACTGGGATAACTACCGAAACGGTAGCTAATACCG GATAATTCCCTGACCCTCCTGGGCTAGGGATGAAAGGCGGAGCAATCTGCTGC TAGAGGATGGGCCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGCCTACCAA GGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGAACGGCCACACTGGGACTGAG ACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGG CGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAA AGCTCTGTTGCCAGGGAAGAACGTCCGGTAGAGTAACTGCT

35 Capacitatea tulpinii FL400 de a produce glucani ciclici a fost determinată printr-o
analiză de cromatografie în strat subțire. Tulpina de *Paenibacillus graminis* FL400 a fost
37 crescută pe mediu lichid cu 2,0% amidon solubil (Merck); 0,5% polipeptone (Oxoid); 0,5%
extract drojdie (Oxoid); 0,1% K₂HPO₄ (Merck); 0,02% MgSO₄ x 7H₂O (Merck) 1,0% Na₂CO₃
39 (Merck), timp de 24 h, la 28°C și la o rată de agitare de 120 rpm. Celulele au fost separate
prin centrifugare (4°C, 10,000 g, 30 min), iar supernatantul a fost recuperat și uscat la vid.
41 Reziduul sec s-a reluat în 70% etanol (1 ml de etanol pentru fiecare 10 mg de extract) și s-a
centrifugat din nou (4°C, 5,000 g, 20 min). Din supernatantul etanolic, s-a realizat o separare
43 prin cromatografie în strat subțire pe plăci de silica gel-60 (Merck) cu amestec 1-butanol/-
etanol/apă (5:5:4, vol/vol). Glucanii ciclici au fost relevați prin incubarea plăcilor pentru
45 10 min, la 125°C, după scufundarea plăcii în soluție de 5% acid sulfuric în etanol. S-a lucrat
cu etaloane, substanțe pure, provenite de Sigma-Aldrich, identificarea făcându-se prin R_f
47 comun etaloane - compuși din extract. Testul a dovedit că tulpina FL400 produce glucani
ciclici cu 16...18 reziduuri glucozil, legate prin legături β-1,2 glicozidice.

RO 125651 B1

Capacitatea tulpinii FL400 de a forma biofilme a fost testată prin tehnica cultivării pe microgodeuri, singuri sau în cultură mixtă cu tulpini de rizobi. Testele au dovedit că bacteriile FL400 au capacitatea de a forma biofilme atât în cultură pură, cât și în cultură mixtă cu rizobii.

S-a testat influența tulpinii FL400 de *Paenibacillus graminis* asupra numărului de noduli și a dezvoltării acestor noduli la plante de fasole, soia și mazăre, provenite din semințe inoculate cu rizobii specifice.

Tulpinile de rizobi specifici pentru plantele de fasole, soia și mazăre (*Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* FL220; *Bradyrhizobium japonicum* SO600, respectiv, *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* Mz269) au fost cultivate timp de 4 zile (tulpinile de *Rhizobium*), respectiv, 7 zile (tulpina de *Bradyrhizobium*), la temperatura de 28°C, în eprubete cu mediu agarizat înclinat, cu următoarea compoziție: manitol - 10 g/l; K₂HPO₄ - 0,5 g/l; MgSO₄ · 7H₂O - 0,2 g/l; NaCl - 0,2 g/l; CaSO₄ - 0,1 g/l; MnSO₄ - 0,005 g/l; (NH₄)₂MoO₄ · 2H₂O - 0,002 g/l; extract de drojdii - 1 g/l, agar 20 g. Tulpina FL400 a fost crescută în eprubete cu mediu agarizat înclinat cu aceeași compoziție. În eprubetele pe care au crescut tulpinile de testat, s-au adăugat câte 5 ml de tampon fosfat salin steril. S-a omogenizat, iar din omogenizat s-au prelevat 0,1 ml care au fost diluați aseptice până la o densitate optică de 0,5 la 660 nm. Din diluția normalizată la DO₆₆₀, s-a prelevat câte 1 ml, care a fost folosit pentru inocularea aseptice a 100 boabe de fasole, soia sau mazăre. Boabele de fasole (cv. Avans), soia (cv. Atlas) și mazăre (cv. Diana) au fost sterilizate, în prealabil, la suprafață, prin spălări succesive cu hipoclorit 2%, alcool etilic 30% și apă distilată sterilă.

Boabele inoculate au fost depuse apoi în vase Leonard cu perlit irigat, cu mediu lipsit de azot. Plantele rezultate au fost crescute în condiții controlate (temperatură de 22°C±0,2°C, iluminare 12 h pe zi cu 250 umol fotoni m⁻²s⁻¹). După 20 de zile de cultivare, s-au recoltat nodulii plantelor de fasole, soia sau mazăre. Spălarea rădăcinilor s-a efectuat deasupra unei site cu ochiuri mai mici de 0,25 mm, pentru a se recupera eventualele nodozități desprinse prin spălare. Nodulii formați pe rădăcinile plantelor au fost numărați, uscați la 105°C și apoi cântăriți cu precizie (±0,1 mg).

Mediul fără azot, pe care au fost cultivate plantele de leguminoase, a fost mediul nutritiv Crone, modificat de Bryan (Hewit, 1965), a cărui formulă este prezentat în tabelul 4 (macroelemente nutritive), la care se adaugă 5 ml/l din soluția de (oligo și microelemente nutritive), prezentată în tabelul 5.

Tabelul 4

Soluția nutritivă Crone, modificată de Bryan (soluție nutritivă fără azot), utilizată pentru cultivarea plantelor inoculate cu rizobi

Sare minerală	Formula	g/l	mg/l - ppm (soluția finală)
Clorură de potasiu	KCl	10,0 g	393,3 ppm, K
Sulfat de calciu	CaSO ₄ · 2(H ₂ O)	2,5 g	116,3 ppm, Ca
Sulfat de magneziu	MgSO ₄ · 7(H ₂ O)	2,5 g	18,5 ppm, Mg
Fosfat tricalcic	Ca ₃ (PO ₄) ₂	2,5 g	80,2 ppm, P
Fosfat feric cu citrat de fer		2,5 g	26,2 ppm, Fe

Soluția de oligo și microelemente care se adaugă la soluția Crone

Sare minerală	Formula	grame/l	mg/l - ppm (soluția finală)
Acid boric	H ₃ BO ₃	0,57	0,50 ppm B
Sulfat de mangan	MnSO ₄ · H ₂ O	0,31	0,50 Mn
Sulfat de zinc	ZnSO ₄ · 7(H ₂ O)	0,09	0,10 Zn
Sulfat de cupru	CuSO ₄ · 5(H ₂ O)	0,08	0,08 Cu
Molibdat de sodiu	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,098	0,04 Mo
Clorură de cobalt	CoCl ₂ · 6(H ₂ O)	0,0008	0,001 Co

Rezultatele experimentului realizat sunt prezentate în tabelul 6. Aceste rezultate demonstrează faptul că tulpina FL400 stimulează formarea nodozităților la plantele de leguminoase atât prin creșterea numărului de noduli, cât și prin acumularea de mai multă biomasă uscată în acești noduli.

Tabelul 6

Influența tratamentului cu tulpina FL400 de Paenibacillus graminis asupra numărului și dezvoltării nodulilor formați pe rădăcinile plantelor de leguminoase inoculate cu rizobii

Variantă experimentală	Număr noduli per plantă	Masa uscată totală a nodulilor (mg/plantă)
<i>Phaseolus vulgaris</i> cv. Avans - <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> FL220	47,3 ±8,6	54,6 ±7,3
<i>Phaseolus vulgaris</i> cv. Avans - <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> FL220 - <i>Paenibacillus graminis</i> FL400	64,6 ±7,3	141,2±18,3
<i>Glycine max</i> cv. Atlas - <i>Bradyrhizobium japonicum</i> SO600	27,3±12,6	67,3 ±15,3
<i>Glycine max</i> cv. Atlas - <i>B. japonicum</i> SO600 - <i>Paenibacillus graminis</i> FL400	42,6 ±9,3	165,2±17,3
<i>Pisum sativum</i> cv. Diana <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> Mz269	34,6±8,6	48,1±14,8
<i>Pisum sativum</i> cv. Diana <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> Mz269 <i>Paenibacillus graminis</i> FL400	52,3±11,3	117,6±20,3

Pentru a se demonstra creșterea eficienței fixării biologice a azotului în nodozitățile formate sub influența coinoculării cu tulpina FL400, s-a realizat un experiment în care s-a folosit o tulpina Mz269 de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, care are un spectru mare de gazde. S-a testat eficiența fixării azotului în nodozitățile formate de tulpina Mz269, cu următoarele specii de leguminoase: *Vicia hirsuta* (cosiță); *Vicia sativa* (măzărice de primăvară); *Vicia villosa* (măzărice de toamnă, măzărice păroasă); *Pisum sativum* (mazăre);

RO 125651 B1

Lathyrus pratensis (lintea pratului), aplicată singură sau co-inoculată cu tulpina FL400. Tulpinile (Mz. 269 și FL400) au fost cultivate timp de 3 zile, la temperatura de 28°C, pe eprubete cu mediu agarizat înclinat (mediu agarizat cu compoziția conformă celei descrise mai sus). În eprubetele pe care au crescut tulpinile de testat, s-au adăugat câte 5 ml de tampon fosfat salin steril. S-a omogenizat, iar din omogenizat s-au prelevat 0,1 ml, care au fost diluați aseptice, până la o densitate optică de 0,5 la 660 nm. Din diluția normalizată la DO_{660} , s-au prelevat 0,1 ml, care au fost depuși pe rădăcinile unor plante de 5...6 mm, rezultate din semințe de leguminoase (speciile descrise mai sus), sterilizate la suprafață, prin spălări succesive cu hipoclorit 2%, alcool etilic 30% și apă distilată sterilă. Semințele sterilizate au fost germinate, în prealabil, timp de 2 zile, pe apă agarizată, în condiții aseptice. Plantulele inoculate au fost cultivate apoi în punji de creștere sterile (furnizate de Mega International), care conțineau mediu semiagarizat, lipsit de azot. Mediul semiagarizat fără azot, pe care au fost cultivate plantulele de mazărice păroasă, a fost mediul nutritiv Crone, modificat de Bryan (Hewit, 1965), a cărui formulă este prezentată în tabelul 4 (macroelemente nutritive), la care se adaugă 5 ml/l din soluția de oligo și microelemente nutritive, prezentată în tabelul 5, și se agarizează cu 10 g/l.

Pungile de creștere cu mediu de cultură fără azot semiagarizat și plantule inoculate au fost depuse pe standurile lor de creștere, învelite în folie de staniol și trecute într-o cameră de creștere. Plantele au fost crescute în condiții controlate (temperatură de $22 \pm 0,2^\circ\text{C}$, iluminare 12 h pe zi cu $250 \text{ umol fotoni m}^{-2}\text{s}^{-1}$). După 20 de zile de cultivare, s-au recoltat nodulii plantelor de mazărice păroasă. Spălarea rădăcinilor s-a efectuat deasupra unei site cu ochiuri mai mici de 0,25 mm, pentru a se recupera eventualele nodozități desprinse prin spălare. Nodozitățile radiculare, proaspăt recoltate, de pe fiecare plantă, au fost cântărite cu precizie ($\pm 1 \text{ mg}$) și s-au repartizat în două părți egale.

O primă parte s-a introdus imediat într-un flacon de sticlă brună de 1000 ml, prevăzut cu dop din cauciuc, fixat cu dop metalic înșurubat (flacon vaccin), care conținea 25 ml soluție glucoză 1% în tampon TRIS-HCl $pH=7,4$ și acetilenă la o presiune parțială ($p_{\text{acetilena}}$) de 0,1 atm.

Presiunea parțială de acetilenă s-a realizat prin injectarea a 100 ml acetilenă într-un flacon de 1000 ml, cu ajutorul unei seringi de 10 ml, prin dopul din cauciuc al flaconului. S-a incubat 4...8 h la temperatura de 20°C. La terminarea perioadei de incubare, din flacoane s-au prelevat volume bine determinate de gaz, cu ajutorul unor (micro)seringi prin dopul din cauciuc al flaconului. Probele de gaz s-au injectat în injectorul unui gaz-cromatograf, în capul unei coloane cromatografice de 1,5...2 x 2...2,5 m, umplută cu Porapak N și menținută la 50°C. S-a utilizat azotul ca gaz purtător, iar detectarea etenei și a acetilenei s-a realizat cu un detector de ionizare în flacăra.

În cea de-a doua parte a nodozităților, s-a determinat leghemoglobina, cu ajutorul metodei piridină - hemocrom, descrisă de Appleby și Bergersen (1980) și proteina totală cu reactiv Bradford (1976), după extragerea proteinelor totale în tampon fosfat salin. Rezultatele experimentului sunt prezentate în tabelul 7. Aceste rezultate demonstrează rolul coinoculării cu *Paenibacillus graminis* FL400, în creșterea eficienței fixării biologice a azotului în nodozitățile plantelor de leguminoase.

Pentru a se stabili efectul fitostimulator al tulpinii FL400 asupra plantelor de fasole, a fost realizat un experiment, în care s-a inoculat 1 ml de suspensie bacteriană din tulpina FL400 (preparat ca mai sus, după creștere pe mediu agarizat cu manitol, ca sursă de carbon) peste 100 boabe de fasole (cv. Avans) sterilizate. Boabele de fasole au fost trecute apoi pe ghivece cu perlit umectat cu soluție nutritivă Arnon.

Influența coinoculării cu tulpina FL400 de *Paenibacillus graminis* asupra eficienței fixării azotului în nodozitățile formate de diferitele plante gazdă cu o tulpină de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (Rl bv Mz269)

Nodozități	Leghemoglobină ¹	Activitate acetilenreductază ²	Proteină totală noduli ³
<i>Vicia hirsuta</i> (cosită) - Rl bv Mz269	77,1b	69,7b	9,2b
<i>Vicia hirsuta</i> (cosiță) - Rl bv Mz269 - <i>P. graminis</i> FL400	102,8a	103,2a	12,1a
<i>Vicia sativa</i> (măzărice de primăvară) - Rl bv Mz269	79,3ab	76,5a	9,1b
<i>Vicia sativa</i> (măzărice de primăvară) - Rl bv Mz269 - <i>P. graminis</i> FL400	93,3a	96,5a	11,8a
<i>Vicia villosa</i> (măzărice de toamnă) - Rl bv Mz269	64,5b	67,8b	9,8b
<i>Vicia villosa</i> (măzărice de toamnă) - Rl bv Mz269 - <i>P. graminis</i> FL400	87,5a	84,8b	12,8a
<i>Pisum sativum</i> (mazăre) - Rl bv Rl bv Mz269	57,2c	62,4c	7,6c
<i>Pisum sativum</i> (mazăre) - Rl bv Mz269 - <i>P. graminis</i> FL400	77,2ab	87,4b	9,5b
<i>Lathyrus pratensis</i> (lintea pratului) - Rl bv Mz269	69,7ba	76,3c	7,9c
<i>Lathyrus pratensis</i> (lintea pratului) - Rl bv Mz269 - <i>P. graminis</i> FL400	89,7a	96,3a	12,9a

1 - nmol hem/g nod sp; 2 - μ M etenă/g nod su oră; 3 - mg prot/g nod su. Valorile urmate de aceeași literă nu diferă semnificativ pentru $P < 0,05$. Valori medii rotunjite la o zecimală, obținute din cel puțin patru repetiții.

Plantele rezultate din boabele inoculate au fost crescute în condiții controlate (temperatură de $22 \pm 0,2^\circ\text{C}$, iluminare 12 h pe zi cu $250 \mu\text{mol fotoni m}^{-2}\text{s}^{-1}$) timp de 30 zile. Rezultatele experimentului sunt prezentate în tabelul 8. Aceste rezultate demonstrează că tulpina FL400 are un efect de stimulare a dezvoltării plantelor de fasole.

Efectul (co)inoculării cu tulpina FL400 asupra producției de fasole s-a determinat în cadrul unor experimente de câmp, amplasate la ICDPP (București -Băneasa).

Aplicarea microorganismelor s-a realizat în condiții controlate. S-au realizat 2 l de soluție (de aplicare), cu următoarea compoziție: 3,0 g/l zaharoză; 0,5 g/l K_2HPO_4 ; 0,2 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,1 g/l NaCl; 0,1 g/l extract de drojdie; 0,5 g/l glutamat de sodiu, 0,2 g/l K_2MoO_4 . Ingredientele au fost dizolvate pe rând în apă dură standard (considerată în literatura de specialitate, ca fiind un etalon pentru apa de fântână). Apa dură standard s-a obținut prin amestecarea a 68,5 ml soluție A cu 17 ml soluție B într-un berzelius de 1000 ml. S-a diluat apoi cu circa 800 ml apă distilată și s-a adus pH-ul la 6...7 prin adăugare de NaOH 0,1 N. S-a transferat într-un vas cotelat de 1000 ml și s-a adus la semn cu apă distilată.

Efectul tratamentului cu *Paenibacillus graminis* FL400 asupra dezvoltării plantelor de fasole

Varianta experimentală	Înălțimea plantei de fasole	Masa uscată a plantelor de fasole (mg)
Martor, boabe de fasole neinoculate	47,3 ±6,7	726±52
Baobe de fasole inoculate cu <i>P. graminis</i> FL400	62,5±3,5	1280 ±67

Soluțiile A și B, folosite pentru prepararea apei dure standard, s-au preparat după cum urmează.

Soluția A s-a preparat astfel: s-au cântărit 4 g carbonat de calciu și s-au transferat într-un flacon conic de 50 ml, cu o cantitate minimă de apă distilată. S-au adăugat încet 82 ml HCl 1N, agitând conținutul. Când tot carbonatul de calciu s-a dizolvat, s-a diluat soluția, la circa 400 ml, cu apă distilată și s-a fiert pentru eliminarea CO₂. S-a răcit soluția și apoi s-au adăugat 2 picături soluție roșu de metil și s-a neutralizat cu soluție de amoniac 1 N, până la culoare intermediară portocalie. S-a transferat cantitativ într-un balon cotat de 1000 ml, s-a adus la semn cu apă distilată și apoi s-a transvazat pentru păstrare într-un flacon de polietilenă.

Soluția B s-a preparat astfel: s-au cântărit exact 1,613 g oxid de magneziu și s-au transferat într-un flacon de 500 ml cu o cantitate minimă de apă distilată. S-au adăugat 82 ml HCl 1 N. S-a reîncălzit încet, până la dizolvare, s-a diluat, la circa 400 ml, cu apă distilată și s-a fiert pentru eliminarea CO₂. S-a răcit soluția și apoi s-au adăugat 2 picături soluție roșu de metil și s-a neutralizat cu o soluție de amoniac 1 N, până la culoare intermediară portocalie. S-a transferat cantitativ într-un balon cotat de 1000 ml, s-a adus la semn cu apă distilată și s-a transvazat pentru păstrare într-un flacon de polietilenă.

În această apă dură standard, s-au adăugat suspensii de microorganisme conținând 10⁹ ufc/ml, obținute prin cultivarea pe medii lichide a tulpinilor testate (*Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* FL220 și *Paenibacillus graminis* FL400). Raportul de diluare al suspensiilor în apă dură a fost de 1:10. Suspensia diluată a fost apoi inoculată pe boabe de fasole (cv. Avans), în raport de 0,1 l la 10 kg boabe, corespunzând unei inoculări de 10⁵ ufc, pentru fiecare bob de fasole. Experiența a fost amplasată în pătrat latin, pe parcele de 9,6 mp. Rezultatele sunt prezentate în tabelul 9.

Influența coinoculării cu *Paenibacillus graminis* FL400 asupra producției de fasole boabe

Varianta experimentală	Producția (kg/ha)	% față de martor	Semnificație
Martor neinoculat	752	100%	
Inoculat cu <i>P. graminis</i> FL400, 10 ⁵ ufc/bob	1020	135,64%	***
Inoculat cu <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> FL200, 10 ⁵ ufc/bob	812	107,98%	-
Inoculat cu <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> FL200, 10 ⁵ ufc/bob și <i>P. graminis</i> FL400, 10 ⁵ ufc/bob	1080	143,62%	***

Rezultatele demonstrează că inocularea cu tulpina FL400 de *Paenibacillus graminis* este mai eficientă decât inocularea cu o tulpină specifică de rizobi în creșterea producției de fasole boabe. Această creștere de producție agricolă se realizează prin utilizarea durabilă a unor resurse regenerabile - și deci cu un impact redus asupra mediului.

RO 125651 B1

Revendicare

1

Tulpină de *Paenibacillus graminis* FL400, cu număr de depozit NCAIM (P) B 001365, **caracterizată prin aceea că are capacitatea de a se dezvolta endofit în nodozitățile formate de plantele leguminoase cu bacterii din genul *Rhizobium*, stimulează formarea nodozităților pe rădăcinile plantelor de leguminoase și crește eficiența fixării biologice a azotului în nodozități.**

3

5

7



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
sub comanda nr. 327/2013