

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **238335**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **430205**

(51) Int.Cl.
C12N 1/14 (2006.01)
C12R 1/645 (2006.01)
A01N 63/04 (2006.01)

(22) Data zgłoszenia: **11.06.2019**

(54) **Szczepionka, sposób przygotowania szczepionki
oraz sposób biotyzacji borówki amerykańskiej**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
14.12.2020 BUP 26/20

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
09.08.2021 WUP 19/21

(73) Uprawniony z patentu:
UNIwersytet Jagielloński, Kraków, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:
KATARZYNA TURNAU, Kraków, PL
RAFAŁ WAŻNY, Kraków, PL
PIOTR ROZPADEK, Poręba Żegoty, PL

(74) Pełnomocnik:
rzecz. pat. Aleksandra Wojakiewicz

PL 238335 B1

Opis wynalazku

Wynalazek dotyczy szczepionki do biotyzacji borówki amerykańskiej, zawierającej szczep *Xylaria* sp. nr KKP 2073p, sposobu przygotowania szczepionki do biotyzacji borówki amerykańskiej oraz sposobu biotyzacji borówki amerykańskiej. Przedmioty wynalazku znajdują zastosowanie w ekologicznej produkcji owoców jagodowych.

Biotyzacja jest nowym biotechnologicznym podejściem do uprawy roślin, które obejmuje inokulację rośliny pożytecznymi mikroorganizmami jak np. grzyby i bakterie w celu zwiększenia jej wzrostu i tolerancji na stres biotyczny i abiotyczny. Biotyzacja roślin pomaga przyczynić się do ograniczenia nawożenia mineralnego roślin oraz zwiększenia ilości i jakości plonu.

Z opisu CN106635821 znane jest zastosowanie grzybów mykoryzowych do promowania absorpcji nutrientów, takich jak azot i fosfor, przez borówkę amerykańską. Grzyby uzyskano poprzez izolację z korzeni borówki. Zastosowanie grzybów mykoryzowych polepszyło rozwój korzeni, promowało wzrost roślin i wchłanianie azotu, fosforu i potasu.

Z opisu CN102220246 znane jest zastosowanie grzybów mykoryzowych *Coprinus micaceus*, wyizolowanych z korzeni borówki amerykańskiej, do promowania wzrostu i poprawy wydajności hodowli borówki amerykańskiej. Zastosowanie grzybów *Coprinus micaceus* przyczynia się do poprawy systemu korzeniowego roślin i ochrony przed insektami.

Z opisu WO2010050808 znane jest zastosowanie grzybów erikoidalnych do poprawy jakości gleby. Szczepy grzybów erikoidalnych, należące do *Hymenoscyphus ericae*, *Rhizoscyphus* spp. i *Oidiodendron* spp. wprowadza się do gleby razem ze skałą krzemianową, która jest źródłem kationów magnezu, żelaza, sodu i innych. Sposób prowadzi do poprawy jakości gleb dla roślin uprawnych.

Celem niniejszego wynalazku było zapewnienie szczepionki do biotyzacji borówki amerykańskiej, która przyczynia się do ograniczenia nawożenia mineralnego roślin i przede wszystkim zwiększa jakość plonu borówki amerykańskiej.

Szczepionka do biotyzacji borówki amerykańskiej według wynalazku zawiera szczep rodzaju *Xylaria* sp. nr KKP 2073p, zdeponowany w Międzynarodowej Kolekcji Kultur Drobnoustrojów Przemysłowych Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego w Warszawie pod numerem KKP 2073p. Szczep rodzaju *Xylaria* sp. nr KKP 2073p został wyizolowany z rośliny *Verbascum lychnitis*. Wyniki analizy genetycznej regionu ITS rDNA przedstawia SEQ. ID NO.1.

Szczepionka może zawierać co najmniej jeden szczep należący do grzybów erikoidalnych.

Korzystna jest obecność w szczepionce szczepu *Oidiodendron maius* UNIJAG.PL.368 i/albo *Phialocephala fortinii* UNIJAG.PL.382 i/albo *Hymenoscyphus* sp. UNIJAG.PL.391.

W szczególności, szczepionka może zawierać szczepy *Xylaria* sp. nr KKP 2073p, *Oidiodendron maius* UNIJAG.PL.368, *Phialocephala fortinii* UNIJAG.PL.382 oraz *Hymenoscyphus* sp. UNIJAG.PL.391 w stosunku ilościowym 1:1:1:1

Sposób przygotowania szczepionki do biotyzacji borówki amerykańskiej według wynalazku polega na tym, że szczep rodzaju *Xylaria* sp. nr KKP 2073p, zdeponowany w Międzynarodowej Kolekcji Kultur Drobnoustrojów Przemysłowych Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego w Warszawie pod numerem KKP 2073p, namnaża się w płynnym nośniku, w szczególności w 2% pożywce maltozowej, przez okres co najmniej 5, po czym grzybnię odziera się od nośnika. W szczególności, preferowany okres namnażania wynosi 7 dni.

Korzystnie, każdy szczep wchodzący w skład szczepionki namnaża się osobno na odpowiednim nośniku, a następnie szczepy miesza się ze szczepem *Xylaria* sp. nr KKP 2073p w określonym stosunku ilościowym przed inokulacją borówki amerykańskiej.

W przypadku gdy szczepionka zawiera szczep *Oidiodendron maius* UNIJAG.PL.368 i/albo *Phialocephala fortinii* UNIJAG.PL.382 i/albo *Hymenoscyphus* sp. UNIJAG.PL.391, nośnikiem do namnażania szczepu są otręby pszenne z domieszką ziemi okrzemkowej, najlepiej w proporcji objętościowej 4:1.

Otręby pszenne z domieszką ziemi okrzemkowej mogą być są sterylne.

Korzystnie, szczep *Oidiodendron maius* UNIJAG.PL.368 i/albo *Phialocephala fortinii* UNIJAG.PL.382 i/albo *Hymenoscyphus* sp. UNIJAG.PL.391 namnaża się najlepiej w ciemności, w temperaturze między 20°C a 30°C, korzystnie w 24°C, przez okres co najmniej 1 miesiąca.

Hymenoscyphus sp. (szczep UNIJAG.PL.391) został wyizolowany z borówki odmiany Bluehaven, *Oidiodendron maius* (szczep UNIJAG.PL.368) – odmiany P/14, *Phialocephala fortinii* (szczep UNIJAG.PL.382) – odmiany Pliszka. Rośliny do izolacji symbiontów pochodziły z plantacji

borówki amerykańskiej, charakteryzującymi się optymalnymi warunkami wzrostu (podłoże torfowe o odczynie kwaśnym). Z każdej rośliny losowo pobrano korzenie z otaczającym je podłożem. Następnie korzenie oczyszczono z substratu pod bieżącą wodą i umieszczono na szalkach. Wstępnej oceny kolonizacji mykoryzowej dokonano przy użyciu lupy binokularnej przy powiększeniu 10–40x. Wyselekcjonowane korzenie włosowate umieszczano na szkiełku podstawowym i przeznaczono do obserwacji mikroskopowych przy powiększeniu 100–400x. Fragmenty korzeni z widocznymi zwojami grzybni w komórkach przeznaczono do izolacji grzybów. Korzenie sterylizowano powierzchniowo przez 50 sekund w 75% etanolu, a następnie płukano 3x w sterylnej wodzie. Po osuszeniu na sterylnej bibule korzenie cięto na fragmenty ok. 3 mm długości i umieszczono na kroplach pożywki GelGro. Szalki umieszczono w ciemności w 27°C. Kultury grzybów sukcesywnie przenoszono na pożywkę PDA i hodowano w ciemności w 27°C.

Identyfikację gatunkową przeprowadzono w oparciu o obserwacje mikroskopowe oraz z wykorzystaniem technik biologii molekularnej (amplifikacja i sekwencjonowanie regionu ITS rDNA). Do ekstrakcji DNA pobrano i zhomogenizowano około 50 mg grzybni pochodzącej z czystych kultur. Izolację DNA przeprowadzono z wykorzystaniem zestawu odczynników EZ-10 Spin Column Fungal Genomie DNA Mini-Preps Kit (Bio Basic, Canada). Zawartość oraz czystość DNA została zweryfikowana metodą spektrofotometryczną. W przypadku niskiej wydajności izolacji DNA z wykorzystaniem w/w metody dokonano ponownej ekstrakcji DNA z wykorzystaniem odczynników DNAzy Plant Mini Kit (Qiagen) lub metodą tradycyjną z wykorzystaniem CTAB. Ekstrakty zanieczyszczone oczyszczono z wykorzystaniem 5 M NaCl oraz izopropanolu. Następnie zamplifikowano fragment ITS rDNA w reakcji PCR z zastosowaniem primerów ITS1F [Gardes i Bruns 1993] oraz ITS4 [White i in. 1990] i użyciem odczynników Maxima Hot Start Green PCR Master Mix (Thermo Scientific). Parametry PCR były następujące: wstępna denaturacja w 95°C przez 3 minuty; 35 cykli obejmujących kolejno denaturację w 95°C przez 30 sekund, przyłączanie starterów w 55°C przez 30 sekund i elongację w 72°C przez 45 sekund oraz końcowa elongacja w 72°C przez 5 minut. Obecność produktów PCR zweryfikowano w elektroforezie agarozowej. Produkty PCR były sekwencjonowane przez Macrogen z użyciem starterów ITS4 oraz ITS1. Sekwencje nukleotydów analizowano za pomocą programu Chromas [www.technelysium.com.au] oraz BioEdit oraz porównano z sekwencjami w bazie danych NCBI [www.ncbi.nlm.nih.gov] przy zastosowaniu algorytmu BLASTn. Wyniki identyfikacji molekularnej zostały przedstawione w tabeli 1.

Tabela 1

Wyniki identyfikacji molekularnej grzybów erikoidalnych

Szczep	Identyfikacja	Sekwencja referencyjna (NCBI)	Podobieństwo
UNIAG.PL.368	Oidiodendron maius	Oidiodendron maius KF359579.1	552/557 (99%)
UNIAG.PL.382	Phialocephala fortinii	Phialocephala fortinii AY394921.1	551/553(99%)
UNIAG.PL.391	Hymenoscyphus sp.	Hymenoscyphus sp. EU700265.1	449/460 (98%)

Wyniki analizy genetycznej odcinka ITS rDNA przedstawia SEQ ID NO.2 (szczep UNIAG.PL.368), SEQ ID NO.3 (szczep UNIAG.PL.382), SEQ ID NO.4 (szczep UNIAG.PL.391).

Sposób biotyzacji borówki amerykańskiej według wynalazku polega na tym, że borówkę amerykańską inokuluje się szczepionką zawierającą szczep rodzaju *Xylaria* sp. nr KKP 2073p, zdeponowany w Międzynarodowej Kolekcji Kultur Drobnoustrojów Przemysłowych Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego w Warszawie pod numerem KKP 2073p.

Korzystnie, borówkę amerykańską inokuluje się podczas hodowli *in vitro*.

Korzystnie, borówkę amerykańską inokuluje się podczas przenoszenia z hodowli *in vitro* do multidoniczek.

Borówkę amerykańską najefektywniej inokuluje się szczepionką podczas przenoszenia roślin z multidoniczek do większych doniczek.

Najefektywniej inokuluje się rośliny nie starsze niż jednoroczne.

Szczepionkę można dodawać do podłoża sterylnego albo niesterylnego. W korzeniach roślin nieinokulowanych rosnących na podłożu niesterylnym mogą pojawić się struktury mykoryzowe, których źródłem są grzybnia i zarodniki grzybów erikoidalnych występujące naturalnie w takim podłożu.

Podłoże może stanowić torf kwaśny o pH od 3.5 do 4.5, wymieszany z perlitem.

Najefektywniejszym podłożem jest torf kwaśny o pH od 3.5 do 4.5, wymieszany z perlitem w stosunku objętościowym 5:1.

Szczepionka i sposób przygotowania szczepionki oraz sposób biotyżacji borówki amerykańskiej według wynalazku mają duże możliwości komercyjnego zastosowania w produkcji materiału sadzeniowego, przyczyniając się do ograniczenia nawożenia mineralnego roślin i przede wszystkim zwiększenia jakości plonu.

Zaletą wynalazku jest fakt, że każdy szczep wchodzący w skład szczepionki jest hodowany osobno w warunkach *in vitro* na specjalnie opracowanym nośniku. Łączenie wszystkich składników szczepionki następuje tuż przed inokulacją roślin. Dzięki temu, że wszystkie organizmy wzrastają osobno, wzrasta pewność obecności żywej grzybni każdego ze szczepów szczepionki, co jest przewagą nad istniejącymi dotychczas na rynku rozwiązaniami, w których nie ma pewności, co do żywotności wszystkich komponentów szczepionki.

Szczepionka według wynalazku jest proponowana do stosowania w uprawie borówki amerykańskiej, w szczególności dla odmian: Bluecrop, Duke, Dorrow i Patriot.

Przykład I

Skład szczepionki stanowiły następujące szczepy grzybów: *Hymenoscyphus* sp. (szczep UNIJAG.PL.391), *Oidiodendron maius* (szczep UNIJAG.PL.368), *Phialocephala fortinii* (szczep UNIJAG.PL.382) oraz szczep rodzaju *Xylaria* sp. nr KKP 2073p w stosunku ilościowym 1:1:1:1.

Poszczególne szczepy grzybów przygotowano osobno na opracowanych nośnikach. Dla *Hymenoscyphus* sp., *O. maius* oraz *P. fortinii* nośnikiem grzybni były otręby pszenne z domieszką ziemi okrzemkowej w proporcji objętościowej 4:1. Nośnik o objętości 50 ml umieszczono w słoiku do hodowli *in vitro* o poj. 200 ml i poddano sterylizacji w 121°C przez 30 min. Następnie w warunkach sterylnych dodano sterylną wodę i umieszczono na nośniku 3 krążki grzybni z kilkudniowej hodowli na stałym podłożu PDA.

Inokulum namnażano w ciemności w 24°C przez okres co najmniej 1 miesiąca. Przed użyciem inokulum dodano do słoika 20–30 ml sterylnej wody i wytrząsano w celu ograniczenia ekspozycji na zarodniki grzybów podczas szczepienia roślin.

Szczep rodzaju *Xylaria* sp. nr KKP 2073p namnażano w płynnych kulturach w 2% pożywce maltozowej przez okres ok. 7 dni. Następnie grzybnię filtrowano, opłukiwano sterylną wodą, rozdrobniono i zawieszono w sterylnej wodzie. Szczepionkę płynną zawierającą nowy szczep rodzaju *Xylaria* sp. nr KKP 2073p aplikowano po dodaniu szczepionki zawierającej *Hymenoscyphus* sp. (szczep UNIJAG.PL.391), *Oidiodendron maius* (szczep UNIJAG.PL.368), *Phialocephala fortinii* (szczep UNIJAG.PL.382).

Rośliny borówki 'Bluecrop' inokulowano na etapie przenoszenia z hodowli *in vitro* do multidoniczek z torfem. Dawka inokulum stałego w przeliczeniu na jedną roślinę wyniosła 1-2 ml inokulum umieszczonego w dołku sadzeniowym lub wymieszanego z podłożem. Po posadzeniu roślin, podlano je. Szczepionkę dodano do podłoża, które stanowił niesterylny torf kwaśny pH 3.5–4.5 wymieszany z perlitem w stosunku objętościowych 5:1.

U borówki 'Bluecrop' inokulowanej podczas przenoszenia z hodowli *in vitro* do podłoża torfowego w multidoniczkach stwierdzono istotnie pozytywny wpływ szczepionki na świeżą masę roślin (wzrost o 60%), suchą masę (wzrost o 64%), powierzchnię liści (wzrost o 100%). Ponadto vitalność roślin określona na podstawie analizy fluorescencji chlorofilu a u tych roślin była lepsza od roślin kontrolnych (wzrost Performance Index Abs o 27%).

Przykład II

Skład szczepionki stanowiły następujące szczepy grzybów: *Hymenoscyphus* sp. (szczep UNIJAG.PL.391), *Oidiodendron maius* (szczep UNIJAG.PL.368), *Phialocephala fortinii* (szczep UNIJAG.PL.382) oraz szczep rodzaju *Xylaria* sp. nr KKP 2073p w stosunku ilościowym 1:1:1:1.

Poszczególne szczepy grzybów przygotowano osobno na opracowanych nośnikach. Dla *Hymenoscyphus* sp. *O. maius* oraz *P. fortinii* nośnikiem grzybni były otręby pszenne z domieszką ziemi okrzemkowej w proporcji objętościowej 4:1. Nośnik o objętości 50 ml umieszczono w słoiku do hodowli *in vitro* o poj. 200 ml i poddano sterylizacji w 121°C przez 30 min. Następnie w warunkach

sterylnych dodano sterylną wodę i umieszczono na nośniku 3 krążki grzybni z kilkudniowej hodowli na stałym podłożu PDA.

Inokulum namnażano w ciemności w 24°C przez okres co najmniej 1 miesiąca. Przed użyciem inokulum dodano do słoika 20–30 ml sterylnej wody i wytrząsano w celu ograniczenia ekspozycji na zarodniki grzybów podczas szczepienia roślin.

Szczep rodzaju *Xylaria* sp. nr KKP 2073p namnażano w płynnych kulturach w 2% pożywce maltozowej przez okres ok. 7 dni. Następnie grzybnię filtrowano, opłukiwano sterylną wodą, rozdrobniono i zawieszono w sterylnej wodzie. Szczepionkę płynną zawierającą nowy szczep rodzaju *Xylaria* sp. nr KKP 2073p aplikowano po dodaniu szczepionki zawierającej *Hymenoscyphus* sp. (szczep UNIJAG.PL.391), *Oidiodendron maius* (szczep UNIJAG.PL.368), *Phialocephala fortinii* (szczep UNIJAG.PL.382).

Rośliny borówki 'Duke' inokulowano na etapie przenoszenia z multidoniczek do większych doniczek przez umieszczenie inokulum w podłożu przed przesadzeniem roślin. Dawka inokulum stałego w przeliczeniu na jedną roślinę przesadzaną do doniczki o pojemności 0.5–1 L wyniosła 5 ml inokulum wymieszanego w podłożem.

Po posadzeniu roślin, podlano je. Szczepionkę dodano do podłoża, które stanowił sterylny torf kwaśny pH 3.5–4.5 wymieszany z perlitem w stosunku objętościowych 5:1. Zastosowanie podłoża sterylnego (121°C, 30 min) wymagało wysuszenia go w temperaturze 100°C (1 h przez 3 dni) oraz zraszania na bibule przez okres 2 tygodni.

Borówki 'Duke' inokulowane szczepionką charakteryzowały się statystycznie większą wysokością części nadziemnej (wzrost o 13%), biomasą części nadziemnej (wzrost o 21%) oraz wielkością liści (wzrost o 62%).

LISTA SEKWENCJI

<110> Uniwersytet Jagielloński
 <120> Szczepionka, sposób przygotowania szczepionki oraz sposób biotyzacji borówki amerykańskiej.
 <130> 705682
 <160> 4
 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1
 <211> 564
 <212> DNA
 <213> Xylaria sp. KKP2073p

<400> 1
 gaagtaaaag tcgtaacaag gtttccgttg gtgaaccagc ggagggatca ttaaagagtt 60
 ctataactcc caaacccatg tgaacatacc ttacgttgcc tcggcaggtc gtgcctaccc 120
 cgtagcgtcc taccctgtag gacctaccg gtagacgcgg gtaagcctgc cggcggccca 180
 cgaaactctg tttagtattg aattctgaac ctataactaa ataagttaa actttcaaca 240
 acggatctct tggttctggc atcgatgaag aacgcagcga aatgcgataa gtaatgtgaa 300
 ttgcagaatt cagtgaatca tcgaatcttt gaacgcacat tgcgcccatt agtattctag 360
 tgggcatgcc tgttcgagcg tcatttccaa cccttaagcc cctgttgctt agtgttggga 420
 gcctacggta atagtagctc ctgaaagtta gtggcggagt cggttcacac tctagacgta 480
 gtagatttta tctcgctat cagttggacc ggtcccttgc cgtaaaacca cctaattcta 540
 aaggtgacct cgatcagaag aacc 564

<210> 2
 <211> 552
 <212> DNA
 <213> Oidiodendron maius UNIJAG.PL.368
 <400> 2

tgatccgagg tcaaccacag agttgggggg ttctggcagg ctgccgccgg accctggagc 60
 gagagctgta ctacgctgag ggccaggcgg cgccgccact atctttaggg ccggccgcgg 120
 cgggcagggc ccaacaccaa gcgaggcttg agggttgaaa tgacgctcga acaggcatgc 180
 cctgcggaat accacagggc gcaatgtgcg ttcaaagatt cgatgactca ctgaattctg 240
 caattcgc at tacttatcgc atttcgctgc gttcttcac gatgccagaa ccaagagatc 300

cgttggtgaa agttttaacg attatatagt tactcggacg acactaacat tcagagtctg 360
 tgaggctctt ggcgggcacg cgccagccgg ggccggcggc cgggcagggc ccagcggccc 420
 gccaaagcaa cgagagtagt gataacagtg ggtgggagat ctacccggag ggcatgaact 480
 ctgtaatgat ccctccgag gttcacctac ggagaccttg ttacgacttt tacttcctct 540
 aatgaccaa ga 552

<210> 3

<211> 562

<212> DNA

<213> *Phialocephala fortinii* UNIJAG.PL.382

<400> 3

cctgatccga ggtcaacctg taaaaattgg gggttctggc gagccaccgg gggaaactcta 60
 tagcgggagt atgtactacg cttagagccc accggcgccg ccactaattt tgagggccgc 120
 ggagacccgc gtgcccnaat accacgctag gcgtgagtgg ttaaagtacg ctcgaacagg 180
 catgccctgc ggaataccac agggcgcaat gtgcgttcaa agattcgatg attcactgaa 240
 ttctgcaatt cacattactt atcgatttc gctgcgttct tcatcgatgc cagaaccaag 300
 agatccgttg ttgaaagttt taactattat atagtactca gacatcacta acattcagag 360
 tttggttctc tggcgggcac acacgagcag agccccagat ggaggccacg gcccgccaaa 420
 gcaacaatag tatgtaaaca cgggtgggtg taagctccta accgctgttt ccaacgttcg 480
 gtagcctcac ttgtaatgat ccttccgag gttcacctac ggaaaccttg ttacgacttt 540
 tacttcctct aatgaccaa ga 562

<210> 4

<211> 540

<212> DNA

<213> *Hymenoscyphus* sp. UNIJAG.PL.391

<400> 4

atccgaggtc aaccgtgaga ttgggggttg atggcaagca tccaccggga accctatagc 60
 gaggagtatt actacgctta gagccagatg gcgccccac tgattttaag ggccgcggga 120
 ccgcggaccc caacaccaag ccgggcttga gtggtcataa tgacgctcga acaggcatgc 180
 ccctcggaat accaaggggc gcaatgtgcg ttcaaagatt cgatgattca ctgaattctg 240

caattcacat tacttatcgc atttcgcctgc gttcttcatc gatgccagaa ccaagagatc	300
cgttgttgaa agttttaact attatatagt actcagacat cactaaacaa aagagtttgg	360
gtcctctggc gggcacagcc agccgaagcc gacacgcgaa cgtggccccgc caaagcaaca	420
aaggtaaggt attcaagggt gggagatcta cccgtgaggg catgaactct gtaatgatcc	480
ttccgcaggt tcacctacgg aaaccttggt acgactttta cttcctctaa atgaccaaga	540

Zastrzeżenia patentowe

1. Szczepionka do biotyzacji borówki amerykańskiej, zawierająca szczep rodzaju *Xylaria* sp. nr KKP 2073p, zdeponowany w Międzynarodowej Kolekcji Kultur Drobnoustrojów Przemysłowych Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego pod numerem KKP 2073p.
2. Szczepionka według zastrz. 1, **znamienna tym**, że zawiera co najmniej jeden szczep należący do grzybów erikoidalnych.
3. Szczepionka według zastrz. 2, **znamienna tym**, że zawiera grzyby szczepu *Oidiodendron maius* UNIJAG.PL.368 i/albo *Phialocephala fortinii* UNIJAG.PL.382 i/albo *Hymenoscyphus* sp. UNIJAG.PL.391.
4. Szczepionka według zastrz. 3, **znamienna tym**, że zawiera szczepy *Xylaria* sp. nr KKP 2073p, *Oidiodendron maius* UNIJAG.PL.368, *Phialocephala fortinii* UNIJAG.PL.382, *Hymenoscyphus* sp. UNIJAG.PL.391 w stosunku ilościowym 1:1:1:1.
5. Sposób przygotowania szczepionki do biotyzacji borówki amerykańskiej, **znamienna tym**, że szczep rodzaju *Xylaria* sp. nr KKP 2073p, zdeponowany w Międzynarodowej Kolekcji Kultur Drobnoustrojów Przemysłowych Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego pod numerem KKP 2073p namnaża się w płynnym nośniku, korzystnie w 2% pożywce maltozowej, przez okres co najmniej 5 dni, a korzystnie 7 dni, po czym grzybnię oddziela się od nośnika.
6. Sposób według zastrz. 5, **znamienny tym**, że każdy szczep wchodzący w skład szczepionki namnaża się osobno na odpowiednim nośniku, a następnie szczepy miesza się ze szczepem rodzaju *Xylaria* sp. nr KKP 2073p w określonym stosunku ilościowym przed inokulacją borówki amerykańskiej.
7. Sposób według zastrz. 6, **znamienny tym**, że w przypadku gdy szczepionka zawiera szczep *Oidiodendron maius* UNIJAG.PL.368 i/albo *Phialocephala fortinii* UNIJAG.PL.382 i/albo *Hymenoscyphus* sp. UNIJAG.PL.391, nośnikiem do namnażania są otręby pszenne z domieszką ziemi okrzemkowej, korzystnie w proporcji objętościowej 4:1
8. Sposób według zastrz. 7, **znamienny tym**, że otręby pszenne z domieszką ziemi okrzemkowej są sterylne.
9. Sposób według zastrz. 7 albo 8, **znamienny tym**, że szczep *Oidiodendron maius* UNIJAG.PL.368 i/albo *Phialocephala fortinii* UNIJAG.PL.382 i/albo *Hymenoscyphus* sp. UNIJAG.PL.391 namnaża się w ciemności, w temperaturze między 20°C a 30°C, korzystnie 24°C, przez okres co najmniej 1 miesiąca.
10. Sposób biotyzacji borówki amerykańskiej, **znamienny tym**, że borówkę amerykańską inokuluje się szczepionką określoną w którymkolwiek z zastrz. od 1 do 4.
11. Sposób według zastrz. 10, **znamienny tym**, że borówkę amerykańską inokuluje się podczas hodowli *in vitro*.
12. Sposób według zastrz. 10, **znamienny tym**, że borówkę amerykańską inokuluje się podczas przenoszenia z hodowli *in vitro* do multidoniczek.
13. Sposób według zastrz. 10, **znamienny tym**, że borówkę amerykańską inokuluje się podczas przenoszenia z multidoniczek do większych doniczek

14. Sposób według zastrz. 13, **znamienny tym**, że inokuluje się rośliny nie starsze niż jedno-
roczne.
15. Sposób według zastrz. 11 albo 12 albo 13 albo 14, **znamienny tym**, że szczepionkę dodaje
się do podłoża sterylnego albo niesterylnego.
16. Sposób według zastrz. 15, **znamienny tym**, że podłożem jest torf kwaśny o pH od 3.5 do
4.5 wymieszany z perlitem.
17. Sposób według zastrz. 16, **znamienny tym**, że torf kwaśny o pH od 3.5 do 4.5 jest wymie-
szany z perlitem w stosunku objętościowym 5:1.