



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2009 00142

(22) Data de depozit: 16.02.2009

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

(71) Solicitant:
• 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

(54) TULPINĂ DE BACTERIE CARE FAVORIZEAZĂ NODULAREA PLANTELOR LEGUMINOASE

(57) Rezumat:

Prezenta invenție se referă la tulpina de *Paenibacillus* *graminis* FL400, cu număr de depozit NCAIM (P) B 001365, bioinoculant, pentru tratamentul solului și/sau semințelor, care dezvoltă endofit în nodozitățile formate

de rizobii la plantele leguminoase, prin aceasta măbind eficacitatea fixării azotului în nodozități.

Revendicări: 1

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



RO 125651 A2

Tulpină de bacterie care favorizează nodularea plantelor leguminoase

Prezentul brevet de invenție se referă la o tulpină de *Paenibacillus graminis* care, aplicată ca bioinoculant pentru tratamentul solului și/sau al seminței, are o acțiune de favorizare a formării nodozităților fixatoare de azot la plantele leguminoase

Sunt cunoscute tulpini de microorganisme care au o acțiune de favorizare a formării nodozităților plantelor leguminoase. Brevetul EP0227336 descrie o serie de caracteristici ale acestui tip de rizobacterii, respectiv chemotaxia față de asparagină; capacitatea ridicată de colonizare a rădăcinilor plantelor; stimularea formării nodozităților (creșterea numărului și a masei nodulilor formați pe rădăcinile plantelor); sporirea eficacității de fixare a azotului (mărirea activității acetilenreductazice). În urma aplicării acestor criterii au fost selectate mai multe tulpini aparținând speciilor *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas putida*, *Ps. fluorescens*, *Serratia liquefaciens*, *Serratia fonticola*. Respectiv tulpini au fost depozitate la ATCC și brevetate ca tulpini de favorizare a nodulării (NPB - *nodulation promotion bacteria*).

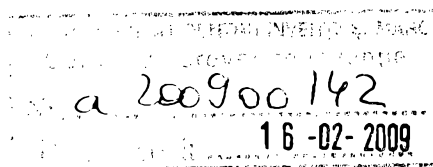
Tulpina de *Bacillus cereus* ATCC 53522 (brevet SUA 4 878 936) este principalul component al unui procedeu biotehnologic de ameliorare a nodulării rădăcinilor de legume. Tulpina *Streptomyces lydicus* WYEC 108 (prezentată ca un agent de control biologic de brevetul SUA 5 403 584) a fost descrisă și ca având o acțiune semnificativă de stimulare a nodulării plantelor de mazăre (Tokala et al., 2002, Appl. Environ. Microbiol. 68:2161-2171).

Brevetul SUA 5 484 464 prezintă o serie de tulpini de *Penicillium bilaii* (cunoscut și ca *Penicillium bilaii*), cu numerele de depozit ATCC 22348, ATCC 18309 și ATCC 20851, care cresc beneficiile aduse productivității legumelor de inocularea semințelor cu rhizobii.

Brevetul SUA 5 951 978 descrie tulpina SAB MKB de *Azospirillum brasilense* (număr de acces NRRL B-30082), care are și capacitatea de a stimula formarea nodozităților de către plantele de fasole, lupin și soia inoculate cu tulpini de *Rhizobium* specifice.

Prezenta invenție descrie o tulpină de *Paenibacillus graminis* FL400 (cu număr de depozit NCAIM (P) B 001365) care, având capacitatea de a se dezvolta endofit în nodozitățile formate de plantele leguminoase cu rhizobiile, reprezintă o soluție pentru: (i) stimularea formării nodozităților la plantele de leguminoase; (ii) creșterea eficienței fixării biologice a azotului în nodozități și (iii) creșterea producției agricole fără impact negativ asupra mediului.

Tulpina de *Paenibacillus graminis* FL400 prezintă următoarele avantaje:



16-02-2009

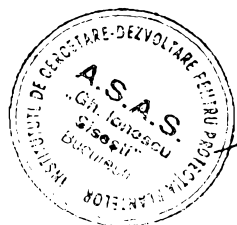
- creștere bogată pe mediile uzuale, inclusiv pe cele cu polioli utilizate pentru creșterea rhizobiilor;
- capacitate de a forma conșorii microbiene de consens cu rhizobiile și altor bacterii utilizate ca bioinoculanți datorită capacității de formare de biofilme mixte și a producerii de glucani ciclici;
- stimularea creșterii plantelor de leguminoase (și în special a celor de fasole).

Prezenta invenție se ilustrează prin următorul exemplu.

Exemplu. Tulpina FL400 de *Paenibacillus graminis* a fost izolată din noduli de pe rădăcinile unei plante de năut. Plantele de năut au fost prelevate dintr-o cultură de năut amplasată în NE localității Unirea, la 44° 26' 9,1" N și 27° 46' 11,4" E. Din nodulii recoltați de pe rădăcinile plantelor de năut s-au separat cei de culoare roz, care au fost dezinfectați prin spălări repetate cu soluție 0,01% de clorură de alchil-dimetil-benzil amoniu (obținută prin diluarea de 1000 ori a unei soluții concentrate de dezinfectant tehnic 10%) și apă distilată 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 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



H. Ionescu

reacție utilizat a fost următorul: 10x tampon PCR 2,5 µl; dNTP 5 µl; Primer *nifH* 40F (GGNATCGGCAAGTCSACSAC) 0,25 µl; Primer *nifH* 817R (TCRAMCAGCATGTCCTCSAGCTC) 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 94 °C, 30 s; atașarea primerilor 55 °C, 30 s; extensie 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 gena.

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

Tab.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	+	+
Gas din carbohidrați	+	+
Acid din:		
Metil α-D-glucozidă	+	+
Metil α-D-manozidă	-	-
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

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 25µl soluție NaOH 0,5N peste 0, 1µl de sediment bacterian;
- s-a incubat la temperatura camerei timp de 15 minute;
- s-au adăugat 25µl tampon TRIS (pH=8) și 300µl apă distilată;
- s-a centrifugat la 10000g;
- 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 27Forward respectiv 1492Reverse, care au caracteristicile descrise în tab. 2.

Tab. 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	5'TACGGYTACCTTGTTACGACTT3'	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: 10x PCR buffer 5 µl; 1mM dNTP 10 µl; Primer 27F (32,5µM) 0,5 µl; Primer 1492R (32,5µM) 0,5 µl; Taq polimerază 1 µl; 25mM MgCl₂ 4 µl; H₂O 28 µl; ADN 1 µl. Volum final a fost de 50 µl. Programul de amplificare folosit a fost denaturare 94 °C, 30 s; atașarea primerilor 55 °C, 30 s; extensie 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: 5x Big Dye buffer 3 µl; Big Dye 2 µl; Primer 519Reverse 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:

- 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 premix-ului rezultat a fost de 100 µl;
- s-a agitat premixului;

Harce

Tab.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 TTACTGGAGTGCTTGCACTCCAGTAGGTTAGCGGCGGACGGGTAGTAACACG TAGGCAACCTACCCTCTAGACTGGGATAACTACCGGAAACGGTAGCTAATACCG GATAATCCCTGACCCTCTGGGCTAGGGATGAAAGGCGGAGCAATCTGCTGC TAGAGGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGCCTACCAA GGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGTGAACGGCCACACTGGGACTGAG ACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGAATGGG CGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTCGGATCGTAA AGCTCTGTTGCCAGGGAAGAACGTCCGGTAGAGTAAGTCT

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 crescută pe mediu lichid cu 2,0% amidon solubil (Merck); 0,5% polipeptone (Oxoid); 0,5% extract drojdie (Oxoid); 0,1% K_2HPO_4 (Merck); 0,02% $MgSO_4 \times 7H_2O$ (Merck) 1,0% Na_2CO_3 (Merck), timp de 24 ore, 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. 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 prin cromatografie în strat subțire pe plăci de silica gel-60 (Merck) cu maestec 1-butanol / etanol / apă (5:5:4, vol/vol). Glucanii ciclici au fost relevați prin incubarea plăcilor pentru 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 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.

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

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 rhizobii specifice.

Tulpinile de rhizobii specifice 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, pe eprubete cu mediu agarizat înclinat



cu următoarea compoziție: manitol – 10 g/l; K_2HPO_4 – 0,5 g/l; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,2 g/l; NaCl – 0,2 g/l; $CaSO_4$ – 0,1 g/l; $MnSO_4$ – 0,005 g/l; $(NH_4)_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ – 0,002 g/l; extract de drojdii – 1 g/l, agar 20g. Tulpina FL400 a fost crescută pe 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 DO_{660} 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 $22^\circ C \pm 0,2^\circ C$, iluminare 12 ore pe zi cu $250 \mu mol$ fotoni $m^{-2}s^{-1}$). 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 $105^\circ C$ și apoi cântăriți cu precizie ($\pm 0,1$ 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 tab.4 (macroelemente nutritive), la care se adaugă 5 ml/l din soluția de (oligo și microelemente nutritive) prezentată în tab. 5.

Tab. 4. Soluția nutritivă Crone modificată de Bryan (soluție nutritivă fără azot), utilizată pentru cultivarea plantelor inoculate cu rhizobii.

Sare minerală	Formula	grame / l	mg/l – ppm (soluția finală)
Clorură de potasiu	KCl	10,0 g	393,3 ppm, K
Sulfat de calciu	$CaSO_4 \cdot 2(H_2O)$	2,5 g	116,3 ppm, Ca
Sulfat de magneziu	$MgSO_4 \cdot 7(H_2O)$	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

Tab. 5. Soluția de oligo și microelemente care se adaugă la soluția Crone

Sare minerală	Formula	grame / l	mg/l – ppm (în soluția finală)
Acid boric	H_3BO_3	0,57	0,50 ppm B
Sulfat de mangan	$MnSO_4 \cdot H_2O$	0,31	0,50 Mn
Sulfat de zinc	$ZnSO_4 \cdot 7(H_2O)$	0,09	0,10 Zn
Sulfat de cupru	$CuSO_4 \cdot 5(H_2O)$	0,08	0,08 Cu
Molibdat de sodiu	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,098	0,04 Mo
Clorură de cobalt	$CoCl_2 \cdot 6(H_2O)$	0,0008	0,001 Co

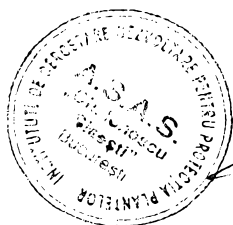
Rezultatele experimentului realizat sunt prezentate în tab.6. Aceste rezultate demonstrează faptul că tulpina FL400 stimulează formarea nodozităților la plantele de leguminoase, atât prin creșterea numărului de noduli cât și prin acumularea de mai multă biomasă uscată în acești noduli.

Tab. 6. Influența tratamentului cu tulpina FL400 de *Paenibacillus graminis* asupra numărului și dezvoltării nodulilor formați pe rădăcinile plantelor de leguminoase inoculate cu rhizobii.

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 co-inoculării 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* (măzăriche de primăvară); *Vicia villosa* (măzăriche de toamnă, măzăriche păroasă); *Pisum sativum* (mazăre); *Lathyrus pratensis* (lintea pratului), aplicată singură sau co-inoculată cu tulpina FL400. Tulpinile (Mz. 269 și FL400) au fost cultivate timp de 3 zile, 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 DO₆₆₀ s-au prelevat 0,1 ml care au fost depuși pe rădăcinile unor plantule 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 pungi de creștere sterile (furnizate de Mega International), care conțineau mediu semiagarizat lipsit de





sterilizate. Boabele de fasole au fost trecute apoi pe ghivece cu perlit umectat cu soluție nutritivă Arnon.

Tab. 7. Influența co-inoculării 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* (Rlbv Mz269).

Nodozități	Leghemoglobină ¹	Activitate acetilenreductazică ²	Proteină totală noduli ³
<i>Vicia hirsuta</i> (cosiță) - Rlbv Mz269	77,1b	69,7b	9,2b
<i>Vicia hirsuta</i> (cosiță) - Rlbv Mz269 - <i>P. graminis</i> FL400	102,8a	103,2a	12,1a
<i>Vicia sativa</i> (măzăriche de primăvară) - Rlbv Mz269	79,3ab	76,5a	9,1b
<i>Vicia sativa</i> (măzăriche de primăvară) - Rlbv Mz269 - <i>P. graminis</i> FL400	93,3a	96,5a	11,8a
<i>Vicia villosa</i> (măzăriche de toamnă) - Rlbv Mz269	64,5b	67,8b	9,8b
<i>Vicia villosa</i> (măzăriche de toamnă) - Rlbv Mz269 - <i>P. graminis</i> FL400	87,5a	84,8b	12,8a
<i>Pisum sativum</i> (mazăre) - Rlbv Rlbv Mz269	57,2c	62,4c	7,6c
<i>Pisum sativum</i> (mazăre) - Rlbv Mz269 - <i>P. graminis</i> FL400	77,2ab	87,4b	9,5b
<i>Lathyrus pratensis</i> (lintea praturului) - Rlbv Mz269	69,7ba	76,3c	7,9c
<i>Lathyrus pratensis</i> (lintea praturului) - Rlbv 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 $P < 0,05$. Valorii medii rotunjite la o zecimală, obținute din cel puțin patru repetiții.

Plantele rezultate din boabele inoculate au fost crescute în condiții controlate (temperatură de $22^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$, iluminare 12 ore pe zi cu $250 \mu\text{mol foton} \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$) timp de 30 zile. Rezultatele experimentului sunt prezentate în tab. 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 litri 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, 0,2g/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.

Tab. 8. 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	$47,3 \pm 6,7$	726 ± 52
Baobe de fasole inoculate cu <i>P. graminis</i> FL400	$62,5 \pm 3,5$	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 1 N, 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 CO_2 . 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 cotelat 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 CO_2 . 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 cotelat 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 10^9 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 tab. 9.

Tab. 9. Influența co-inoculării 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 rhizobii 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.



Q-2009-00142--
16-02-2009

Revendicări

1. Tulpina 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 rhizobiile, stimulează formarea nodozităților pe rădăcinile plantelor de leguminoase, crește eficiența fixării biologice a azotului în nodozități și determină creșterea producției agricole la culturile de leguminoase.



Halsae