



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2010 00529**

(22) Data de depozit: **16.06.2010**

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

(41) Data publicării cererii:
30.04.2012 BOPI nr. **4/2012**

(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.D 7, SC.E, ET.2, AP.45, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;

• **OANA SICUIA, STR.VICINA NR.3, BL.33,**
SC.3, AP.153, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B,
RO;
• **DINU SORINA,**
BD.ION IONESCU DE LA BRAD NR.8,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;
• **ZAMFIROPOL ROXANA, STR.NADEȘ**
NR.42 A, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;
• **CONSTANTINESCU FLORICA,**
STR.EMANOIL PORUMBARU NR.67,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO

(56) Documente din stadiul tehnicii:
WO 01/11062 A2; US 2010/0083401 A1;
EP 2100962 A1

(54) **PROCEDEU DE CREȘTERE A NIVELULUI DE POLIAMINE
DIN PLANTELE CULTIVATE**



1 Invenția se referă la un procedeu de creștere a nivelului de poliamine din plantele
cultivate și la un procedeu de selecție, din izolate naturale, a tulpinilor de bacterii sporulante
3 gram pozitive, utilizabile într-un astfel de procedeu de creștere a nivelului de poliamine din
plante.

5 Sunt cunoscute mai multe procedee utilizate pentru a crește nivelul de poliamine din
plante, în scopul valorificării efectelor benefice ale acestor compuși policationici, ubicuitari,
7 în țesuturile vegetale. Poliaminele (și, în special, spermidina) sunt esențiale pentru procesele
fiziologice din plante, implicate în creștere și dezvoltare (germinație, dezvoltarea mugurilor
9 axilari, înflorire și fructificare). Un nivel ridicat de poliamine întârzie senescența și intensifică
dezvoltarea pereților celulari vegetali. Poliaminele (și în special, putresceina și spermina) se
11 acumulează în țesuturile vegetale și ca o formă de rezistență la stresuri abiotice (stres
oxidativ, ioni de metale grele în exces, îngheț, secetă, stres salin/osmotic) și biotice (agenți
13 fitopatogeni biotrofi și hemibiotrofi).

 Unele procedee utilizează tehnici de modificare a genomului plantelor. De exemplu,
15 brevetul **WO 01/11062** prezintă un procedeu de obținere a unor plante modificate genetic,
în care nivelul de poliamine este de 1,5 ori mai ridicat decât în plantele nemodificate genetic.
17 Procedeul implică transformarea celulelor plantelor prin integrarea, în genomul acestora, a
unor secvențe, care codifică pentru enzime implicate în biosinteza poliaminelor, precum
19 argininidecarboxilaza (ADC) sau ornitindecarboxilaza (ODC), asociate unui promotor
puternic, și regenerarea unor plante transgenice din respectivele celulele vegetale. Cererea
21 de brevet **US 20080010702** descrie un procedeu de creștere a nivelului de poliamine din
plante, prin integrarea, în genomul celular, a unui vector incluzând o secvență care codifică
23 pentru sperminsintaza exogenă.

 Pentru că plantele modificate genetic au o acceptanță redusă în Uniunea Europeană,
25 au fost dezvoltate procedee alternative de creștere a nivelului poliaminelor din plante, pentru
îmbunătățirea răspunsului plantelor la cel puțin un tip de stres. Cererea de brevet de invenție
27 **FR 2 929 640** se referă la un procedeu de ameliorare a rezistenței plantelor la stres, prin apli-
carea unei compoziții pe bază de glucide (zaharoză) și poliamine (putresceina, care este
29 precursorul metabolic al spermidinei și sperminei). Plantele astfel tratate prezintă o rezistență
crescută la erbicidele triazinice și au deci capacitatea de a crește pe soluri contaminate cu
31 reziduuri de erbicide triazinice. Aplicarea de poliamine endogene într-o singură doză poate
însă să determine reducerea ulterioară a nivelului de poliamine, datorită reducerii exprimării
33 genelor implicate în biosinteza poliaminelor sau activării genelor de catabolizare a poliaminelor,
ca urmare a fenomenelor de reglare metabolică prin feed-back din țesuturile vegetale.

35 Creșterea nivelului de poliamine din plante are o serie de efecte favorabile, dar
determină și o creștere a sensibilității plantelor la agenții patogeni necrotrofi. Pentru a crește
37 rezistența plantelor la fitopatogeni necrotrofi (mulți dintre acești fitopatogeni producători de
micotoxine), au fost realizate procedee de reducere a nivelului de poliamine din plante. De
39 exemplu, brevetul **WO 09/112505** revendică un procedeu de modificare a genomului
plantelor, pentru modularea/reducerea nivelului de poliamine (prin inhibarea sau reducerea
41 exprimării genelor implicate în biosinteza poliaminelor), în vederea creșterii rezistenței la
infecția spicului de cereale cu ciuperci din genul *Fusarium*, producătoare de trichotecene.

43 Problema pe care o rezolvă invenția este de a realiza un procedeu de creștere a
nivelului de poliamine din plantele cultivate, concomitent cu reducerea riscului fitosanitar
45 asociat agenților fitopatogeni necrotrofi.

 Procedeul conform invenției înlătură dezavantajele de mai sus, prin aceea că este
47 alcătuit din următoarele etape: se însămânțează o cultură de mazăre de toamnă, *Pisum*
sativus subsp. *arvense* sau de mazărice de toamnă, *Vicia villosa* sau *Vicia panonica*, direct

în miriște, din a doua jumătate a lunii august până în prima jumătate a lunii septembrie, la o densitate de 70...75 semințe germinabile de mazăre/m ² și o densitate de 120...140 boabe germinabile de mazărice/m ² , se întrețin culturile de mazăre sau de mazărice până la sfârșitul lunii martie sau începutul lunii aprilie, apoi se transformă în mulci bioactiv prin tăvălugire și se tratează cu 600...700 l/ha de suspensie, care include un erbicid total pe bază de glifosat, aplicat în doză de 0,9...1,2 kg s.a./ha, sau glufosinat de amoniu, aplicat în doză de 0,5...0,7 kg s.a./ha, și o suspensie de 10 ⁵ /ml de bacterii gram pozitive sporulate, la două săptămâni de la convertirea culturii în mulci, se însămânțează o cultură de floarea-soarelui sau de porumb hibrid semitimpuriu, la o densitate de 50...55000 semințe germinabile/ha direct în mulciul vegetal, prin folosirea unei mașini de semănat direct în miriște, se întreține cultura până la recoltare la mijlocul sau sfârșitul lunii septembrie.	1
Prin aplicarea invenției, se obțin următoarele avantaje:	3
- crește nivelul de poliamine din plante, datorită eliberării de precursori din materialul vegetal în curs de descompunere, depus sub formă de mulci pe suprafața solului;	5
- scade posibilitatea apariției fenomenelor de reducere a nivelului de poliamine rezultate din procesele de reglare metabolică prin feed-back din țesuturile vegetale, pentru că precursorii din materialul vegetal sunt eliberați treptat;	7
- reduce riscul fitosanitar asociat agenților fitopatogeni necrotrofi ca urmare a dezvoltării de microbiocenoze antagoniste/supresive pe resturile vegetale inoculate cu bacteriile aplicate concomitent cu mulcirea covorului vegetal de mazăre sau mazărice;	9
- utilizează culturi „verzi”, de protecție în timpul iernii, incluse în măsurile de agromediu, pentru care se aplică plăți compensatorii;	11
- asigură menținerea acoperită, a cel puțin 30% din suprafața solului, cu resturi vegetale, prin folosirea procedeelor tehnologice, conservative, de prelucrare a solului;	13
- asigură realizarea unui management durabil al buruienilor, prin utilizarea mulciului vegetal.	15
- asigură selecția unor tulpini bacteriene care au capacitate ridicată de colonizare a resturilor vegetale rezultate prin mulcirea culturilor "verzi", de protecție în timpul iernii, sub acțiunea erbicidelor totale, ca urmare a rezistenței față de erbicide și a capacității de a crește pe materialul vegetal la valori mici ale coeficientului de activitate a apei;	17
- permite selecția unor bacterii care stimulează germinația și dezvoltarea plantelor de cultură, datorită producerii de poliamine din materialul vegetal în curs de descompunere;	19
- conduce la selecția unor microorganisme care reduc riscul fitosanitar al agenților fitopatogeni necrotrofi, datorită capacității ridicate de colonizare a resturilor vegetale și a antagonismului față de respectivii agenți fitopatogeni.	21
Procedeu de creștere a nivelului de poliamine din plantele cultivate cuprinde următoarele etape: însămânțare direct în miriște, din a doua jumătate a lunii august până în prima jumătate a lunii septembrie, a unei culturi de mazăre de toamnă, <i>Pisum sativus</i> subsp. <i>arvense</i> , la o densitate de 70...75 semințe germinabile de mazăre/m ² , sau de mazărice de toamnă, <i>Vicia villosa</i> sau <i>Vicia panonica</i> , la o densitate de 120...140 boabe germinabile de mazărice/m ² ; întreținerea culturii de mazăre de toamnă sau de mazărice până la sfârșitul lunii martie/începutul lunii aprilie; transformarea culturii de mazăre sau de mazărice în mulci bioactiv prin tăvălugire și tratare cu 600...700 l/ha de suspensie, care include un erbicid total pe bază de glifosat, aplicat în doză de 0,9...1,2 kg s.a./ha, sau glufosinat de amoniu, aplicat în doză de 0,5...0,7 kg s.a./ha, și o suspensie de 10 ⁵ /ml de bacterii gram pozitive, sporulate, care prezintă concomitent următoarele caracteristici: antagonism pentru agenții fitopatogeni necrotrofi, rezistență la glifosat sau glufosinat de amoniu, capacitate de eliberare de poliamine și, în special, putresceină, din materialul vegetal de mazăre sau mazărice;	23
	25
	27
	29
	31
	33
	35
	37
	39
	41
	43
	45
	47

1 însămânțarea unei culturi de floarea-soarelui la o densitate de 50...55000 semințe
germinabile/ha, direct în mulciul vegetal, la două săptămâni de la convertirea culturii de
3 mazăre sau mazărice în mulci, prin folosirea unei mașini de semănat direct în miriște;
întreținerea culturii de floarea-soarelui până la recoltare; alternativ, însămânțarea unei culturi
5 de porumb hibrid semitimpuriu, la o densitate de 50...55000 semințe germinabile/ha, după
12...14 zile de la mulcire; întreținerea, în continuare, a culturii de porumb și recoltarea
7 acesteia, inclusiv, a tulpinilor de porumb, până la mijlocul sau sfârșitul lunii septembrie.

Procedeul de selecție, din izolate naturale, a tulpinilor de bacterii utilizabile în
9 procedeul descris mai sus, care constă în următoarele trepte de selecție: selectarea
izolatelor de bacterii antagoniste față de agenții fitopatogeni necrotrofi, prin determinarea *in*
11 *vitro* a antagonismului, tehnica culturilor duble pe mediu agarizat; selectarea, dintre izolatele
care au antagonism, a celor care au rezistență față de glifosat sau glufosinat de amoniu, prin
13 determinarea efectului erbicidului asupra ratei respirației unei suspensii de spori, obținută
prin inocularea a 2,5 ml suspensie de spori cu 10^6 ufc/ml în 22,5 ml de mediu Luria Bertani
15 lichid, conținând concentrații de glifosat sau glufosinat de amoniu, echivalente concentrațiilor
de erbicid din soluția aplicată pentru mulcire, și incubată peste noapte; selectarea, dintre
17 izolatele de bacterii antagoniste față de fitopatogeni și cu rezistență la glifosat, a celor care
au capacitatea de a elibera poliamine din material vegetal de mazăre sau mazărice
19 păroasă, în condiții de disponibilitate redusă a apei, prin determinarea, prin cromatografie
în strat subțire, a poliaminelor produse din 2,5 g de material vegetal uscat și măcinat,
21 menținut la $0,95 a_w$, inoculat cu 1 ml suspensie 10^5 ufc/ml de spori și incubat la temperatura
camerei, timp de trei zile; verificarea activității antagoniste a tulpinilor selectate, prin
23 cocultivarea bacteriilor cu agenți fitopatogeni necrotrofi pe substrat solid menținut la $0,95 a_w$
și într-un ciclu de 12 h, la 30°C și iluminare cu lumină artificială, și 12 h la 18°C , la întuneric;
25 verificarea inocuității tulpinilor selectate prin testul pe *Galleria melonella*.

Se dau, în continuare, 3 exemple de realizare a invenției.

27 **Exemplul 1.** Se însămânțează direct în miriște, în a doua jumătate a lunii august, o
cultură de mazăre de toamnă, *Pisum sativus* subsp. *atvense*. Se folosește o mașină de
29 semănat direct în miriște și se seamănă la o densitate de 70...75 semințe germinabile de
mazăre/ m^2 , care corespund unei cantități de 65...75 kg/ha. În cazul în care solul pe care
31 se cultivă mazărea este un sol cu un nivel redus de rhizobii, se procedează la inocularea cu
rhizobii specifice, *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, un litru de suspensie cu 10^9 ufc/mln
33 pentru 250 kg de sămânță. Cultura de mazăre se întreține conform tehnologiei uzualen până
la sfârșitul lunii martie. Se transformă cultura de mazăre în mulci bioactiv prin tăvălugire și
35 tratare cu 600...700 l/ha de suspensie care include un erbicid total pe bază de glifosat,
aplicat în doză de 0,7...0,9 kg s.a./ha și o suspensie de 10^5 /ml de bacterii gram pozitive
37 sporulate. Bacteriile pozitive gram sporulate prezintă concomitent următoarele caracteristici:
antagonism pentru agenții fitopatogeni, rezistență la glifosat, capacitate de eliberare de
39 poliamine și, în special, putresceina, din materialul vegetal de mazăre. Selecția respectivelor
bacterii se face în conformitate cu procedeul 3, descris mai jos. Se însămânțează o cultură
41 de floarea-soarelui, la o densitate de 50...55000 semințe germinabile/ha, corespunzând unei
cantități de sămânță de 3,5...5 kg/ha, direct în mulciul vegetal, la două săptămâni de la
43 convertirea culturii de mazăre în mulci bioactiv, prin folosirea unei mașini de semănat direct
în miriște. Cultura de floarea-soarelui se întreține conform tehnologiei recomandate pentru
45 zona de favorabilitate, până la recoltare.

Exemplul 2. Se însămânțează direct în miriște, în prima jumătate a lunii septembrie,
47 o cultură de mazărice de toamnă, *Vicia villosa* sau *Vicia panonica*. Se folosește o mașină
de semănat direct în miriște, la o densitate de 120...140 boabe germinabile de mazărice/ m^2 ,

corespunzând unei cantități de 40...45 kg/ha. În cazul în care solul pe care se cultivă mazărea este un sol cu un nivel redus de rhizobii, se procedează la inocularea cu rhizobii specifice, *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, un litru de suspensie cu 10^9 ufc/ml, pentru 200 kg de sămânță. Cultura de mazărice se întreține conform tehnologiei uzuale până la sfârșitul lunii martie. Se transformă cultura de mazăre în mulci bioactiv, prin tăvălugire și tratare cu 600...700 l/ha de suspensie care include un erbicid total glufosinat de amoniu, aplicat în doză de 0,5...0,7 kg s.a./ha și o suspensie de 10^5 spori/ml de bacterii gram pozitive. Bacteriile pozitive gram sporulate prezintă concomitent următoarele caracteristici: antagonism pentru agenții fitopatogeni, rezistență la glufosinat de amoniu, capacitate de eliberare de poliamine și, în special, putresceină, din materialul vegetal de mazăre. Selecția respectivelor bacterii se face în conformitate cu procedeul 3, descris mai jos. După 12...14 zile de la mulcire, se însămânțează o cultură de porumb hibrid semitimpuriu, la o densitate de 50...55000 semințe germinabile/ha, prin folosirea unei mașini de semănat direct în miriște. Cultura de porumb se întreține conform tehnologiei recomandate pentru zona de favorabilitate, până la recoltare.

Exemplul 3. Se izolează din sol, conform procedurilor cunoscute, bacterii sporulate gram pozitive. Se testează *in vitro* activitatea antagonistă a izolatelor față de diferiți agenți fitopatogeni necrotrofi, cum ar fi: *Fusarium* spp., *Alternaria* spp., *Botrytis* spp., *Sclerotinia sclerotiorum* și *Sclerotium bataticola*, prin utilizarea tehnicii culturilor duble. Culturile de agenți fitopatogeni sunt împropățate pe mediu CGA (cartof, glucoză, agar), iar culturile de bacterii pe mediu Luria-Bertani agarizat. Testarea activității antagoniste *in vitro* a izolatelor se efectuează pe mediul CGA, repartizat în plăci Petri cu diametrul de 9 cm. Plăcile Petri se însămânțează cu microorganismele test, se incubează la 28°C și se analizează în ceea ce privește zona de inhibiție (mm) la 24, 48 și 72 h. Se selectează tulpinile care determină zonă de inhibiție mai mare de 5 mm.

Izolatele de bacterii antagoniste față de fitopatogeni sunt testate apoi, în ceea ce privește rezistența față de glifosat sau glufosinat de amoniu, prin determinarea efectului erbicidului asupra ratei respirației unei suspensii de spori. Se obține o suspensie de spori cu 10^6 ufc/ml, prin tehnicile cunoscute, respectiv, aplicarea unui șoc termic unei culturi de 12 h, numărarea sporilor și apoi normalizarea numărului de ufc, prin diluție cu mediu LB steril. Suspensia de spori se inoculează în 22,5 ml de mediu Luria Bertani lichid, conținând glifosat, în concentrațiile micromolare de 4,4; 8,8; 17,6 sau 35,2 (corespunzând unor doze de 1,25; 2,5, 5, 10 l/ha, pentru produsul condiționat, conținând 360 g/l, distribuit în 600 l apă) sau glufosinat de amoniu în concentrațiile micromolare de 1,25, 2,5, 5 și 10 (corespunzând unor doze de 1; 2, 4, 8 l/ha, pentru produsul condiționat, conținând 360 g/l, distribuit în 600 l apă). Se incubează peste noapte și apoi se determină intensitatea respirației comparativ cu respirația aceleiași suspensii de spori inoculați pe mediul Luria Bertani, fără adaos de erbicide. Se determină astfel izolatele care sunt rezistente la concentrațiile de erbicid din soluția aplicată pentru mulcire.

Aceste izolate, care sunt antagoniste și cu rezistență la glifosat, sunt apoi selectate din punct de vedere al capacității de a elibera poliamine din material vegetal de mazăre sau mazărice păroasă, în condiții de disponibilitate redusă a apei. Circa 10 kg de material vegetal proaspăt (de mazăre sau mazărice) se usucă și se macină. Pulberea rezultată se ambalează câte 10 g în pungi de polietilenă și se sterilizează prin iradiere gamma, la o doză de 25 kGy. Se aduc, într-un vas Petri cu diametrul de 9 cm, 2,5 g de material vegetal uscat, care se umectează cu 2,5 ml de apă distilată sterilă. Placa Petri se deschide și se trece aseptice într-un exsicator steril, care are depuse pe fund cristale de azotat de potasiu. Materialul vegetal mărunțit se menține peste noapte în exsicator, pentru a se stabili la o

disponibilitatea apei de 0,95 a_w. Acest material vegetal se inoculează cu 1 ml suspensie 10⁵ ufc/ml de spori și se incubează la temperatura camerei, timp de trei zile. După trei zile, materialul vegetal se trece cantitativ într-un Erlenmayer de 100 ml, împreună cu 25 ml de acid percloric 5%. Se extrage timp de 4 h, prin agitare pe un agitator magnetic, după care se separă prin centrifugare. Din supernatant, se reiau 0,1 ml, care se derivatizează prin dansilare. Într-o fiolă de reacție, se aduc 0,1 ml de supernatant, 0,2 ml soluție saturată de carbonat de sodiu și 0,4 ml de clorură de dansil. Se incubează timp de o oră, la 60°C, apoi se adaugă 0,1 ml soluție 20% prolină (pentru îndepărtarea excesului de clorură de dansil).

Poliminele dansilate se extrag în 0,5 ml de toluen, care se evaporă la sec și se reia în 0,1 ml metanol. Poliaminele dansilate sunt apoi separate și identificate prin cromatografie în strat subțire, folosind amestecuri cloroform:trietanolamină (9:1) și n-hexan:acetat de etil (2:1), și comparându-se cu valorile compușilor standard dansilați. Plăcile de siliciu sunt observate în lumină UV, iar spoturile selectate sunt trecute cantitativ de pe placă într-o eprubetă. Din silicagel, se eluează poliaminele dansilate cu soluție de metanol-toluen (9:1). Fluorescența este măsurată prin spectrofluorimetrie, folosind lumină de excitare de 415 nm și lumină de emisie de 510 nm. Se lucrează față de un martor etalon, în care materialul vegetal este tratat cu apă și nu inoculat cu bacterii.

Tulpinilor de bacterii antagoniste *in vitro* pe medii agarizate, cu rezistență la erbicidele totale pe bază de glifosat și glufosinat amoniu, și cu capacitate de a elibera poliaminele din materialul vegetal, li se verifică activitatea antagonistă prin cocultivarea bacteriilor cu agenți fitopatogeni necrotrofi pe substrat solid. Se testează antagonismul față de *Fusarium graminearum* Schw. DSMZ 4527 (teleomorfa *Gibberella zeae* Schw. Petch). Ciuperca toxigenă a fost cultivată pe mediu înclinat cartof - glucoză - agar. După șapte zile de creștere, cultura a fost reluată în tampon fosfat salin, pH 7,2, adusă la 10⁶ ufc/ml și inoculată (0,1 ml/g) peste 2,5 g paie de grâu sterilizate prin autoclavare și menținute la 0,95 a_w, prin expunere, timp de 24 h, în exsicator, față de azotat de potasiu. Anterior, concomitent sau ulterior tratamentului cu ciuperci *F. graminearum*, au sunt aplicate și tulpinile bacteriene de testat. Exsicatoarele cu plăcile Petri pe care se află diferitele variante experimentale se incubează într-un ciclu de 12 h la 30°C și iluminare cu lumină artificială, și 12 h la 18°C, la întuneric.

În final, pentru tulpinile care prezintă antagonism față de *F. graminearum*, în testul descris mai sus, se verifică inocuitatea prin testul pe *Galleria melonella*. Larvele sunt crescute pe substrat de cultură, la 30°C. Substratul de creștere se obține după cum urmează. Se amestecă mălai 400 g, făină 200 g, târâte de grâu 200 g, drojdie uscată măcinată 100 g și lapte praf 200 g. La acest amestec pulverulent, se adaugă 700 ml de amestec lichid, compus din 350 ml miere și 350 ml glicerină, în care s-a dizolvat ceară de albine (1:1). Compoziția finală se omogenizează la mixer și se păstrează în cutie de plastic, la 4°C.

Larvele de vârstă a treia sunt păstrate la 4°C, pe substratul de creștere menționat mai sus. Cu ajutorul unei seringi Hamilton de 5 μl, se injectează câte 5 μl de suspensie bacteriană, prin partea stânga a ultimului segment al larvelor. După injectare, larvele sunt plasate în incubator, la întuneric, la 30°C și se monitorizează mortalitatea.

În urma aplicării tehnicii de mai sus, din 272 izolate de bacterii inițiale, au fost selectate 2 tulpini de bacili gram pozitivi, 56.1s și Usa2, care prezintă concomitent următoarele caracteristici: antagonism pentru agenții fitopatogeni, rezistență la glifosat și glufosinat de amoniu, capacitate de eliberare de poliamine și, în special, putresceina, din materialul vegetal de leguminoase. Tulpinile 56.1s și Usa2 au fost identificate pe baza unei taxonomii polifazice, respectiv, a combinării caracterelor morfologice cu cele fiziologice și cu cele moleculare. Tipizarea moleculară anterior efectuată a demonstrat faptul că cele două

RO 127295 B1

tulpinile de bacterii aparțin la genuri diferite. Coroborând datele morfologice, fiziologice și cu	1
cele moleculare (secvența 16s rADN și profilul acizilor grași membranari), tulpina Usa2 a fost	
încadrată ca aparținând speciei <i>Bacillus subtilis</i> , iar tulpina 56.1s, care a fost supusă și unei	3
secvențieri totale a 16s rADN, a fost încadrată ca aparținând speciei <i>Brevibacillus</i>	
<i>laterosporus</i> .	5

1. Procedeu de creștere a nivelului de poliamine din plantele cultivate, **caracterizat prin aceea că** este alcătuit din următoarele etape: se însămânțează o cultură de mazăre de toamnă, *Pisum sativus* subsp. *arvense* sau de mazărice de toamnă, *Vicia villosa* sau *Vicia panonica*, direct în miriște, din a doua jumătate a lunii august până în prima jumătate a lunii septembrie, la o densitate de 70...75 semințe germinabile de mazăre/m² și o densitate de 120...140 boabe germinabile de mazărice/m², se întrețin culturile de mazăre sau de mazărice până la sfârșitul lunii martie sau începutul lunii aprilie, apoi se transformă în mulci bioactiv prin tăvălugire și se tratează cu 600...700 l/ha de suspensie, care include un erbicid total, pe bază de glifosat, aplicat în doză de 0,9...1,2 kg s.a./ha, sau glufosinat de amoniu, aplicat în doză de 0,5...0,7 kg s.a./ha, și o suspensie de 10⁵/ml de bacterii gram pozitive sporulate, la două săptămâni de la convertirea culturii în mulci, se însămânțează o cultură de floarea-soarelui sau de porumb hibrid semitimpuriu, la o densitate de 50...55000 semințe germinabile/ha, direct în mulciul vegetal, prin folosirea unei mașini de semănat direct în miriște, se întreține cultura până la recoltare la mijlocul sau sfârșitul lunii septembrie.

2. Procedeu de creștere a nivelului de poliamine din plantele cultivate, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** tulpinile de bacterii gram pozitive sporulate, utilizate în tratarea mulciului bioactiv, se obțin prin inocularea a 2,5 părți, în volum, suspensie de spori cu 10⁶ ufc/ml în 22,5 părți, în volum, de mediu Luria Bertani lichid, care conține concentrații de glifosat sau glufosinat de amoniu, echivalente cu concentrațiile de erbicid din soluția aplicată pentru mulcire și se incubează peste noapte, se selectează izolatele de bacterii antagoniste față de fitopatogeni și cu rezistență la glifosat, care au capacitatea de a elibera poliamine din material vegetal de mazăre sau mazărice păroasă, în condiții de disponibilitate redusă a apei.

3. Procedeu de creștere a nivelului de poliamine din plantele cultivate, conform revendicării 2, **caracterizat prin aceea că** identificarea bacteriilor antagoniste față de fitopatogeni și cu rezistență la glifosat, care au capacitatea de a elibera poliamine, se realizează prin determinarea, prin cromatografie în strat subțire, a poliaminelor produse din 2,5 părți, în greutate, material vegetal uscat și măcinat, menținut la 0,95 a_w, inoculat cu o parte, în volum, suspensie 10⁵ ufc/ml de spori și incubat la temperatura camerei timp de trei zile, și se verifică activitatea antagonistă a tulpinilor selectate prin cocultivarea acestora cu agenți fitopatogeni necrotrofi, pe substrat solid menținut la 0,95 a_w și într-un ciclu de 12 h, la întuneric, la 30°C, și iluminare, cu lumină artificială 12 h, la 18°C, și verificarea inocuității tulpinilor selectate prin testul pe *Galleria melonella*.

