

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 246248 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **444472**

(22) Data zgłoszenia: **2023.04.18**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2024.03.25 BUP 13/2024**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2024.12.23 WUP 52/2024**

(51) MKP:

C12N 1/20 (2006.01)

C12R 1/01 (2006.01)

A01N 63/20 (2020.01)

C05F 11/08 (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIwersytet Mikołaja Kopernika
w Toruniu, Toruń, PL**

(72) Twórca(-y) wynalazku:

**SWETA BINOD KUMAR, Toruń, PL
AGNIESZKA KALWASIŃSKA, Zławieś Mała, PL
MARIA SWIONTEK BRZEZIŃSKA, Rozgarty, PL
MONIKA WRÓBEL, Toruń, PL**

(74) Pełnomocnik:

**rzecz. pat. Magdalena Filipek-Marzec,
Katowice, PL**

Uwaga: Wykaz sekwencji w postaci elektronicznej jest dostępny
na stronie internetowej Urzędu Patentowego RP

(54) Tytuł:

Szczep bakterii Agrobacterium sp. Azo12, biomasa do uprawy pszenicy i sposób jej otrzymywania, biopreparat do uprawy pszenicy i sposób jej otrzymywania z udziałem szczepu Agrobacterium sp. Azo12, przeznaczony dla uprawy pszenicy w warunkach normalnych oraz w warunkach stresu solnego

PL 246248 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest szczep bakterii *Agrobacterium* sp. Azo12, biomasa do uprawy pszenicy i sposób jej otrzymywania, biopreparat do uprawy pszenicy i sposób jej otrzymywania z udziałem szczepu *Agrobacterium* sp. Azo12, przeznaczony dla uprawy pszenicy w warunkach normalnych oraz w warunkach stresu solnego.

Wykorzystywane przez rolników chemiczne środki ochrony roślin oraz stosowanie nieodpowiednich metod uprawy, przyczynia się do ograniczania rozwoju i wzrostu roślin. W odpowiedzi na ten fakt, w krajach Unii Europejskiej wprowadzono przepisy, mówiące m.in., o tym, że nad środki chemiczne należy przekładać biologiczne środki ochrony roślin, aby w możliwie naturalny sposób wspomagać wzrost upraw (art. 14 dyrektywy 2009/128/WE oraz rozporządzenia nr 1107/2009). Przyczyniło się to do wzrostu zainteresowania badaczy ryzobakteriami promującymi wzrost roślin (PGPR-plant growth – promoting rhizobacteria), czyli mikroorganizmami wywołującymi korzystny wpływ na wzrost i rozwój roślin. Do tej grupy należy wiele rodzajów bakterii, które wpływają bezpośrednio lub pośrednio na zdrowie roślin oraz żyzność gleby. Stosowanie środków kontroli biologicznej wydaje się być bezpieczną i atrakcyjną alternatywą, która może zastąpić wkład chemikaliów w sektorze rolnictwa (Kosicka, D., Wolna-Maruwka, A., & Trzeciak, M. (2015). Wpływ preparatów mikrobiologicznych na glebę oraz wzrost i rozwój roślin. *Kosmos*, 2(64), 327–335). Do zalet stosowania preparatów na bazie drobnoustrojów należą, zwiększenie efektywności nawożenia mineralnego, obniżenie kosztów produkcji rolniczej na skutek racjonalnego wykorzystania nawozów, jak również zmniejszenie zużycia chemicznych środków ochrony, co prowadzi do poprawy kondycji środowiska naturalnego. Niewątpliwą zaletą tego typu środków jest małe prawdopodobieństwo, by szkodniki, grzyby czy chwasty nabyły na nie odporności. Dlatego warto się nimi zainteresować w kontekście budowania strategii antyodpornościowej, która silnie związana jest z integrowaną ochroną roślin. Dzisiejsze rolnictwo opiera się biopreparatach zawierających różne mikroorganizmy (np. *Bacillus subtilis* GB03, *Pseudomonas aureofaciens* TX-1 i *Streptomyces griseoviridis* K61), które są sprzedawane pod różnymi nazwami handlowymi (Copping, L. G. (2004). *The manual of biocontrol agents*. British Crop Protection Council). Mikroorganizmy te nie tylko poprawiają wzrost roślin, ale także hamują rozwój fitopatogenów grzybowych poprzez wytwarzanie grzybobójczych enzymów np. chitynaz (Swiontek Brzezinska, M., Jankiewicz, U., Burkowska, A., & Walczak, M. (2014). Chitinolytic microorganisms and their possible application in environmental protection. *Current microbiology*, 68, 71–81) czy 1,3 β -glukanaz (Lora, J. M., De la Cruz, J., Llobell, A., Benitez, T., & Pintor-Toro, J. A. (1995). Molecular characterization and heterologous expression of an endo- β -1, 6-glucanase gene from the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum*. *Molecular and General Genetics* MGG, 247, 639–645).

Biopreparaty wyprodukowane z wykorzystaniem żywych mikroorganizmów są produktami zawierającymi różnego rodzaju mikroorganizmy (bakterie i grzyby) stymulujące wzrost i plonowanie roślin. W tej grupie znajdują się także preparaty mikrobiologiczne będące szczepionkami, zawierającymi żywe mikroorganizmy zwalczające patogeny roślinne, a także symbiotyczne wspomagające wzrost i plonowanie roślin. Niezwykle ważne jest, aby takie biopreparaty były tworzone na bazie starannie dobranych szczepów mikroorganizmów izolowanych z naturalnych i antropogenicznych środowisk.

Celem wynalazku jest opracowanie takiego nowego sposobu otrzymywania biopreparatu szczepu bakterii *Agrobacterium* sp. Azo12 oraz biopreparatu szczepu szczepu *Agrobacterium* sp. Azo12, który pozwoli na zastosowanie ich do promowania wzrostu pszenicy, w szczególności dla uprawy pszenicy w warunkach normalnych oraz w warunkach stresu solnego. Biopreparat ma zastosowanie się w rolnictwie, do poprawy wzrostu pszenicy w glebach niezasolonych oraz zasolonych. Biopreparat użyty do inokulacji pszenicy (*Triticum aestivum* L.) ozimej odmiany Ostroga w warunkach laboratoryjnych i w warunkach polowych stymuluje wzrost i rozwój siewek tej jednoliściennej rośliny.

Istotą wynalazku jest szczep bakterii *Agrobacterium* sp. Azo12 zdeponowany w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM) w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu pod numerem PCM B/00457, do zastosowania w promowaniu wzrostu pszenicy. Istotą wynalazku jest także szczep bakterii *Agrobacterium* sp. Azo12 zdeponowany w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM) w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu pod numerem PCM B/00457 o sekwencji nukleotydowej nr 1. Istotą wynalazku jest także szczep bakterii *Agrobacterium* sp. Azo12 zdeponowany w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM) w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu pod numerem PCM B/00457 jak określono w zastrz. 1 do zastosowania jako biopreparat dla uprawy pszenicy. Istotą wynalazku jest także szczep bakterii *Agrobacterium* sp. Azo12

zdeponowany w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM) w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu pod numerem PCM B/00457 jak określono w zastrz. 2 do zastosowania jako biopreparat dla uprawy pszenicy.

Istotą wynalazku jest także biomasa do uprawy pszenicy, która zawiera odtłuszczone mleko w proszku w ilości od 8 do 12% korzystnie 10% (m/v) i od 10^{10} do 10^{12} jtk/g korzystnie 10^{11} jtk/g komórek szczepu bakterii *Agrobacterium* sp. Azo12 zdeponowanego w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM) w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu pod numerem PCM B/00457.

Istotą wynalazku jest także biopreparat do uprawy pszenicy, który zawiera odtłuszczone mleko w proszku w ilości od 0,0008 do 0,0012% korzystnie 0,001% (m/v), od 10^6 do 10^8 jtk/g korzystnie 10^7 jtk/g szczepu bakterii *Agrobacterium* sp. Azo12 zdeponowanego w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM) w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu pod numerem PCM B/00457, wodę korzystnie odchlorowaną gdzie na każdy litr wody ilość roztworu odtłuszczonego mleka w proszku z komórkami szczepu bakterii wynosi od 0,008 do 0,012 ml.

Istotą wynalazku jest także sposób otrzymywania biomasy do uprawy pszenicy polegający na tym, że roztwór odtłuszczonego mleka w proszku w ilości od 8 do 12% korzystnie 10% (m/v) i od 10^{11} do 10^{12} jtk/g korzystnie 10^{11} jtk/g szczepu bakterii *Agrobacterium* sp. Azo12 zdeponowanego w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM) w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu pod numerem PCM B/00457 miesza się korzystnie w czasie od 3 do 5 minut, korzystnie w temperaturze otoczenia najkorzystniej w zakresie 20–22°C.

Istotą wynalazku jest także sposób otrzymywania biopreparatu do uprawy pszenicy polegający tym, że biomasę zawierającą odtłuszczone mleko w proszku w ilości od 8 do 12% korzystnie 10% (m/v) i od 10^{10} do 10^{12} korzystnie 10^{11} komórek szczepu bakterii *Agrobacterium* sp. Azo12 zdeponowanego w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM) w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu pod numerem PCM B/00457 miesza się z wodą korzystnie odchlorowaną w czasie od 15 do 20 minut, korzystnie w temperaturze otoczenia, najkorzystniej w zakresie 20–22°C, i mrozi korzystnie w temperaturze od -75 do -80°C najkorzystniej w czasie od 24 do 26 godzin, a następnie liofilizuje.

W postaci stałej biomasy (liofilizat) komórki zawieszono w odtłuszczonego mleka w proszku, zamrożono, a następnie liofilizowano. Biopreparat uzyskuje się poprzez rozcieńczenie biomasy wodą bezpośrednio przed jego aplikacją do gleby.

Opis wynalazku został ujawniony w przykładach oraz na rysunkach i tabelach, które przedstawiają:

Tab. 1 Właściwości promujące wzrost roślin szczepu *Agrobacterium* sp. Azo12 oraz tolerancja na zasolenie

Tab. 2 Wpływ szczepu *Agrobacterium* sp. Azo12 na kiełkowanie pszenicy w warunkach sterylnych

Tab. 3 Wykrywanie genów patogeniczności

Tab. 4 Wpływ szczepu *Agrobacterium* sp. Azo12 na długość (cm) korzenia i liścia siewek pszenicy w warunkach polowych

Tab. 5 Wpływ szczepu *Agrobacterium* sp. Azo12 na masę (g) korzenia i liścia siewek pszenicy w warunkach polowych

Tab. 6 Liczebność bakterii *Agrobacterium* sp. Azo12 w biomasie

Rys. 1 Wpływ zasolenia na kiełkowanie pszenicy. Różne litery oznaczają różnice istotne statystycznie ($p < 0.05$). Wyniki do przykładu II

Rys. 2 Wpływ biopreparatu zawierającego *Agrobacterium* sp. Azo12 na kiełkowanie i wzrost siewek pszenicy a) Warunki bez zasolenia b) Warunki stresu solnego

Rys. 3 Stężenie MDA w tkankach liści siewek pszenicy (wartość mediany, N=9)

Rys. 4 Stężenie proliny w tkankach liści siewek pszenicy (wartość średnia, N=9)

Przykład I. Szczep bakterii *Agrobacterium* sp. Azo12 posiada wiele cech bakterii promujących wzrost roślin takie jak zdolność do wiązania azotu atmosferycznego, rozkładu białek z wydzielaniem amoniaku, produkcji fitohormonu roślinnego (IAA), rozkładu ACC oraz właściwości przeciwgrzybowe. Żywe komórki *Agrobacterium* sp. Azo12, użyte do inokulacji pszenicy ozimej (*Triticum aestivum* L.) stymulowały kiełkowanie i wzrost siewek tej jednoliściennej rośliny w warunkach laboratoryjnych, zarówno w warunkach bez zasolenia, jak i w warunkach stresu solnego. Szczep posiada stosunkowo wysoką tolerancję na zasolenie i charakteryzuje się wieloma cechami odpowiedzialnymi za promowanie wzrostu

siewek pszenicy, zarówno w warunkach bez zasolenia, jak i w warunkach stresu solnego. *Agrobacterium* sp. Azo12 ma zastosowanie w rolnictwie, do stymulacji i poprawy wzrostu pszenicy w glebach niezasolonych oraz zasolonych.

Izolacja i charakterystyka bakterii

Szczep *Agrobacterium* sp. Azo12 został wyizolowany z gleby technogennej, czarne ziemie które uległy technogenicznemu zasoleniu oraz sodyfikacji.

W tym celu 5 g gleby wprowadzono do 45 ml sterylnego podłoża o składzie (g/l): mannitol 20.00, $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 0.10, $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ 0.10, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ 0.005, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ 0.4, $\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 12.6, $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, CaCO_3 5.00 g, NaCl 15, woda demineralizowana do 1000 ml (pH podłoża 8.5) i wytrząsano przez 20 minut na wytrząsarce orbitalnej. Następnie podłoże umieszczono w cieplarni w temp. 26°C i pozostawiono na 72 h w celu namnożenia bakterii potencjalnie wiążących azot. Po oznaczonym czasie wykonano serię dziesięciokrotnych rozcieńczeń i 1 ml każdego rozcieńczenia wysiewano na podłoże stałe o składzie jak wyżej z dodatkiem agaru (0.15%, m/v) stosując metodę wgłębną. Wysiewy inkubowano 7 dni w temperaturze 26°C.

Wyroste kolonie pasażowano dalej 3-krotnie stosując podłoże stałe o składzie podanym wyżej.

W celu dodatkowej weryfikacji czystości hodowli wykonano dodatkowo barwienie Grama. W tym celu na szkiełku podstawowym wykonano rozmaz z 24-h hodowli szczepu który następnie utrwalono w płomieniu palnika gazowego i barwiono stosując następujące barwniki: fiolet krystaliczny (czas barwienia 4 minuty) i safraninę (czas barwienia 2 minuty) oraz płyn Lugola jako bejcę (czas działania 3 minuty) i alkohol etylowy (75%, v/v) jako odbarwiacz. Badanie to potwierdziło obecność jednorodnych pod względem morfologii komórek w obrazie mikroskopowym.

Molekularna identyfikacja szczepu

Identyfikację badanego szczepu wykonano w oparciu o sekwencję genu 16SrRNA.

W przypadku identyfikacji z wykorzystaniem sekwencji 16SrRNA fragment tego genu amplifikowano z całkowitego DNA genomowego z użyciem starterów 27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') (Lane DJ. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In Stackebrandt E, Goodfellow M (ed), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley, NewYork, NY) oraz 1492R (5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3') (Polz MF, Cavanaugh CM. 1998. Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR. *Appl Environ Microbiol* 64:3724–3730). Skład mieszaniny reakcyjnej był następujący: Color Taq Polymerase (EURx, Gdańsk, Polska, 1,25 U), mieszanina deoksyrybonukleotydów (0,2 mM każdy), 10 x Pol Buffer B (1.5 mM), startery (0.25 μM każdy), genomowe DNA (<0,25 μg w końcowej objętości 25 μl).

Program temperaturowy obejmował denaturację wstępną w temperaturze 95°C przez 3 minuty oraz 30 cykli trzech następujących po sobie procesów: denaturacji (95°C przez 30 s), przyłączenia starterów (52°C przez 20 s) oraz wydłużania (72°C przez 1 min 40 s) a także końcowe wydłużanie w temperaturze 72°C przez 5 minut.

Jakość uzyskanego produktu PCR, wybarwionego Midori Green oceniano na podstawie jego obrazu w żelu agarozowym (1%). A następnie produkt sekwencjonowano z wykorzystaniem obydwu primerów (27F oraz 1492R) za pomocą zestawu odczynników BigDye Terminator v 3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) według instrukcji dostarczonej przez producenta.

Elektroforezę kapilarną produktów sekwencjonowania wykonano w Pracowni Sekwencjonowania i Syntezy Oligonukleotydów IBB PAN w Warszawie. Sekwencję genu 16SrRNA przedstawiono na rys. 5.

W celu ustalenia przynależności taksonomicznej wykorzystano internetową platformę EzBioCloud zawierającą zwalidowane sekwencje genu 16SrRNA z przypisaną taksonomią (Yoon SH, Ha SM, Kwon S, Lim J, Kim Y, Seo H, Chun J. 2017. Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *IntJ Syst Evol Microbiol*, 67(5): 1613–1617).

Charakterystyka właściwości promujących wzrost roślin oraz tolerancja na zasolenie

Wiązanie wolnego azotu

Bakterie wiążące azot atmosferyczny to szczególna grupa mikroorganizmów, która umożliwia zwiększenie w glebie puli łatwo przyswajalnego dla roślin azotu amonowego wykorzystując wolny azot z powietrza atmosferycznego. Wiązanie azotu atmosferycznego umożliwia enzym bakteryjny – nitroge-

naza. Gen *nifH*, kodujący jedną z podjednostek nitrogenazy, jest jednym z ważniejszych markerów pozwalających wyróżnić bakterie wiążące azot spośród ogółu innych mikroorganizmów, nie posiadających tej zdolności (Raymond J, Siefert JL, Staples CR, Blankenship RE. 2004. The natural history of nitrogen fixation. *Mol Biol Evol*, 21(3):541–54).

Amplifikacja i identyfikacja genu *nifH*

W celu stwierdzenia potencjalnych możliwości badanego szczepu do wiązania azotu atmosferycznego na podstawie obecności genu *nifH* fragment tego genu amplifikowano za pomocą starterów PolF (5' TGCGAYCCSAARGCBGACTC 3') i PolR (5' ATSGCCATCATYTCRCCGGA 3') (Mehta MP, Baross JA. 2006. Nitrogen fixation at 92°C by a hydrothermal vent archaeon. *Science*, 314:1783–1786). Kontrolę pozytywną w tej reakcji stanowiło DNA genomowe *Azotobacter vinelandii* DSM 85. Pozyskany ampikon (362 pary zasad) sekwencjonowano za pomocą tej samej pary starterów z wykorzystaniem zestawu odczynników BigDye Terminator v 3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) według instrukcji dostarczonej przez producenta. Elektroforezę kapilarną produktów sekwencjonowania wykonano w Pracowni Sekwencjonowania i Syntezy Oligonukleotydów IBB PAN w Warszawie. Wyniki sekwencjonowania przedstawiono na rys. 6:

Sekwencję tę następnie zidentyfikowano z wykorzystaniem programu BLAST (BLASTN v 2.13.0+) dostępnego w NCBI.

Wynik identyfikacji genu *nifH* *Agrobacterium* sp. Azo12.

Sekwencja nukleotydowa nr 1 przedstawia rys. 7.

Aktywność nitrogenazy

W celu określenia aktywności nitrogenazy szczep *Agrobacterium* sp. Azo12 hodowano przez 7 dni w temperaturze 26°C na płynnym podłożu bezazotowym JMV (Baldani JI, Reis VM, Videira SS i wsp. 2014. The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists. *Plant Soil* 384, 413–431). Do hodowli użyto fiolek szklanych o pojemności 15 ml (Sigma-Aldrich, USA) zamykanych szczelnie korkiem z gumową septą. Następnie, 10% powietrza w butelce zastąpiono acetylenem i butelki inkubowano przez kolejne 60 min w temperaturze pokojowej. Po tym czasie reakcję zastopowano za pomocą 0.1 ml 6N H₂SO₄. Stężenie powstałego etylenu mierzono na chromatografii gazowej (Perkin-Elmer, Montreal, QC, Kanada) wyposażonym w detektor płomieniowo-jonizacyjny (FID) oraz kolumnę RTQ-PLOT (Restek, Bellefonte, PA, USA) 0.5 mm, 30 m. Doświadczenie prowadzono w trzech równoległych powtórzeniach w trzech wariantach zasolenia (0.5%, 1%, 2% NaCl). Za miarę aktywności nitrogenazy (U) przyjmowano ilość wydzielonego etylenu wyrażoną w nmol/ml/h.

Rozkład białka z wydzieleniem amoniaku (amonifikacja)

W celu określenia zdolności do rozkładu białka z wydzieleniem amoniaku 5 ml wody peptonowej o składzie (g/l): pepton 1, NaCl 8.5, woda destylowana 1000 ml (pH 7.0 ± 0.2) szczepiono zawiesiną komórek badanego szczepu w ilości 0.5 ml (10⁷ komórek/ml) i inkubowano 7 dni w temperaturze 26°C. Ilość powstałego amoniaku określano z wykorzystaniem gotowego zestawu odczynników Ammonia Assay Kit (Merck, Rahway, USA). Stężenie amoniaku badano spektrofotometrycznie w aparacie SpectraMax iD3 Multi-Mode Microplate Reader (Molecular Devices, San Jose, CA, USA) przy długości fali λ_{ex} 360/λ_{em} 450 nm. Stężenie amoniaku wyrażano w μmol/ml. Doświadczenie prowadzono w trzech równoległych powtórzeniach.

Produkcja fitohormonu (kwasu indolilo-3-octowego, indole-acetic acid, IAA)

IAA to ważny hormon regulujący wzrost i rozwój roślin. Hormon ten wpływa na podziały i wydłużanie się komórek, różnicowanie się naczyń, grawitropizm i fototropizm. Jest produkowany w roślinie i może być również syntetyzowany przez niektóre mikroorganizmy. IAA wytwarzany przez mikroorganizmy może wspierać wzrost roślin (Chandra S, Askari K, Kumari M. 2018. Optimization of indole acetic acid production by isolated bacteria from *Stevia rebaudiana* rhizosphere and its effects on plant growth, *J Gen Engin Biot*, 16(2): 581–586).

W celu określenia produkcji IAA, szczep *Agrobacterium* sp. Azo12 namnożono w 5 ml podłoża Dworkin i Foster (DF) z dodatkiem L-tryptofanu (5 mM) w temperaturze 26°C. Skład podłoża DF był następujący (g/l): KH₂PO₄ 4.0, Na₂HPO₄ 6.0, MgSO₄ x 7H₂O 0.2, glukoza 2.0, kwas glukonowy 2.0, kwas cytrynowy 2.0, pierwiastki śladowe (mg/l): FeSO₄ x 7H₂O 1, H₃BO₃ 10, MnSO₄ x H₂O 11.19, ZnSO₄ x 7H₂O 124.6, CuSO₄ x 5H₂O 78.22, MoO₃ 10 mg, pH 7.2).

Następnie 1 ml 7-dniowej hodowli bakteryjnej wirowano przez 5 min (10 000 x g) a pozyskany supernatant mieszano w stosunku 1:4 z odczynnikiem Salkowskiego (0.5M FeCl₃ + 70% chlorowodorowy), pozwalającym na wykrycie związków indolowych. Stężenie IAA mierzono spektrofotometrycznie w aparacie SpectraMax iD3 Multi-Mode Microplate Reader (Molecular Devices, San Jose, CA, USA) przy długości fali 535 nm względem krzywej wzorcowej zawierającej IAA jako standard (Sigma-Aldrich, USA). Stężenie IAA wyrażano w µg/ml.

Aktywność deaminazy ACC

Kwas 1-aminocyklopropano-1-karboksylowy (ACC) jest bezpośrednim prekursorem ważnego hormonu roślinnego – etylenu. Etylen wpływa na rozwój oraz wzrost roślin, m.in. na starzenie się kwiatów, dojrzewanie owoców i kiełkowanie nasion. Etylen jest ważny dla wzrostu rośliny, lecz jego nadmiar może doprowadzić nawet do ich uszkodzenia. Niektóre mikroorganizmy wspomagające wzrost roślin potrafią obniżać poziom etylenu w roślinie hydrolizując ACC (prekursor etylenu) na skutek działania enzymu deaminazy ACC (Gupta S, Pandey S. 2019. ACC deaminase producing bacteria with multifarious plant growth promoting traits alleviates salinity stress in french bean (*Phaseolus vulgaris*) Plants Front Microbiol, 9; 10:1506). W wyniku aktywności tego enzymu z ACC powstaje amoniak oraz ketomaślan.

W celu określenia aktywności deaminazy ACC produkowanej przez szczep *Agrobacterium* sp. Azo12 wykorzystano 42-godziną hodowlę tego szczepu na podłożu DF (patrz punkt 3.2). Za miarę aktywności deaminazy (U) przyjęto ilość wytworzonego ketomaślanu wyrażoną w nmol/ml/h. Ilość wytworzonego ketomaślanu określano spektrofotometrycznie w aparacie SpectraMax iD3 Multi-Mode Microplate Reader (Molecular Devices, San Jose, CA, USA) przy długości fali 540 nm względem krzywej wzorcowej zawierającej α-ketomaślan jako standard (Sigma-Aldrich, USA).

Aktywność przeciwgrzybowa

Hamowanie rozwoju patogenów grzybowych na podłożu PDA

Niektóre bakterie promujące wzrost roślin wykazują zdolność hamowania wzrostu patogenów grzybowych, wydzielając enzymy, głównie β-1,3-glukanazy i chitynazy, odpowiedzialne za rozkład ściany komórkowej pełniące funkcje ochronne (Jha Y, Dehury B, Kumar SPJ, Chaurasia A, Singh UB, Yadav MK, Angadi UB, Ranjan R, Tripathy M, Subramanian RB, Kumar S, Simal-Gandara J. 2022. Delineation of molecular interactions of plant growth promoting bacteria induced β-1,3-glucanases and guanosine triphosphate ligand for antifungal response in rice: a molecular dynamics approach. Mol Biol Rep, 49(4):2579–2589). W celu określenia aktywności przeciwgrzybowej szczepu *Agrobacterium* sp. Azo12 użyto następujących fitopatogenów grzybowych (wzorcowych) pozyskanych z Banku Patogenów Instytutu Roślin i Badania ich Bioróżnorodności w Poznaniu: *Colletotrichum acutatum* 1202, *Rhizoctonia solani* 2349, *Alternaria brassicae* 2233, *Alternaria radicina* 1695, *Penicillium verrucosum* 1681, *Cladosporium cladosporioides* 2427, *Fusarium oxysporum* 872, *Fusarium solani* 25, *Fusarium culmorum* 2333, *Botrytis cinerea* 873.

Wstępnie, każdy fitopatogen grzybowy wysiano osobno na podłożu PDA i inkubowano przez 7 dni w 26°C. Po uzyskaniu obfitej biomasy grzybni użyto jej do oznaczenia aktywności przeciwgrzybowej badanego szczepu bakteryjnego. W tym celu szczep bakterii *Agrobacterium* sp. Azo12 wysiano w postaci pionowej rysy o długości około 4 cm na pożywkę PDA i inkubowano 2 dni w temperaturze 26°C. Po tym czasie, po jednej stronie tej samej szalki, w odległości około 0.5 cm od rysy, naniesiono wycięty sterylnym skalpelem czworokątny fragment (0,5 cm x 0,5 cm) grzybni pojedynczego fitopatogenu grzybowego. Hodowle inkubowano przez kolejne 7 dni w temperaturze 26°C. Po inkubacji zmierzono średnicę grzybni i porównano z kontrolą (grzybni fitopatogenu na podłożu bez rysy badanego szczepu bakteryjnego). Procent hamowania wzrostu grzybni obliczono wykorzystując podany poniżej wzór:

$$H = (K-B)/K \times 100,$$

gdzie H – hamowanie wzrostu fitopatogenu (%), K – średnica grzybni fitopatogenu na płycie kontrolnej (mm), B – średnica grzybni fitopatogenu na szalce ze szczepem *Agrobacterium* sp. Azo12 (mm).

Aktywność przeciwgrzybowa. Aktywność β-1,3-glukanazy i chitynazy

β-1,3-glukanazy oraz chitynazy to enzymy zdolne do mszczenia ściany komórkowej chroniącej komórki niektórych grzybów, w tym grzybów patogennych, co może ograniczać ich rozwój.

W celu określenia aktywności β -1,3-glukanazy i chitynazy bakterie hodowano 4 dni na podłożu zawierającym chitynę koloidalną w temperaturze 26°C. Następnie biomasę komórek szczepu *Agrobacterium* sp. Azo12 oddzielano od supernatantu poprzez wirowanie (10 tys. x g, 10 min, 4°C).

W celu określenia aktywności β -1,3-glukanazy mieszanina reakcyjna zawierała 500 μ l supernatantu i 500 μ l laminarinu (0,5%) w 100 mM buforze octanowym (pH 5,5). Reakcję enzymatyczną prowadzono w 50°C przez 60 min., a następnie przerywano ją poprzez ogrzewanie przez 5 min w temp. 100°C w łaźni wodnej. Następnie do mieszaniny reakcyjnej dodano 2 ml dinitrosalicylanu (DNS, 1%) i gotowano przez kolejne 10 min. Następnie mieszaninę umieszczono na lodzie w celu schłodzenia. Stężenie glukozy mierzono spektrofotometrycznie w aparacie SpectraMax iD3 Multi-Mode Microplate Reader (Molecular Devices, San Jose, CA, USA) przy długości fali 540 nm względem krzywej wzorcowej zawierającej glukozę jako standard (Sigma-Aldrich, USA). Za miarę aktywności β -1,3-glukanazy (U) przyjęto ilość wytworzonej glukozy wyrażonej μ mol/ml/h. Analizę wykonano w 5 powtórzeniach.

W celu określenia aktywności chitynazy mieszanina reakcyjna zawierała 1 ml supernatantu, 0,125 ml substratu (roztwór 4-metyloumbeliferol N-acetylo- β -D-glukozaminidu, Sigma Aldrich, USA, stężenie końcowe 50 μ mol/l) i 0,125 ml buforu fosforanowego (50 mM, pH 7.0 \pm 0.2). Reakcję enzymatyczną prowadzono w 40°C przez 60 min., a następnie przerywano ją poprzez dodatek 0.1 ml 4 mM HgCl₂. Uwolniony 4-metyloumbelliferon (MU) mierzono fluorymetrycznie przy długości fali 318 nm (wzbudzenie) i 445 nm (emisja) przy użyciu spektrofluorymetru Hitachi F 2500 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Za miarę aktywności chitynazy (U) przyjęto ilość uwolnionego MU wyrażoną w nmol/ml/h. Analizę wykonano w 5 powtórzeniach.

Tolerancja na zasolenie

W celu określenia tolerancji badanego szczepu na zasolenie do 5 ml płynnego podłoża JMV zawierającego śladową ilość N dodawano NaCl do uzyskania końcowego stężenia (% NaCl) 0.5, 1, 2 oraz 3. Podłoże szczepiono 100 μ l porcją zawiesiny szczepu *Agrobacterium* sp. Azo12 zawierającą około 10⁷ komórek/ml i po 7-dniowej inkubacji w temperaturze 26°C mierzono absorbancję hodowli przy długości fali λ =600 nm w densytometrze DEN-18 (Biosan, Riga, Łotwa). Doświadczenie wykonano w 3 powtórzeniach dla każdego stężenia NaCl.

Właściwości promujące wzrost roślin szczepu *Agrobacterium* sp. Azo12 oraz tolerancja na zasolenie przedstawia tabela nr 1.

Wpływ szczepu *Agrobacterium* sp. Azo12 na kiełkowanie siewek pszenicy

Wpływ NaCl na kiełkowanie pszenicy

W celu ustalenia jaki poziom zasolenia ogranicza wzrost badanej odmiany pszenicy (pszenica ozima odmiany ostroga) wykonano test kiełkowania w warunkach niesterylnych na szalkach Petriego w zakresie stężeń NaCl od 50 do 200 mmol/l, odstęp co 50 mmol/l. W tym celu na bibule nasączoną odpowiednim roztworem NaCl umieszczono po 30 nasion pszenicy. Doświadczenie prowadzono w inkubatorze w temperaturze 15°C przez 7 dni bez dostępu światła.

Wpływ zasolenia na kiełkowanie pszenicy przedstawia rys. 1. Różne litery oznaczają różnice istotne statystycznie ($p < 0.05$)

Wpływ szczepu na stymulowanie kiełkowania i wzrostu pszenicy

W celu sprawdzenia skuteczności działania bakterii, czyli poprawy zdolności kiełkowania oraz wpływu na rozwój siewek pszenicy wykonano test kiełkowania w warunkach sterylnych na bibule Whatman (GF/A, \varnothing 90 mm) umieszczonej w szalkach Petriego.

Eksperyment wykonywano w dwóch wariantach: w warunkach bez zasolenia oraz w warunkach stresowych (150 mM NaCl). W obu przypadkach na bibule umieszczano po 15 nasion pszenicy. Powierzchnię nasion sterylizowano a następnie poddawano bakteryzacji polegającej na 60-minutowym kontakcie nasion z zawiesiną komórek szczepu *Agrobacterium* sp. Azo12 zawierającej około 10⁷ komórek/ml w roztworze zawierającym MgSO₄ (0.03M) i CMC (0.5%).

Biomasę komórek do bakteryzacji pozyskano w wyniku hodowli szczepu w podłożu płynnym 1/2 DYGS o składzie (g/l): glukoza 1, ekstrakt drożdżowy 1, pepton 0.75, kwas glutaminowy 0.65, K₂HPO₄ 0.250, MgSO₄·7H₂O 0.250 (pH=7.0 \pm 0.2).

W przypadku testu kiełkowania i wzrostu siewek pszenicy w warunkach bez zasolenia bibułę zwilżano roztworem Hoglanda nie zawierającym źródła azotu. W przypadku testowania kiełkowania i wzrostu siewek pszenicy w warunkach zasolenia, bibułę zwilżano roztworem Hoglanda zawierających źródło azotu.

Przed bakteryzacją, powierzchnię nasion sterylizowano 70% roztworem etanolu a następnie 2% roztworem NaOCl a następnie płukano 3-krotnie sterylną wodą destylowaną. Eksperyment prowadzono przez 7 dni w temperaturze 15°C bez dostępu światła. Kontrolę w obu wariantach stanowi Wpływ szczepu *Agrobacterium* sp. Azo12 na kiełkowanie pszenicy w warunkach sterylnych wiły nasiona nie poddane bakteryzacji (n=15) przedstawia tabela nr 2.

Bezpieczeństwo dla środowiska. Wykrywanie potencjalnych zdolności rakotwórczych szczepu *Agrobacterium* sp. Azo12.

Niektóre szczepy *Agrobacterium* arsenijevicii powodują powstawanie nowotworów u roślin owocowych takich jak np. malina i czereśnia. Geny związane z patogenezą są zlokalizowane w plazmidzie zwanym plazmidem Ti.

W celu weryfikacji obecności plazmidu Ti w DNA genomowym *Agrobacterium* sp. Azo12 zastosowano reakcje PCR pozwalające na wykrycie czterech genów, *virC*, *virD2*, *ipt* oraz *tms2*, odpowiedzialnych za patogenezę, związanych z plazmidem Ti (Kuzmanović N, Pulawska J, Prokić A, Ivanović M, Zlatković N, Jones JB, Obradović A. 2015. *Agrobacterium* arsenijevicii sp. nov., isolated from crown gall tumors on raspberry and cherry plum. *Syst Appl Microbiol*, 38(6):373–8). Do reakcji PCR wykorzystano następujące pary starterów: VCF3/VCR3 dla *virC*, A/C' dla *virD2*, CYT/CYT' dla *ipt*, oraz *tms2F1/tms2R2* dla *tms2* (Tabela 3). Jako kontrolę pozytywną w reakcjach PCR zastosowano DNA genomowe szczepu *Agrobacterium* arsenijevicii KFB 330^T pozyskanego z Instytutu Ogródnictwa – Państwowego Instytutu Badawczego w Skierniewicach.

Wykrywanie genów patogeniczności przedstawia tabela nr 3.

Wyniki

Na powierzchni podłoża do izolacji szczep Azo12 formował mlecznobiałe, okrągłe, półprzezroczyste, wypukłe kolonie o średnicy do 1.5 mm po 24 h inkubacji.

Wynik identyfikacji szczepu Azo12 w oparciu o sekwencję genu 16SrRNA z wykorzystaniem platformy EzBioCloud jest niepewny w kwestii oznaczenia gatunku. Sekwencja genu 16SrRNA badanego szczepu jest zgodna w 98.64% z najbliższym spokrewnionym szczepem wzorcowym *Agrobacterium* arsenijevicii KFB 330(T) oraz z *Agrobacterium* fabacearum CNPSo 675(T) (Numer dostępowy w National Center for Biotechnology Information (NCBI) odpowiednio JWIT01000061 oraz MN741112, przy czym kompletność porównania w obu przypadkach była taka sama i wynosiła 90.1%. W obu przypadkach porównywane sekwencje różniły się liczbą 18 par zasad na 1319 porównywanych (wskaźnik zmienności 18/1319). Dlatego na tym etapie precyzyjne przypisanie badanego szczepu do gatunku (*A. arsenijevicii* lub *A. fabacearum*) nie było możliwe. Możliwe jest natomiast ustalenie przynależności badanego szczepu do rodzaju *Agrobacterium*.

Badania molekularne potwierdziły obecność w DNA genomowym szczepu *Agrobacterium* sp. Azo12 genu *nifH* kodującego jedną z podjednostek nitrogenazy. Badana sekwencja wykazywała najwyższe podobieństwo z genem *nifH* klonu bakteryjnego YIII(11), czyli sekwencją genomowego DNA pozyskanego z gleby, zdeponowanego w GenBank pod numerem dostępowym KX502693.1.

Badania biochemiczne udowodniły aktywność enzymu nitrogenazy odpowiedzialnej za wiązanie wolnego azotu atmosferycznego przez badany szczep. Z danych przedstawionych w Tabeli 1 wynika, że *Agrobacterium* sp. Azo12 wykazywał aktywność nitrogenazy w stosunkowo szerokim zakresie stężeń NaCl. Aktywność tego enzymu wahała się w granicach od 0.296 ± 0.025 do 0.314 ± 0.029 U w zakresie stężeń od 0.5 do 2% NaCl (odpowiadającemu zakresowi stężeń od ~90 do ~350 milimola/l).

Oprócz zdolności do wiązania azotu badany szczep wykazuje szereg innych ważnych cech związanych z promowaniem wzrostu roślin. Z przeprowadzonych badań przedstawionych w Tabeli 1 wynika, że szczep *Agrobacterium* sp. Azo12 posiada zdolność do rozkładu białek w wyniku czego uwolniony zostaje amoniak. Stężenie uwolnionego amoniaku wynosiło 15.81 ± 5.77 $\mu\text{mol/ml}$. Szczep ten wykazuje również zdolność produkcji fitohormonu IAA. Stężenie produkowanego hormonu wynosiło 88.11 ± 11.09 $\mu\text{g/ml}$. Co więcej, *Agrobacterium* sp. Azo12 wykazuje aktywność deaminazy ACC, czyli posiada zdolność rozkładu ACC będącego prekursorem etylenu. Aktywność tego enzymu wynosiła 0.280 ± 0.040 U. Z przeprowadzonych badań wynika również, że *Agrobacterium* sp. Azo12 wykazuje zarówno aktywność β -1,3-glukanazy jak i chitynazy, co może ograniczać rozwój fitopatogenów grzybowych na skutek uszkodzenia ściany komórkowej fitopatogenu przez te enzymy. Aktywność badanych enzymów wynosiła odpowiednio 0.098 ± 0.036 U oraz 0.100 ± 0.005 U. Wykazano zdolność hamowania rozwoju fitopatogenu *Colletotrichum acutatum* w warunkach laboratoryjnych, przy czym redukcja wzrostu tego fitopatogenu wynosiła $20 \pm 5\%$.

Z przeprowadzonych badań wynika, że *Agrobacterium* sp. Azo12 posiada szeroki zakres tolerancji na zasolenie, co może tłumaczyć zdolność do promowania wzrostu siewek pszenicy również w warunkach stresu solnego.

Po 7 dniach hodowli siewek pszenicy ozimej odmiany Ostroga, w przypadku rozwoju korzonków, wykazano hamujący wpływ zasolenia już przy stężeniu 50 mmol/l, najniższe zaś stężenie NaCl hamujące rozwój liści siewek wynosiło 150 mmol/l (Rys. 1).

W warunkach sterylnych, szczep *Agrobacterium* sp. Azo12 stymulował kiełkowanie siewek pszenicy zarówno w warunkach stresowych (przy zasoleniu 150 mM NaCl) jak i w warunkach bez zasolenia oraz bez dodatkowego źródła N, przy czym silniejszy wpływ stymulujący rozwój systemu korzeniowego obserwowano w warunkach zasolenia i bez źródła N (Tabela 2).

W warunkach bez stresu solnego korzonki siewek pszenicy stymulowane obecnością szczepu *Agrobacterium* sp. Azo12 były o 44% dłuższe niż w próbie kontrolnej, natomiast liście były o 80% dłuższe. W warunkach stresu solnego w przypadku siewek poddanych bakteryzacji korzenie były dwukrotnie dłuższe w porównaniu z kontrolą. Mimo, iż nie odnotowano istotnych statystycznie różnic w długości liści siewek pszenicy w warunkach zasolenia, to jednak aż 46% siewek poddanych stresowi solnemu nie wykształciło liścia w kontroli bez szczepu, natomiast w próbie ze szczepem odsetek siewek niezdolnych do wykształcenia liścia był niższy i wynosił 6%.

Zbadano kwestię bezpieczeństwa stosowania szczepu *Agrobacterium* sp. Azo12 w środowisku naturalnym. Z przeprowadzonych badań wynika, że w genomie szczepu *Agrobacterium* sp. Azo12, nie stwierdzono obecności genów odpowiedzialnych za proces nowotworzenia, a więc wnioskować można, że szczep nie posiada plazmidu Ti. Geny te wykryto tylko w przypadku kontroli pozytywnej (*Agrobacterium* arsenijevici KFB 330^T). Ponadto nie stwierdzono występowania nieprawidłowej tkanki nowotworowej w siewkach pszenicy.

Otrzymany szczep bakterii *Agrobacterium* sp. Azo12 zdeponowany jest w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM) w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu pod numerem PCM B/00457 i stosowany do zastosowania w promowaniu wzrostu pszenicy. Szczep ma sekwencję nukleotydową numer 1, ujawnioną jak powyżej.

Szczep bakterii *Agrobacterium* sp. Azo12 zdeponowany w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM) w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu pod numerem PCM B/00457, opisany jak powyżej, stosowany jest w biopreparacie dla uprawy pszenicy.

Materiały i metody

1. Wytworzenie biomasy

Biomasę *Agrobacterium* sp. Azo12 pozyskano w wyniku hodowli szczepu w podłożu płynnym ½ DYGS o składzie (g/l): glukoza 1, ekstrakt drożdżowy 1, pepton 0.75, kwas glutaminowy 0.65, K₂HPO₄ 0.250, MgSO₄ x 7H₂O 0.250 (pH=7.0 ± 0.2). Hodowla trwała 48 h w temperaturze 26°C w warunkach delikatnego ruchu pożywki (70 RPM). Po tym czasie biomasę komórek oddzielono od supernatantu w wyniku wirowania (10 000 x g, 10 min, 20°C).

Istotne jest, aby właściwości drobnoustrojów, w tym ich aktywność metaboliczna były stałe, a przynajmniej niezmiennie w określonym czasie. **Proces liofilizacji** (suszenia sublimacyjnego bakterii) jest uznawany za najbardziej skuteczną metodą utrwalania szczepów bakterii. W celu podwyższenia przeżywalności bakterii podczas tego procesu, stosowane są substancje ochronne. W niniejszym zastosowaniu użyto **odtłuszczone mleko w proszku w wodzie** w ilości od 0,008 do 0,0015 korzystnie 0,001% (m/v). Obniżona zawartość wody w liofilizacie stanowi warunek dobrej żywotności utrwalonej kultury oraz zachowania jej cech technologicznych na wyjściowym poziomie, ochrania również substancje białkowe przed degradacją. Wśród innych zalet tego procesu znajdują się stabilność w temperaturze pokojowej, redukcja wagi gotowego produktu, zabezpieczenie przed zakażeniami i zanieczyszczeniami podczas przechowywania.

W celu wydłużenia czasu przechowywania komórek szczepu *Agrobacterium* sp. Azo12 pozyskaną biomasę mieszano z odtłuszczonym mlekiem w proszku (końcowe stężenie 10%, m/v) i liofilizowano, uzyskując postać stałą biomasy.

Biomasę w postaci stałej przechowywano w lodówce w temperaturze 4°C.

2. Wytworzenie biopreparatu

W celu przygotowania biopreparatu, przed wprowadzeniem do gleby, biomasę należy rozcieńczyć wodą pozbawioną chloru.

W biomase w postaci stałej (liofilizat) 0,28 kg świeżej biomasy, zawierającej 10^{11} jtk/g, należy rozprowadzić w 2800 l wody. Jest to ilość przeznaczona do zastosowania na 1 ha gleby. Uzyskany preparat zawiera 10^7 komórek/ml.

3. Wpływ biopreparatu na kiełkowanie i wzrost pszenicy ozimej w warunkach polowych, w warunkach bez zasolenia oraz w warunkach stresu solnego

W celu sprawdzenia wpływu działania biopreparatu na wzrost siewek pszenicy (pszenica ozima odmiany Ostroga) w doświadczeniu potowym, 10 kg gleby umieszczono w pudełkach polietylenowych o pojemności 0.5 dm^3 z drenażem. Do każdego pudełka wysiewano 20 nasion pszenicy. Doświadczenie prowadzono w dwóch wariantach, w pięciu powtórzeniach. W przypadku wariantu bez zasolenia, przesianą przez sito (\varnothing 3 mm), suchą powierzchniowo glebę nasączano roztworem wody destylowanej; w przypadku wariantu z zasoleniem, do gleby wprowadzano taką samą ilość roztworu NaCl o stężeniu 200 mM. Biopreparat zawierający około 10^7 jtk/ml w ilości 5 ml/pudełko wprowadzano do gleby dwukrotnie, w dniu wysiewu nasion oraz po 5 dniach hodowli. W każdym wariantcie hodowli kontrolę stanowiły siewki wyrosłe w glebie, do której nie wprowadzano biopreparatu. Doświadczenie prowadzono przez 21 dni od 19 do 2 listopada 2022 r.

W celu sprawdzenia skuteczności biopreparatu, do analizy z każdego pudełka pobierano 5 losowo wybranych roślin i analizowano następujące parametry:

- a) długość systemu korzeniowego oraz długość liści,
- b) suchą masę systemu korzeniowego oraz suchą masę liści,
- c) zawartość aldehydu malonowego (malondialdehyde, MDA) w liściach siewek pszenicy,
- d) zawartości proliny w liściach siewek pszenicy.

3.1. Długość systemu korzeniowego oraz długość liści

W celu określenia długości systemu korzeniowego i długości liści siewek pszenicy mierzono długość (cm) najdłuższego korzenia oraz najdłuższego liścia.

3.2. Sucha masa systemu korzeniowego i sucha masa liści

W celu określenia suchej masy systemu korzeniowego i liści, siewki suszono w suszarce laboratoryjnej w temperaturze 105°C do momentu osiągnięcia stałej masy.

3.3. Tolerancja na zasolenie. Stężenie MDA

Zasolenie gleby zwiększa wytwarzanie w roślinie reaktywnych form tlenu, które nasilają proces peroksydacji lipidów błonowych, w którym nienasycone kwasy tłuszczowe ulegają degradacji. Produktami procesów peroksydacji lipidów są aldehydy np. dialdehyd malonowy (malondialdehyde, MDA) (Yazici, I., Tuerkan, I., Sekmen, A. H., and Demiral, T. 2007. Salinity tolerance of purslane (*Portulaca oleracea* L.) is achieved by enhanced antioxidative system, lower level of lipid peroxidation and proline accumulation. *Environ. Exp. Bot.* 61, 49–57). Dlatego zawartość MDA w liściach jest zwykle wykorzystywana do oceny tolerancji roślin na zasolenie (Luna, C., Seffino, L. G., Arias, C., and Taleisnik, E. 2000. Oxidative stress indicators as selection tools for salt tolerance in *Chloris gayana*. *Plant Breed.* 119, 341–345).

W celu określenia stężenia MDA, 1 ml ekstraktu etanolowego z liści siewek pszenicy zmieszano z 1 ml 0,5% kwasu tiobarbiturowego zawierającego 20% kwasu trójchlorooctowego i ogrzewano do 90°C przez 30 min. Po schłodzeniu, próbkę odwirowano przez 5 min ($5000 \times g$), a następnie mierzono absorbancję supernatantu przy długości fali $\lambda=400$, $\lambda=532$ i $\lambda=600$ nm. Stężenie MDA określono ze wzoru podanego przez Hodges, D., DeLong, J., Forney, C. i wsp., Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta* 207,604–611 (1999) przyjmując wartość molowego współczynnika ekstynkcji MDA jako 155 mM/cm i wyrażono je w nmol/g śm. Doświadczenie wykonano w 9 powtórzeniach dla każdego wariantu.

3.4. Tolerancja na zasolenie. Stężenie proliny

Prolina jest aminokwasem pełniącym ważną funkcję w regulacji osmotycznej komórek. Gromadzenie proliny w tkankach roślin w odpowiedzi na stres solny chroni błonę komórkową, stabilizuje strukturę białka i wymiata wolne rodniki hydroksylowe powodujące peroksydację lipidów błonowych (Clausen, W. 2005. Proline as a measure of stress in tomato plants. *Plant Sci.* 168, 241–248). Zawartość proliny w tkankach roślin może być traktowana jako wyznacznik tolerancji rośliny na zasolenie.

W celu określenia stężenia proliny w liściach siewek pszenicy 0.1 g naważki świeżych liści umieszczano w 2 ml fiolkach z metalowymi kulkami i zalewano 1.5 ml alkoholu etylowego (96%). Próbki homogenizowano przez 45 s przy 4000 RPM w urządzeniu PowerLyser24 (Qiagen, Hilden, Niemcy).

Następnie próbki wirowano przez 10 min (10 000 x g, 4°C). Zawartość proliny oznaczano w supernatancie z wykorzystaniem ultracisnieniowej chromatografii cieczowej z tandemową spektrometrią mas (UHPLC-MS/MS; Shimadzu Nexera XR UHPLC/LCMS-8045 system; Kyoto, Japonia) na kolumnie Poroshell 120 Hillic-z. 2.7 µm 2.1x150 mm (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Stężenie proliny (µg/g śm tkanki) określano względem krzywej wzorcowej proliny (Sigma-Aldrich, USA) w 96% etanolu. Doświadczenie wykonano w 9 powtórzeniach dla każdego wariantu.

Liczebność bakterii *Agrobacterium sp. Azo12* w biomasie

W celu określenia liczebności komórek szczepu *Agrobacterium sp. Azo12* w biomasie, z próbek biomasy (1 g biomasy stałej rozcieńczano 10-krotnie w roztworze soli fizjologicznej (0,85% NaCl), a następnie 1 ml odpowiedniego rozcieńczenia (1:10⁶, 1:10⁷, 1:10⁸) wysiewano na podłoże ½ DYGS stosując wysiew lany i inkubowano w temperaturze 26°C. Po 3 dniach inkubacji zliczano wyrosłe kolonie bakteryjne. Liczebność bakterii wyrażano jako jtk/ml lub jtk/g.

Wyniki

Wyniki zostały ukazane także na rysunkach oraz w tabelach:

Rys. 2. Wpływ biopreparatu zawierającego *Agrobacterium sp. Azo12* na kiełkowanie i wzrost siewek pszenicy a) Warunki bez zasolenia b) Warunki stresu solnego

Rys. 3. Stężenie MDA w tkankach liści siewek pszenicy (wartość mediany, N=9)

Rys. 4. Stężenie proliny w tkankach liści siewek pszenicy (wartość średnia, N=9)

Tabela 4. Wpływ szczepu *Agrobacterium sp. Azo12* na długość (cm) korzenia i liścia siewek pszenicy w warunkach polowych

Tabela 5. Wpływ szczepu *Agrobacterium sp. Azo12* na masę (g) korzenia i liścia siewek pszenicy w warunkach polowych

Tabela 6. Liczebność bakterii *Agrobacterium sp. Azo12* w biomasie

Z przeprowadzonych badań wynika, że wytworzony biopreparat zawierający żywe komórki *Agrobacterium sp. Azo12* promuje wzrost i rozwój siewek pszenicy zarówno w warunkach bez zasolenia, jak i w warunkach stresu solnego (200 mM NaCl).

W warunkach normalnych, system korzeniowy siewek w glebie do której wprowadzono biopreparat był o 60% dłuższy w stosunku do kontroli, natomiast długość liści była dłuższa o 35%. W warunkach zasolenia długość systemu korzeniowego siewek w glebie poddanej wpływowi szczepu była o 47% dłuższa w porównaniu do kontroli a długość liści była dłuższa o 42%.

W warunkach bez zasolenia sucha masa systemu korzeniowego siewek w glebie wspomaganą biopreparatem była o 60% wyższa w porównaniu do kontroli, a masa liści była o 40% dłuższa. W warunkach stresu solnego masa siewek wspomaganych biopreparatem była o 57% wyższa w porównaniu do kontroli, a masa liści była o 36% wyższa.

Wyniki dotyczące tolerancji na zasolenie siewek pszenicy wykazują, że w warunkach stresu solnego siewki wspomagane biopreparatem miały znacząco niższe ($p < 0.05$) stężenie MDA w porównaniu do kontroli, co wskazuje na niższy poziom degradacji lipidów błonowych w tkankach liści w porównaniu do siewek wyrosłych w glebie do której nie wprowadzono biopreparatu. Co ważne, poziom MDA był również znacząco niższy w przypadku siewek wspomaganych obecnością szczepu *Azo12* w stosunku do kontroli również w warunkach bez stresu solnego. Wynika z tego, że szczep *Azo12* potrafi chronić przed stresem oksydacyjnym nie tylko takim, który jest wynikiem stresu solnego, ale i również innych czynników (np. niedobór niektórych mikroelementów).

W warunkach bez stresu solnego stężenia proliny w liściach były znacząco niższe w porównaniu z warunkami stresowymi. W warunkach stresu solnego stężenie proliny, pełniącej funkcję osmoprotektanta było znacząco niższe ($p < 0.05$) w tkankach liści siewek wspomaganych biopreparatem w porównaniu do siewek w próbie kontrolnej. Wynika z tego, że szczep *Agrobacterium sp. Azo12* może skutecznie zabezpieczać siewki pszenicy przed szkodliwym wpływem stresu solnego.

Liczebność bakterii *Agrobacterium Azo12* w biomasie w momencie jej wyprodukowania wynosiła 10¹¹ jtk/ml.

Przykład II. Szczep bakterii *Agrobacterium sp. Azo12* zdeponowany w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM) w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu pod numerem PCM B/00457, do zastosowania w promowaniu wzrostu pszenicy.

Przykład III. Szczep bakterii *Agrobacterium sp. Azo12* zdeponowany w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM) w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu pod numerem PCM B/00457 o sekwencji nukleotydowej nr 1.

Przykład IV. Szczep bakterii *Agrobacterium* sp. Azo12 zdeponowany w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM) w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu pod numerem PCM B/00457 o sekwencji nukleotydowej nr 1 zastosowania jako biopreparat dla uprawy pszenicy.

Przykład V. Szczep bakterii *Agrobacterium* sp. Azo12 zdeponowany w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM) w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu pod numerem PCM B/00457 o sekwencji nukleotydowej nr 1 do zastosowania jako biopreparat dla uprawy pszenicy.

Przykład VI. Biomasa do uprawy pszenicy zawiera odtłuszczone mleko w proszku w ilości 8% (m/v) i 10^{10} jtk/g komórek szczepu bakterii *Agrobacterium* sp. Azo12 zdeponowanego w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM) w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu pod numerem PCM B/00457.

Sposób otrzymywania biomasy do uprawy pszenicy polega na tym, że roztwór odtłuszczonego mleka w proszku w ilości 8% (m/v) i 10^{10} jtk/g szczepu bakterii *Agrobacterium* sp. Azo12 zdeponowanego w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM) w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu pod numerem PCM B/00457 miesza się w czasie 3 minut, w temperaturze otoczenia 20°C .

Przykład VII. Biomasa do uprawy pszenicy zawiera odtłuszczone mleko w proszku w ilości 12% (m/v) i 10^{12} jtk/g komórek szczepu bakterii *Agrobacterium* sp. Azo12 zdeponowanego w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM) w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu pod numerem PCM B/00457.

Sposób otrzymywania biomasy do uprawy pszenicy polega na tym, że roztwór odtłuszczonego mleka mleko w proszku w ilości 12% (m/v) i 10^{12} jtk/g szczepu bakterii *Agrobacterium* sp. Azo12 zdeponowanego w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM) w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu pod numerem PCM B/00457 miesza się w czasie 5 minut, w temperaturze otoczenia w zakresie 22°C .

Przykład VIII. Biomasa do uprawy pszenicy zawiera odtłuszczone mleko w proszku w ilości 10% (m/v) i 10^{11} jtk/g komórek szczepu bakterii *Agrobacterium* sp. Azo12 zdeponowanego w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM) w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu pod numerem PCM B/00457.

Sposób otrzymywania biomasy do uprawy pszenicy polega na tym, że roztwór odtłuszczonego mleka w proszku w ilości 10% (m/v) i 10^{11} jtk/g szczepu bakterii *Agrobacterium* sp. Azo12 zdeponowanego w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM) w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu pod numerem PCM B/00457 miesza się w czasie 4 minut, w temperaturze otoczenia 21°C .

Przykład IX. Biopreparat do uprawy pszenicy zawiera odtłuszczone mleko w proszku w ilości 0,0008% (m/v), 10^6 jtk/g szczepu bakterii *Agrobacterium* sp. Azo12 zdeponowanego w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM) w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu pod numerem PCM B/00457, wodę odchlorowaną gdzie na każdy litr wody ilość roztworu odtłuszczonego mleka w proszku z komórkami szczepu bakterii wynosi 0,008 ml.

Sposób otrzymywania biopreparatu do uprawy pszenicy polega na tym, biomasę zawierającą odtłuszczone mleko proszku w ilości 0,0008% (m/v), 10^6 jtk/g komórek szczepu bakterii *Agrobacterium* sp. Azo12 zdeponowanego w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM) w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu pod numerem PCM B/00457 miesza się z wodą odchlorowaną w czasie 15 minut, w temperaturze otoczenia, 20°C , i mrozi w temperaturze -75°C w czasie 24 godzin, a następnie liofilizuje znanymi sposobami.

Przykład X. Biopreparat do uprawy pszenicy zawiera odtłuszczone mleko w proszku w ilości 0,0012% (m/v), 10^8 jtk/g szczepu bakterii *Agrobacterium* sp. Azo12 zdeponowanego w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM) w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu pod numerem PCM B/00457, wodę odchlorowaną gdzie na każdy litr wody ilość roztworu odtłuszczonego mleka w proszku z komórkami szczepu bakterii 0,012 ml.

Sposób otrzymywania biopreparatu do uprawy pszenicy polega na tym, biomasę zawierającą odtłuszczone mleko w proszku w ilości 0,0012% (m/v), 10^8 jtk/g komórek szczepu bakterii *Agrobacterium* sp. Azo12 zdeponowanego w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM) w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu pod numerem PCM B/00457 miesza się z wodą odchlorowaną w czasie 20 minut, korzystnie w temperaturze otoczenia, 22°C , i mrozi w temperaturze -80°C w czasie 26 godzin, a następnie liofilizuje znanymi sposobami.

Przykład XI. Biopreparat do uprawy pszenicy zawiera odtłuszczone mleko w proszku w ilości 0,001% (m/v), 10^7 jtk/g szczepu bakterii *Agrobacterium* sp. Azo12 zdeponowanego w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM) w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu pod numerem PCM B/00457, wodę odchlorowaną gdzie na każdy litr wody ilość roztworu odtłuszczonego mleka w proszku z komórkami szczepu bakterii wynosi 0,01 ml.

Sposób otrzymywania biopreparatu do uprawy pszenicy polega na tym, biomasę zawierającą odtłuszczone mleko w proszku w ilości 0,001% (m/v), 10^7 jtk/g komórek szczepu bakterii *Agrobacterium* sp. Azo12 zdeponowanego w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM) w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu pod numerem PCM B/00457 miesza się z wodą odchlorowaną w czasie 17 minut, w temperaturze otoczenia, 21°C, i mrozi w temperaturze -77°C w czasie 25 godzin, a następnie liofilizuje znanymi sposobami.

Zastrzeżenia patentowe

1. Szczep bakterii *Agrobacterium* sp. Azo12 zdeponowany w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM) w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu pod numerem PCM B/00457, do zastosowania w promowaniu wzrostu pszenicy.
2. Szczep bakterii *Agrobacterium* sp. Azo12 zdeponowany w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM) w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu pod numerem PCM B/00457 zawierający sekwencję nukleotydową nr 1.
3. Szczep bakterii *Agrobacterium* sp. Azo12 zdeponowany w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM) w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu pod numerem PCM B/00457 jak określono w zastrz. 1 do zastosowania jako biopreparat dla uprawy pszenicy.
4. Szczep bakterii *Agrobacterium* sp. Azo12 zdeponowany w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM) w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu pod numerem PCM B/00457 jak określono w zastrz. 2 do zastosowania jako biopreparat dla uprawy pszenicy.
5. Biomasa do uprawy pszenicy, **znamienna tym**, że zawiera odtłuszczone mleko w proszku w ilości od 8 do 12% korzystnie 10% (m/v) i od 10^{10} do 10^{12} jtk/g korzystnie 10^{11} jtk/g komórek szczepu bakterii *Agrobacterium* sp. Azo12 zdeponowanego w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM) w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu pod numerem PCM B/00457.
6. Biopreparat do uprawy pszenicy, **znamienny tym**, że zawiera odtłuszczone mleko w proszku w ilości od 0,0008 do 0,0012% korzystnie 0,001% (m/v), od 10^6 do 10^8 jtk/g korzystnie 10^7 jtk/g szczepu bakterii *Agrobacterium* sp. Azo12 zdeponowanego w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM) w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu pod numerem PCM B/00457, wodę korzystnie odchlorowaną gdzie na każdy litr wody ilość roztworu odtłuszczonego mleka w proszku z komórkami szczepu bakterii wynosi od 0,008 do 0,012 ml.
7. Sposób otrzymywania biomasy do uprawy pszenicy, **znamienny tym**, że roztwór odtłuszczonego mleka w proszku w ilości od 8 do 12% korzystnie 10% (m/v) i od 10^{11} do 10^{12} jtk/g korzystnie 10^{11} jtk/g szczepu bakterii *Agrobacterium* sp. Azo12 zdeponowanego w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM) w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu pod numerem PCM B/00457 miesza się korzystnie w czasie od 3 do 5 minut, korzystnie w temperaturze otoczenia najkorzystniej w zakresie 20–22°C.
8. Sposób otrzymywania biopreparatu do uprawy pszenicy, **znamienny tym**, biomasę zawierającą odtłuszczone mleko w proszku w ilości od 8 do 12% korzystnie 10% (m/v) i od 10^{10} do 10^{12} korzystnie 10^{11} komórek szczepu bakterii *Agrobacterium* sp. Azo12 zdeponowanego w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM) w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu pod numerem PCM B/00457 miesza się z wodą korzystnie odchlorowaną w czasie od 15 do 20 minut, korzystnie w temperaturze otoczenia, najkorzystniej w zakresie 20–22°C, i mrozi korzystnie w temperaturze od -75 do -80°C najkorzystniej w czasie od 24 do 26 godzin, a następnie liofilizuje.

Tabele

| Właściwość PGPR | Wartość |
|--|--|
| Wiązanie azotu (nmol/ml/h) | 0.296 ± 0.025 0.5%NaCl 0.296 ± 0.021 1% NaCl 0.314 ± 0.029 2% NaCl |
| Amonifikacja (μmol/ml) | 15.81 ± 5.77 |
| Produkcja IAA (μg/ml) | 88.11 ± 11.09 |
| Aktywność deaminazy ACC α-ketomaślan (nmol/ml/h) | 0.280 ± 0.040 |
| Aktywność β-1,3-glukanazy (μmol/ml/h) | 0.098 ± 0.036 |
| Aktywność chitynazy (nmol/ml/h) | 0.100 ± 0.005 |
| Hamowanie rozwoju patogenów grzybowych (%) | 20 ± 5 Colletotrichum acutatum |
| Tolerancja na zasolenie (% NaCl) | 0 - 3, opt. 0.5 |

Tabela 1

| Warunki | Bez zasolenia, bez suplementacji N | | | | Zasolenie 150 mmol/l NaCl, z dodatkiem N | | | |
|---------|------------------------------------|--------|------------------------|--------|--|---------|------------------------|-------|
| | Długość korzenia (mm) | | Długość liścia (mm) | | Długość korzenia (mm) | | Długość liścia (mm) | |
| Wariant | Kontrola | Azo12 | Kontrola | Azo12 | Kontrola | Azo12 | Kontrola | Azo12 |
| 1 | 43.0 | 37.3 | 50.0 | 37.3 | 21.7 | 34.3 | 35.0 | 45.0 |
| 2 | 42.7 | 65.7 | 45.0 | 65.7 | 19.7 | 62.3 | 30.0 | 60.0 |
| 3 | 26.0 | 54.0 | 30.0 | 54.0 | 22.0 | 21.7 | 35.0 | 45.0 |
| 4 | 40.0 | 60.3 | 30.0 | 60.3 | 21.0 | 52.7 | 24.0 | 53.0 |
| 5 | 44.3 | 34.0 | 37.0 | 34.0 | 19.0 | 42.3 | 27.0 | 30.0 |
| 6 | 43.3 | 50.0 | 30.0 | 50.0 | 22.7 | 28.3 | 31.0 | 47.0 |
| 7 | 45.0 | 60.0 | 30.0 | 60.0 | 9.7 | 48.3 | 5.0 | 37.0 |
| 8 | 34.3 | 72.3 | 26.0 | 72.3 | 2.3 | 53.7 | 6.0 | 59.0 |
| 9 | 41.0 | 43.0 | 25.0 | 43.0 | 2.0 | 44.0 | 0.0 | 32.0 |
| 10 | 32.3 | 74.3 | 26.0 | 74.3 | 1.0 | 16.7 | 0.0 | 10.0 |
| 11 | 16.7 | 53.3 | 14.0 | 53.3 | 0.7 | 28.0 | 0.0 | 20.0 |
| 12 | 16.7 | 56.3 | 3.0 | 56.3 | 0.0 | 46.3 | 0.0 | 37.0 |
| 13 | 3.3 | 6.7 | 5.0 | 6.7 | 0.0 | 29.0 | 0.0 | 30.0 |
| 14 | 2.7 | 10.0 | 0.0 | 10.0 | 0.0 | 38.3 | 0.0 | 15.0 |
| 15 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 4.7 | 0.0 | 0.0 |
| Mediana | 37.15* | 53.65* | 30.0** | 53.7** | 19.0*** | 38.3*** | 28.5 | 37.0 |

Różne litery oznaczają różnice istotne statystycznie; *** p<0.001, **p<0.01, *p<0.05

Tabela 2

| Starter | Sekwencja startera 5'-3' | Temperatura anealingu (°C) | Długość produktu (bp) | Obecność produktu | |
|---------|-------------------------------|----------------------------|-----------------------|--------------------------------------|--------------|
| | | | | A. arsenijewici KFB 330 ^T | A. sp. Azo12 |
| VCF3 | GGCGGGCGYGCYGAAAGRAA RACYT | 52 | 414 | + | - |
| VCR3 | AAGAACGYGGNATGTTGCAT CTYAC | | | | |
| A | ATGCCCCGATCGAGCTCAAGT | 52 | 338 | + | - |
| C' | TCGTCTGGCTGACTTTCGTCA TAA | | | | |
| CYT | GATCGSGICCAATGYTGT | 50 | 427 | + | - |
| CYT' | GATATCCATCGATCYCTT | | | | |
| tms2F1 | TTTCAGCTGCTAGGGCCACAT CAG | 58 | 617 | + | - |
| tms2R2 | TCGCCATGGAAACGCCGGAG TAGG | | | | |

Tabela 3

| Warunki | Bez zasolenia | | | | Zasolenie | | | |
|--|----------------------|----------------------|---------------------|----------------------|---------------------|----------------------|---------------------|---------------------|
| | Korzeń | | Liść | | Korzeń | | Liść | |
| Wariant | Kontrola | Azo12 | Kontrola | Azo12 | Kontrola | Azo12 | Kontrola | Azo12 |
| 1 | 11.1 | 16.0 | 8.7 | 11.1 | 6.0 | 19.0 | 3.5 | 7.4 |
| 2 | 11.0 | 18.8 | 7.9 | 10.0 | 7.5 | 16.8 | 5.5 | 7.6 |
| 3 | 11.0 | 19.7 | 7.0 | 10.1 | 11.0 | 16.5 | 6.0 | 7.8 |
| 4 | 16.0 | 19.8 | 8.0 | 12.6 | 6.0 | 14.8 | 3.5 | 8.1 |
| 5 | 14.3 | 18.9 | 7.5 | 11.6 | 6.2 | 15.6 | 5.0 | 9.4 |
| 6 | 12.5 | 18.0 | 7.0 | 11.2 | 8.5 | 14.4 | 6.5 | 8.4 |
| 7 | 17.0 | 17.4 | 6.5 | 10.8 | 12.5 | 14.5 | 7.0 | 8.0 |
| 8 | 10.5 | 17.8 | 6.5 | 10.2 | 9.5 | 12.5 | 7.0 | 8.7 |
| 9 | 11.8 | 17.6 | 7.0 | 8.7 | 10.5 | 12.4 | 5.2 | 7.5 |
| 10 | 12.0 | 16.5 | 7.5 | 10.1 | 3.0 | 11.5 | 2.8 | 8.1 |
| 11 | 9.5 | 15.6 | 7.0 | 9.8 | 5.0 | 11.0 | 4.5 | 7.5 |
| 12 | 10.0 | 18.1 | 8.0 | 9.9 | 7.5 | 11.0 | 7.3 | 7.8 |
| 13 | 8.5 | 17.0 | 7.8 | 9.9 | 9.5 | 12.4 | 5.5 | 7.0 |
| 14 | 11.5 | 21.0 | 7.5 | 11.5 | 11.5 | 12.5 | 9.0 | 7.0 |
| 15 | 8.5 | 15.6 | 5.8 | 9.4 | 12.0 | 11.2 | 7.0 | 7.5 |
| Statystyki | | | | | | | | |
| Mediana | 11.1 ^{b***} | 17.8 ^{a***} | 7.5 ^{b***} | 10.1 ^{a***} | 8.5 ^{b***} | 12.5 ^{a***} | 5.5 ^{b***} | 7.8 ^{a***} |
| IQR | 2.5 | 2.4 | 0.9 | 1.3 | 5 | 4.1 | 2.5 | 0.6 |
| K- próba kontrolna. Azo12 – próba poddana działaniu szczepu Agrobacterium sp. Azo 12, IQR – przedział międzykwartyłowy. Różne litery oznaczają różnice istotne statystycznie; *** p<0.001, **p<0.01, *p<0.05 | | | | | | | | |

Tabela 4

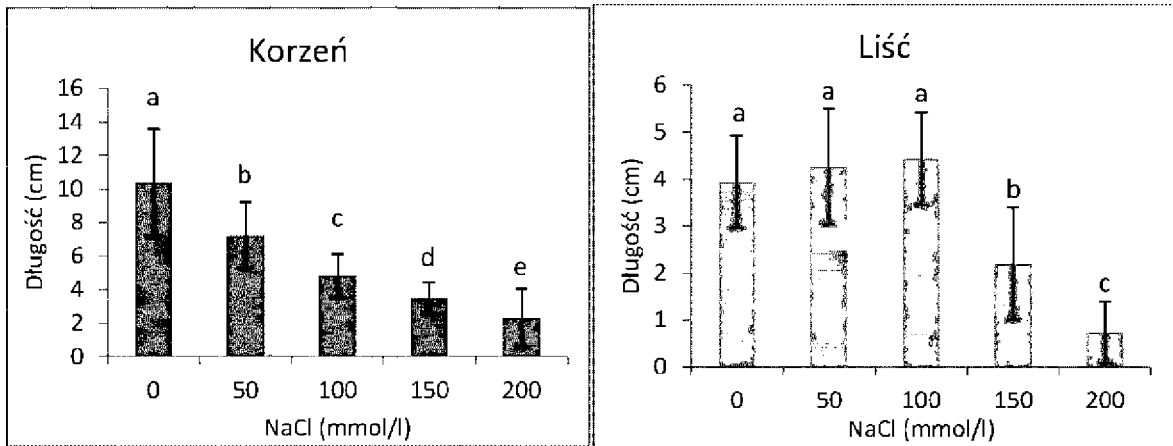
| Warunki | Bez zasolenia | | | | Zasolenie | | | |
|--|-----------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Cel | Korzeń | | Liść | | Korzeń | | Liść | |
| Wariant | K | Azo12 | K | Azo12 | K | Azo12 | K | Azo12 |
| 1 | 0.013 | 0.019 | 0.015 | 0.018 | 0.006 | 0.009 | 0.01 | 0.015 |
| 2 | 0.007 | 0.013 | 0.013 | 0.024 | 0.008 | 0.014 | 0.016 | 0.014 |
| 3 | 0.008 | 0.01 | 0.016 | 0.016 | 0.007 | 0.012 | 0.008 | 0.019 |
| 4 | 0.007 | 0.015 | 0.018 | 0.017 | 0.006 | 0.009 | 0.009 | 0.013 |
| 5 | 0.011 | 0.017 | 0.013 | 0.018 | 0.007 | 0.011 | 0.016 | 0.016 |
| 6 | 0.009 | 0.017 | 0.017 | 0.026 | 0.008 | 0.011 | 0.01 | 0.016 |
| 7 | 0.009 | 0.016 | 0.013 | 0.023 | 0.007 | 0.008 | 0.013 | 0.019 |
| 8 | 0.019 | 0.014 | 0.01 | 0.019 | 0.006 | 0.011 | 0.013 | 0.019 |
| 9 | 0.007 | 0.013 | 0.016 | 0.021 | 0.006 | 0.011 | 0.007 | 0.016 |
| 10 | 0.005 | 0.017 | 0.014 | 0.017 | 0.008 | 0.012 | 0.008 | 0.013 |
| 11 | 0.011 | 0.015 | 0.02 | 0.022 | 0.01 | 0.009 | 0.01 | 0.018 |
| 12 | 0.009 | 0.018 | 0.021 | 0.023 | 0.005 | 0.011 | 0.014 | 0.012 |
| 13 | 0.011 | 0.016 | 0.015 | 0.021 | 0.01 | 0.009 | 0.013 | 0.014 |
| 14 | 0.011 | 0.021 | 0.015 | 0.024 | 0.008 | 0.012 | 0.012 | 0.013 |
| 15 | 0.006 | 0.013 | 0.014 | 0.02 | 0.007 | 0.013 | 0.008 | 0.015 |
| | Statystyki | | | | | | | |
| Średnia | 0.010 ^{b***} | 0.016 ^{a***} | 0.015 ^{b**} | 0.021 ^{a**} | 0.007 ^{b***} | 0.011 ^{a***} | 0.011 ^{b***} | 0.015 ^{a***} |
| SD | 0.003 | 0.003 | 0.003 | 0.003 | 0.001 | 0.002 | 0.003 | 0.002 |
| K- próba kontrolna, Azo12 – próba poddana działaniu szczepu Agrobacterium sp. Azo 12. SD – odchylenie standardowe. Różne litery oznaczają różnice istotne statystycznie; *** p<0.001, **p<0.01 | | | | | | | | |

Tabela 5

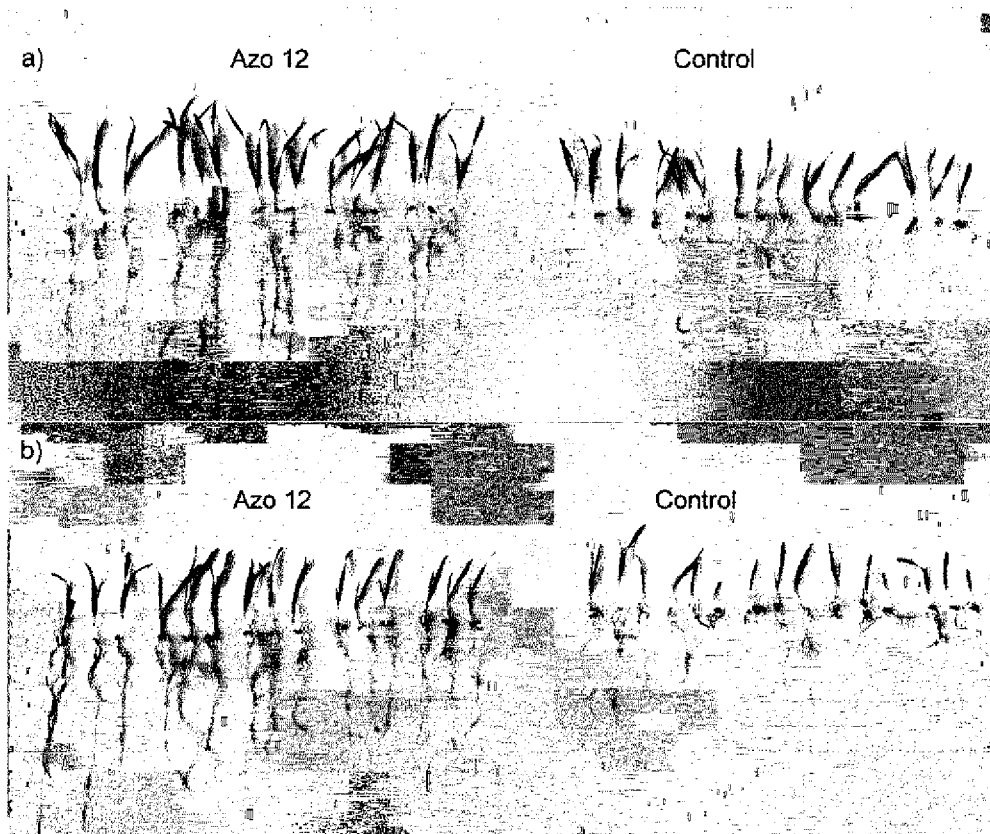
| | Liczebność (jtk/g lub jtk/ml) | |
|-------------------|---------------------------------------|---|
| Czas | Biomasa w postaci stałej (liofilizat) | Biomasa w postaci płynnej (w glicerolu) |
| T0 świeża biomasa | 3 x 10 ¹¹ | 2.7 x 10 ¹¹ |

Tabela 6

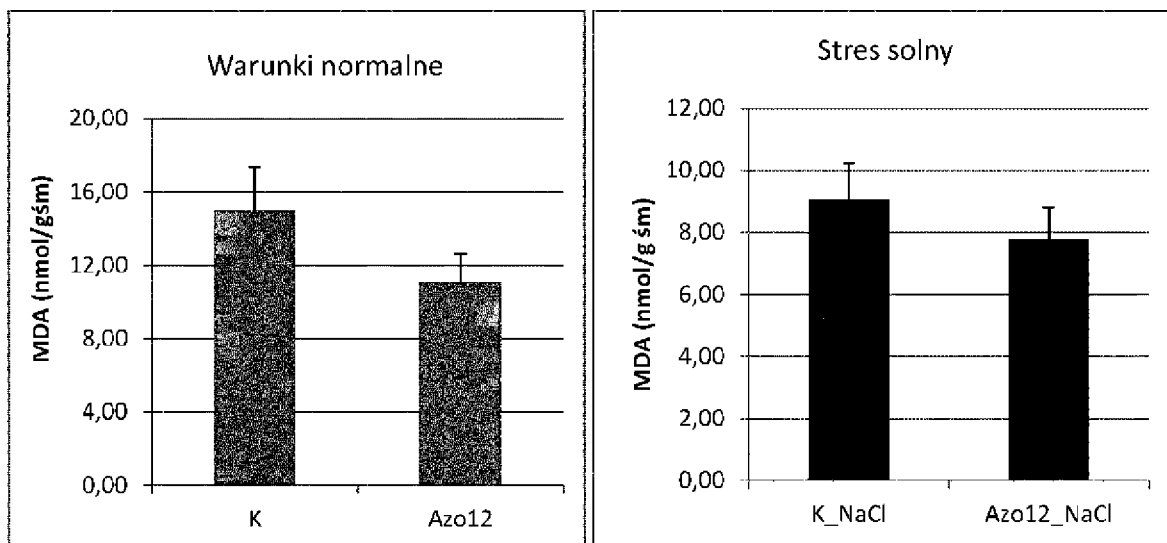
Rysunki



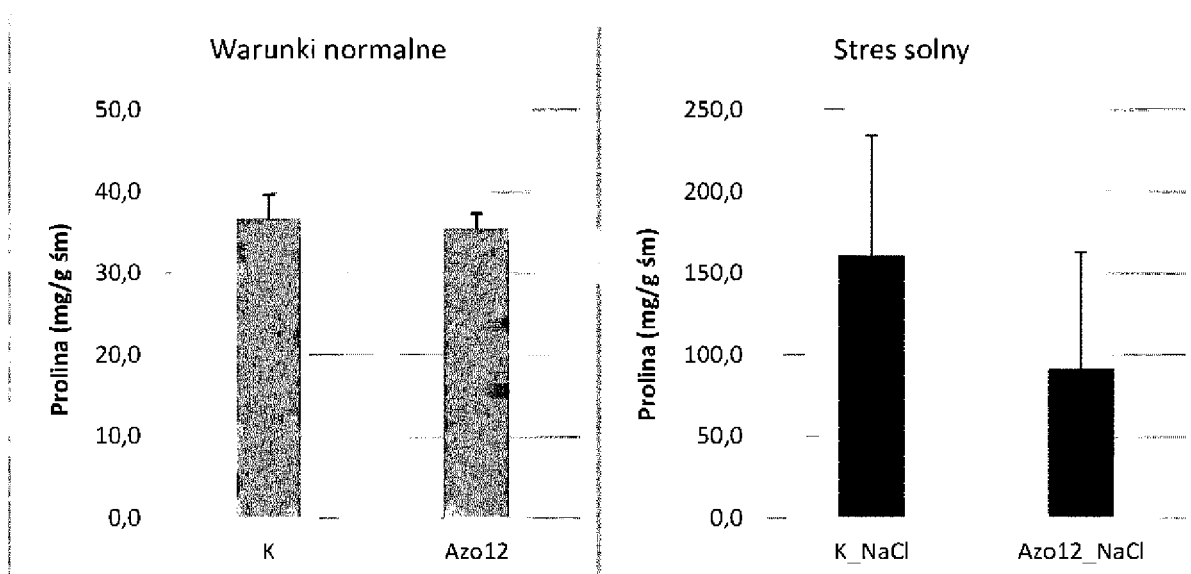
Rys. 1.



Rys. 2.



Rys. 3.



Rys. 4.

Wykaz sekwencji

<110> Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

<120> Szczep bakterii *Agrobacterium* sp. Azo12, biomasa do uprawy pszenicy i sposób jej otrzymywania, biopreparat do uprawy pszenicy i sposób jej otrzymywania z udziałem szczepu *Agrobacterium* sp. Azo12, przeznaczony dla uprawy pszenicy w warunkach normalnych oraz w warunkach stresu solnego

<130> 444472

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1351

<212> DNA

<213> *Agrobacterium* sp.

<220>

<221> 16SrRNA gene partial

<222> (1)..(1351)

<220>

<221> misc_feature

<222> (930)..(930)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc_feature

<222> (932)..(932)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc_feature

<222> (1108)..(1108)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc_feature

<222> (1114)..(1114)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc_feature

<222> (1125)..(1125)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 1

| | |
|--|------|
| tgcatcgcag cccccgcaa ggggagcggc agacgggtga gtaacgcgtg ggaatctacc | 60 |
| gagccctgcg gaatagctcc gggaaactgg aattaatacc gcatacgecc tacgggggaa | 120 |
| agatttatcg gggttgatg ageccgcgtt ggattageta gttggtgggg taaaggccta | 180 |
| ccaaggcgac gatccatagc tggctgaga ggatgatcag ccacattggg actgagacac | 240 |
| ggcccaaact cctacgggag gcagcagtgg ggaatattgg acaatgggcg caagcctgat | 300 |
| ccagecatgc cgcgtgagt atgaaggccc tagggttga aagettttc aacggtgaag | 360 |
| ataatgacgg taaccglaga agaagccccg gctaacttcg tgccagcagc cgcggtaata | 420 |
| cgaagggggc tagcgttgtt cggaattract gggegtaaag cgcacgtagg cggatatta | 480 |
| agtcaggggt gaaatcccgg ggctcaacct cggaaactgcc ttgatactg ggtatctga | 540 |
| gtatggaaga ggtaagtga attgcgagt tagaggtaa atctagat attcgcagga | 600 |
| acaccagtgg cgaaggcggc ttactgttcc attactgacg ctgaggtgcg aaagcgtggg | 660 |
| gagcaaacag gattagatac cctggtagtc cacgccgtaa acgatgaatg ttagcctgcg | 720 |
| ggcagtatac tgltcgtgg cgcagetaac gcattaaaca ttccgcctgg ggagtacggt | 780 |
| cgcaagatta aaactcaaag gaattgacgg ggccccgcac aagcgggtggg agcatgtggt | 840 |
| ttaattegaa gcaacgcgca gaaccttacc agctctgac attcgggta tgggcagtgg | 900 |
| agacattgtc cttcagttag gctggcccn anaacagggt ctgcatgct gtcgtagct | 960 |
| cgtgtcgtga gatgttgggt taagtcccgc aacgagcgca accctcgecc ttagtgtcca | 1020 |
| gcatttagtt gggcaactca aggggactgc cgttgataag ccgagaggaa ggtggggatg | 1080 |
| acgtcaagtc ctcattgccc ttacgggnct gggntacaca cgtgntacaa tgggtgtgac | 1140 |
| agtgggcagc gagacagcga tgcgagcta atctccaaa gccatctcag ttcggattgc | 1200 |
| actctgaac tcgagtgc at gaagtggaa tcgctagtaa tcgagatca gcatgctgcg | 1260 |
| gtgaatacgt tcccggcct tgtacacacc gcccgtcaca ccattgggagt tggttttacc | 1320 |
| cgaaggtagt gcgctaaccg caaggagcga g | 1351 |

<110> Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

<120> Szczep bakterii *Agrobacterium* sp. Azo12, biomasa do uprawy pszenicy i sposób jej otrzymywania, biopreparat do uprawy pszenicy i sposób jej otrzymywania z udziałem szczepu *Agrobacterium* sp. Azo12, przeznaczony dla uprawy pszenicy w warunkach normalnych oraz w warunkach stresu solnego

<130> 444472

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 2

<211> 357

<212> DNA

<213> *Agrobacterium* sp.

<400> 2

```
gcgateccaa ggcggactcc actcgcctga tctgcactc caaggcccag aacctcatcat    60
ggaaatggct gccgaagccg gcaccgtgga agatctggag ctggaagacg tgctgaaggt    120
cggtctacggc ggcgtcaagt gcgttgagtc cgggtgtccg gaccggggcg ttggtgcgc    180
tggccgtggt gttatcaccg cgatcaactt cctggaagag gaaggcgcct acgaagacga    240
tctggacttc gtattctacg acgtactggg cgacgtggtg tgcggtgget tcgceatgcc    300
gatccgcgaa aacaaggctc aggaaatcta catcgtttgc tccgggaaat gatggcc      357
```

