

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **037703**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.05.12

(21) Номер заявки
201790162

(22) Дата подачи заявки
2015.07.28

(51) Int. Cl. *A01N 63/02* (2006.01)
A01N 25/00 (2006.01)
A01N 25/30 (2006.01)
C12R 1/07 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
C12R 1/02 (2006.01)
A01N 25/22 (2006.01)
A01P 15/00 (2006.01)

(54) СПОСОБ ИНОКУЛЯЦИИ РАСТЕНИЯ

(31) **1413333.4**

(32) **2014.07.28**

(33) **GB**

(43) **2017.06.30**

(86) **PCT/GB2015/052170**

(87) **WO 2016/016629 2016.02.04**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
АЗОТИК ТЕКНОЛОДЖИЗ ЛТД (GB)

(72) Изобретатель:
Дэнт Дэвид, Кларк Иэн (GB)

(74) Представитель:
**Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатьев
А.В. (RU)**

(56) N. ESKIN ET AL.: "Research Progress and Perspectives of Nitrogen Fixing Bacterium, Gluconacetobacter diazotrophicus, in Monocot Plants", INTERNATIONAL JOURNAL OF AGRONOMY, vol. 60, no. 10, 7 May 2014 (2014-05-07), 7 May 2014 (2014-05-07), pages 1532-13, XP055218778, ISSN: 1687-8159, DOI: 10.1016/j.chemosphere.2006.07.067 page 1, paragraph 1 page 2, paragraph 2 page 5, paragraph 5.2 page 6, paragraph 6.3

ARIEL D. ARENCIBIA ET AL.: "Gluconacetobacter diazotrophicus Elicits a Sugarcane Defense Response Against a Pathogenic Bacteria Xanthomonas albilineans", PLANT SIGNALING & BEHAVIOR, vol. 1, no. 5, 1 October 2006 (2006-10-01), pages 265-273, XP055218806, US ISSN: 1559-2316 page 266, column 1

NIVALDO SCHULTZ ET AL.: "INOCULATION OF SUGARCANE WITH DIAZOTROPHIC BACTERIA 407 INOCULATION OF SUGARCANE WITH DIAZOTROPHIC BACTERIA (1)", EMBRAPA-ACRE. BR 364, vol. 38, 1 May 2014 (2014-05-01), pages 407-414, XP055218853, page 410, column 2 - page 411, column 1

PATIL NITA ET AL.: "Liquid formulations of Acetobacter diazotrophicus L1 and Herbaspirillum seropedicae J24 and their field trials on wheat", INTERNATIONAL JOURNAL OF ENVIRONMENTAL SCIENCES, vol. 3, no. 3, 1 November 2012 (2012-11-01), XP055218863, DOI: 10.6088/ijes.2012030133019 page 1119 - page 1120

(57) Способ инокуляции растения азотфиксирующими бактериями, такими как *Gluconacetobacter diazotrophicus*, при этом указанный способ включает введение азотфиксирующих бактерий в рану растущего растения, например в недавно срезанную траву. Инокуляция таким способом приводит к улучшению ростовых характеристик, в том числе к повышенной зелени трав. Также описываются и заявляются новые композиции, подходящие для применения в данном способе, вместе с наборами для их получения.

B1**037703****037703****B1**

Область изобретения

Изобретение относится к способу инокуляции растений азотфиксирующими бактериями и к композициям и наборам, подходящим для применения в таком способе.

Уровень техники

Азотфиксирующую бактерию *Gluconacetobacter diazotrophicus*, ранее известную под названием *Acetobacter diazotrophicus* (Gillis, M. et al. Int. J. Syst. Bacteriol. 39:361-364; 1989), впервые выделили из корней и стеблей сахарного тростника (Cavalcante, V. A., et al. (1988) Plant Soil Vol. 108, p. 23-31). Путем введения $^{15}\text{N}_2$ было показано, что *G. diazotrophicus* фиксирует азот внутри растений сахарного тростника (Sevilla, M. et al. Mol. Plant Microbe Interact. 14:358-366; 2001; Boddey, R. M. et al. Plant Soil 252:139-149; 2003), и что данная бактерия способна экскретировать практически половину фиксированного азота в форме, которая потенциально доступна для растений (Cojho, E. H et al. Fed. Eur. Microbiol. Soc. Microbiol. Lett. 106:341-346; 1993). Данная бактерия проникает между клеток меристемы корней сахарного тростника и в точках роста боковых корней колонизирует межклеточное пространство, а также ксилему, без образования клубеньков (James, E. K. et al. J. Exp. Bot. 52:747-760; 2001). Были продемонстрированы условия, при которых может происходить внутриклеточная колонизация бактерией Gd, что обеспечивает возможность фиксации азота не клубеньковыми эндосимбионтами (EP-B-1422997 и Cocking, E.C., et al. (2006) In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant Vol. 42, No. 1, p 74-82). В частности, бактерии вводят в среду роста растения, пока растение прорастает, или в пределах 7 дней после этого периода.

В WO 2011/144741 предполагается, что такие бактерии, как Gd, можно вводить в стебли сахарного тростника для улучшения фиксации азота. Понятно, что такая методика не единственная, которую можно использовать в какой-либо крупномасштабной сельскохозяйственной технологии.

Заявители установили, что растущие растения можно с успехом инокулировать азотфиксирующими бактериями.

Краткое описание изобретения

В соответствии с настоящим изобретением предлагается способ инокуляции растения азотфиксирующими бактериями, при этом указанный способ включает введение азотфиксирующих бактерий в рану растущего растения.

Было установлено, что при нанесении на рану, в частности, при нанесении на поверхность раны ткани растения, последующий рост растения улучшается. Например, может улучшаться показатель биомассы или урожайность и/или может увеличиваться число цветков. Это может быть обусловлено колонизацией ткани растения азотфиксирующими бактериями подобно тому, что описано, к примеру, в документе EP-B-1422997, хотя тот факт, что это может происходить при нанесении таким способом, является неожиданным. Азотфиксирующие бактерии, колонизировавшие ткань растения, могут быть источником внутриклеточного азота, который улучшает рост растения. Таким образом, способ по настоящему изобретению представляет собой полезное средство введения препарата, улучшающего рост растения, в растущие растения.

Азотфиксирующие бактерии предпочтительно должны быть такими бактериями, которые могут локализоваться внутриклеточно в растительной клетке. В конкретном варианте осуществления ими являются внутриклеточно колонизирующие симбиотические азотфиксирующие бактерии *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Gd), к примеру, *Gluconacetobacter diazotrophicus* штамм IMI 504998 (прежде IMI 501986) или IMI 504958 (прежде IMI 504853), каждый из которых депонировали в CABI (Великобритания) 21 сентября 2012 года и 22 мая 2015 года, соответственно. Такие штаммы являются новыми и составляют дополнительный аспект настоящего изобретения. В качестве альтернативы, азотфиксирующие бактерии могут представлять собой вид *Herbaspirillum*. Другие азотфиксирующие бактерии включают *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Clostridium*, *Rhizobium*, *Klebsiella* и *Spirillum lipoferum*.

В конкретном варианте осуществления азотфиксирующие бактерии вводят вместе или в комбинации со штаммом *Terribacillus*, что описано заявителями в находящейся одновременно на рассмотрении международной заявке на патент, которая заявляет приоритет в соответствии с заявкой на патент Великобритании № 1400840.3. Заявители установили, что такой штамм может улучшать активность азотфиксирующих бактерий. Подходящие штаммы *Terribacillus* включают *Terribacillus saccharophilus*, *Terribacillus halophilus*, *Terribacillus goriensis* или *Terribacillus aidingensis*, но, в частности, представляют собой штамм *Terribacillus saccharophilus*. *Terribacillus* вводят отдельно или в смеси с азотфиксирующими бактериями. *Terribacillus*, может находиться в виде однородной смеси с азотфиксирующими бактериями (и более того, IMI 501986 (теперь IMI 504998) был классифицирован как консорция Gd и *Terribacillus*), или ее можно вводить в форме совместной культуры или форме смешанной культуры.

Рана может представлять собой результат случайного или естественного повреждения, причем доступность дополнительного азота может способствовать репаративному росту. Однако в конкретном варианте осуществления рана представляет собой результат повреждения, вызванного таким действием, как скашивание (газонная трава), срезание (силосные и сенокосные культуры), нарезка черенков (бананы, ананас, сахарный тростник, сорго, рис, голубиный горох, хлопчатник, абака, рами), обрезка (плодовые деревья, вьющиеся растения), поедание сельскохозяйственными животными или сбор урожая. Другие процессы, такие как боронование, в ходе которого растения могут непреднамеренно или не полно-

стью повреждаться, могут быть неподходящими в ряде случаев. В частности, раны могут быть обнаружены в 'наземной' части растения, такой как листья или стебли.

Следовательно, способ по настоящему изобретению может дополнительно включать предварительную стадию нанесения 'повреждения' растению, в частности, путем скашивания, срезания, нарезки черенков, обрезки или сбора урожая. Азотфиксирующие бактерии соответствующим образом наносят в пределах относительно короткого периода времени после осуществления таких действий, например, в пределах 48 ч, например, в пределах 24 ч, как, например, в пределах 10 ч, и предпочтительно в пределах 1-2 ч с момента нанесения повреждения растению.

Доставку бактерий осуществляют путем нанесения подходящего состава на раневой участок, в частности, на поверхность раны в форме композиции. Данная композиция может быть в форме жидкости, геля, пасты, которые можно наносить непосредственно или в разбавленной форме, или она может быть в форме твердой композиции, такой как порошковая или гранулированная композиция, которую растворяют в жидкости, такой как вода, перед использованием. В твердых композициях бактерии будут использоваться, как правило, в высушенной форме, например, в высушенной замораживанием форме, которые могут быть восстановлены путем добавления воды. При необходимости бактерии можно подвергнуть микроинкапсулированию с использованием известных из уровня техники способов для поддержания высокой жизнеспособности и устойчивости бактерий.

В конкретном варианте осуществления данная композиция находится в форме, подходящей для нанесения распылением на растения, и, таким образом, будет представлять собой концентрат для разведения, который может быть в форме жидкости или твердого вещества, в частности, в форме жидкости, или она может представлять собой разбавленную водную композицию, которую можно непосредственно наносить распылением. В качестве альтернативы, композиция может представлять с собой такую композицию, в которую можно погружать поверхность раны растения, к примеру, посредством окунания.

Количество азотфиксирующих бактерий, которые можно вводить, в любом конкретном случае будет варьироваться в зависимости от таких факторов, как тип обрабатываемых семян, конкретный штамм используемых азотфиксирующих бактерий, требуемый уровень улучшения прорастания и способ введения, а также требуемый эффект. Однако, как правило, раствор, содержащий от 1 до 1×10^7 бактерий на миллилитр наносимой композиции, например, от 10 до 10^3 бактерий на миллилитр композиции, например, от 50 до 200 бактерий на миллилитр композиции, и, в частности, 100 бактерий на миллилитр композиции, вводят в раны растения. Такой раствор может быть получен путем культивирования бактерий до легко выявляемого уровня, например, путем измерения оптической плотности, с последующим соответствующим разбавлением раствора.

Заявители установили, к примеру, что в случае определенных бактерий эффекты по отношению к такому свойству, как показатель биомассы, находятся под влиянием количества бактерий, наносимых дозозависимым способом. Это означает, что можно вводить разные дозы в зависимости от цели обработки. Например, в случае трав может потребоваться максимальное увеличение биомассы для пастбищной травы, тогда как в случае газонной травы или рулонного травяного газона предпочтительным может быть медленный рост. В таких случаях количество вводимых бактерий будет выбираться с тем, чтобы обеспечить оптимальное получение биомассы целевых видов травы, что проиллюстрировано на примере ниже.

В определенном варианте осуществления композиция дополнительно содержит питательное вещество для азотфиксирующих бактерий, например, данная композиция может содержать 3% вес/объем сахаразы, что описано в документе EP-B-1422997.

Азотфиксирующие бактерии могут быть единственным активным компонентом в данной композиции, или их могут объединять с дополнительными агрохимически активными компонентами, такими как инсектициды, фунгициды или регуляторы роста растений, если это необходимо.

Композиция может дополнительно содержать добавки или вспомогательные средства, такие как загустители, диспергирующие средства, разбавители, увлажняющие средства, твердые носители и т. д., известные из уровня техники.

В определенном варианте осуществления данная композиция дополнительно содержит полисахарид или приемлемое для сельского хозяйства поверхностно-активное вещество или их комбинацию.

В определенном варианте осуществления данная композиция дополнительно содержит приемлемое для сельского хозяйства поверхностно-активное вещество. Наличие поверхностно-активного вещества придает композиции способность к относительно свободному течению по всей поверхности ран с тем, чтобы облегчать проникновение азотфиксирующих бактерий.

Подходящие поверхностно-активные вещества или детергенты включают неионогенные детергенты, как, например, реализуемые под торговой маркой 'Tween®', например, Tween 80.

Tween 80 представляет собой неионогенный детергент, который на 70% состоит из жирной кислоты - олеиновой кислоты, а остальная часть представляет собой комбинацию линолевой, пальмитиновой и стеариновой кислот. Показатель pH 1% раствора находится в диапазоне от 5,5 до 7,2. Его широко используют для эмульгирования и диспергирования веществ в медицинских и пищевых продуктах. Его

активность в качестве антибактериального средства незначительна или отсутствует (Dawson et al. (1986) Data for Biochemical Research, 3rd ed., Oxford University Press (New York, NY: 1986), p. 289).

Количество вводимого в рану растения поверхностно-активного вещества в комбинации с азотфиксирующими бактериями (а также необязательно с полисахаридом, что дополнительно описано ниже) должно быть достаточным для получения эффекта улучшенного роста растения. Количество будет варьироваться в зависимости от разных факторов, таких как определенное поверхностно-активное вещество, тип обрабатываемого растения, происхождение раны, конкретный штамм задействованной азотфиксирующей бактерии и способ введения. Однако, как правило, композиция содержит от 0,0005 до 10% объем/объем, как, например, от 0,0005 до 0,5% объем/объем, к примеру, от 0,0005 до 1% объем/объем, в том числе от 0,0005 до 0,2% объем/объем, например, от 0,0005 до 0,15% объем/объем, именно и, в частности, приблизительно 0,1% объем/объем.

В дополнительном варианте осуществления данная композиция содержит полисахарид. Подходящие для использования в данной композиции полисахариды включают гидроколлоидные полисахариды, полученные из источников растительного, животного или микробного происхождения.

В частности, они включают выделяемые в виде камеди полисахариды, такие как аравийская камедь, камедь гхатти, камедь карайи и трагакантовая камедь, производные целлюлозы, такие как карбоксиметилцеллюлоза, метилцеллюлоза, гидроксипропилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза или микрокристаллическая целлюлоза, виды крахмала и их производные, включающие, к примеру, кукурузный крахмал, маниоковый крахмал, картофельный крахмал, рисовый крахмал, пшеничный крахмал и их модифицированные варианты, такие как прежелатинизированный крахмал, окисленный крахмал, этилированный крахмал, декстрины или мальтодекстрины из крахмала, пектин, полисахариды, полученные из морских водорослей, такие как агар, альгинаты, каррагинан и фуцелларан, камеди из семян, такие как гуаровая камедь и камедь бобов рожкового дерева, полисахариды, полученные путем микробиологической ферментации, такие как ксантановая камедь и геллановая камедь, а также азотсодержащие полисахариды, такие как хитозан; или их смесь.

В конкретном варианте осуществления полисахарид представляет собой выделяемый в виде камеди полисахарид, такой как аравийская камедь, камедь гхатти, камедь карайи или трагакантовая камедь. Конкретным примером полисахарида является аравийская камедь.

Аравийская камедь представляет собой природную камедь, которую собирают в виде продуктов выделения разных видов акациевых деревьев (Fang et al. 2010 (2010) *Biomolecules*: 11, 1398-1405); она представляет собой сложный полисахарид, который интенсивно использовали в широком диапазоне отраслей промышленности, в том числе в лакокрасочной, клеевой, фармацевтической, текстильной и пищевой отраслях. Полагают, что аравийская камедь из дерева акации представляет собой разветвленный полимер галактозы, рамнозы, арабинозы и глюкуроновой кислоты в виде кальциевой, магниевой и калиевой солей с молекулярной массой примерно 250000. Было показано (Badar, K.V. et al. (2011) *Recent Research in Science and Technology* 3 (5) 6-7), что вымачивание семян определенных растений в 1% растворе аравийской камеди в течение 24 часов до проращивания оказывает эффект в отношении прорастания семян. Кроме того, в документе WO 02/058466 сообщается о том, что определенные композиции, содержащие комбинации полисахаридов и пептидов, могут увеличивать урожайность культур.

Количество вводимого в рану растения полисахарида должно быть достаточным для получения улучшенного эффекта улучшенной фиксации азота, если нанесение осуществляют в комбинации с азотфиксирующими бактериями и также необязательно с поверхностно-активным веществом. Оно будет варьироваться в зависимости от разных факторов, таких как используемый определенный полисахарид, тип обрабатываемого растения, происхождение раны, конкретный штамм задействованной азотфиксирующей бактерии и способ введения. Однако, как правило, используют композицию, содержащую от 0,1 до 1% вес./вес., например, от 0,1 до 0,5% вес./вес., и, в частности, приблизительно 0,3% вес./вес. полисахарида.

В одном варианте осуществления композиция содержит как полисахарид, так и приемлемое для сельского хозяйства поверхностно-активное вещество. Было установлено, что в некоторых случаях эти компоненты улучшают эффект азотфиксирующих бактерий, и, по-видимому, действуют синергически с получением более значительного улучшения эффекта. Растения, обработанные композицией, содержащей эти компоненты, могут показывать увеличение темпов роста, что подтверждается увеличенным сухим весом обработанных растений.

Новые композиции, содержащие указанные выше компоненты, составляют дополнительный аспект настоящего изобретения. Таким образом, дополнительный аспект настоящего изобретения предлагает приемлемую для сельского хозяйства композицию, содержащую азотфиксирующие бактерии, в частности, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, и полисахарид, поверхностно-активное вещество или их комбинацию.

Азотфиксирующие бактерии, описанные выше, и, в частности, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, подходящим образом присутствуют в описанных выше количествах. Аналогично, полисахарид представляет собой описанный выше полисахарид, такой как выделяемый в виде камеди полисахарид, к примеру, аравийскую камедь, и она включена в композицию в описанном выше количестве, к примеру, в

концентрации от 0,1 до 1% вес./вес. полисахарида. Кроме того, поверхностно-активное вещество представляет собой предпочтительно поверхностно-активное вещество, описанное выше, в виде неионогенного детергента, к примеру, поверхностно-активное вещество, которое на 70% состоит из жирной кислоты - олеиновой кислоты, а остальная часть представляет собой комбинацию линолевой, пальмитиновой и стеариновой кислот. В конкретном варианте осуществления данная композиция будет содержать от 0,0005 до 10% об./об. поверхностно-активного вещества, например, от 0,0005 до 0,2% об./об. поверхностно-активного вещества.

В еще одном дополнительном аспекте настоящее изобретение предлагает набор для получения приемлемой в сельском хозяйстве композиции, содержащей азотфиксирующие бактерии. В таких наборах азотфиксирующие бактерии и, в частности *Gluconacetobacter diazotrophicus*, могут храниться отдельно от других компонентов композиции, например, в отдельных контейнерах, или в упаковке или контейнере, состоящих из двух частей. Азотфиксирующие бактерии можно высушивать замораживанием. Другие компоненты могут быть в форме концентрата, для удобства хранения или транспортировки, готового к разведению, например, водой, перед использованием. Концентраты такой природы будут содержать те же самые компоненты, что в перечисленных выше композициях, но обычно в более высоких уровнях. Таким образом, например, концентрат может содержать от 1 до 10% вес./вес., например, от 1 до 5% вес./вес., и, в частности, приблизительно 3% вес./вес. полисахарида, при этом десятикратное разбавление даст в результате композицию, подходящую для использования, например, в способе по настоящему изобретению. Аналогично, поверхностно-активное вещество может находиться в концентрате в количестве от 0,005 до 2% об./об. Другие компоненты, такие как, например, питательное вещество для азотфиксирующих бактерий, предпочтительно включены в концентрат в требуемой концентрации.

Наборы такого типа можно использовать для получения композиции по настоящему изобретению, которую можно сразу же использовать. В частности, любой концентрат разбавят водой до соответствующего объема, после чего в него сразу добавляют азотфиксирующие бактерии.

Настоящее изобретение обеспечивает возможность нанесения на широкий диапазон культур и доставку в него внутриклеточных бактерий, осуществляющих фиксацию азота. В частности, эти культуры могут представлять собой многолетние, двухлетние или возобновляемые однолетние культуры, включающие без ограничения плодовые деревья и кустарники (например, растения черники, малины и чайного куста), выходящие растения, фуражные культуры (люцерну и траву для силосования, сенокоса или непосредственного поедания сельскохозяйственными животными), газонную траву и растения, образующие живые изгороди, лесные культуры, садовые культуры и травянистые растения (например, лук-скороду, аспарагус, баклажан).

Ранее сообщили о том, что Gd может улучшать урожай культур, богатых сахарозой, таких как сахарная свекла или сахарный тростник (WO 2010/022517). Однако заявители установили, что при использовании препарата по настоящему изобретению улучшение наблюдали для культур, богатых сахарозой, что составляет конкретный вариант осуществления настоящего изобретения.

В конкретном варианте осуществления способ и композицию по настоящему изобретению применяют по отношению к траве, такой как газонная трава, рулонный травяной газон или пастбищная трава, сразу или вскоре после скашивания. Использование этого препарата приводит к улучшению роста травы, что подтверждается увеличенным сухим весом инокулированной травы в сравнении с неинокулированной. Очевидно, что азотфиксирующие бактерии способны проникать в траву через раны, являющиеся результатом процедуры скашивания, и колонизируют травы внутриклеточно, приводя к улучшенным ростовым характеристикам.

Кроме того, было установлено, что колонизация с использованием Gd может повышать уровни хлорофилла в растениях и, в частности, в видах травы, таких как пастбищная, газонная трава или рулонный травяной газон. Повышение уровня хлорофилла связано не только с содержанием азота, но также и с уровнем зелености растений, причем данное свойство является особенно желательным в таких применениях, как в отношении газонной травы, у которой высокие уровни зелености являются полезными. Подробное описание настоящего изобретения

Далее настоящее изобретение будет более подробно описано с помощью примеров со ссылкой на прилагаемые диаграммы, на которых:

фиг. 1 представляет собой график, на котором показаны средние значения сухого веса (г) неинокулированной и инокулированной срезанной травы;

фиг. 2 представляет собой график, на котором показаны показатели сухого веса наземной части инокулированной срезанной травы, обработанной Gd и сахарозой, Tween и/или аравийской камедью или их комбинациями;

на фиг. 3 изображен пример подготовки к вегетативному размножению чайного куста, где на (А) изображен удаленный черенок, а на (В) в виде диаграммы представлены отрезки каждого черенка, отобранного для выделения ДНК;

на фиг. 4 показано изображение геля с продуктами ПЦР, полученными из образцов чайного куста, которые инокулировали с использованием Gd; все продукты из полосы, соответствующих контрольным растениям, подвергали секвенированию и подтверждали в виде неспецифического связывания. Секвени-

рованные продукты из полосы, соответствующие инокулированным растениям, подтверждали как относящиеся к *Glucanacetobacter diazotrophicus*;

фиг. 5 представляет собой график, на котором показаны эффекты разных препаратов в отношении показателей биомассы срезанной травы;

на фиг. 6 показаны результаты теста для определения эффекта Gd в отношении числа цветочных головок у травы; и

фиг. 7 представляет собой график, на котором показаны результаты обработок разными композициями в отношении показателей биомассы срезанной травы.

Однако специалисту в данной области будет очевидно, что точные подробности не требуются для практической реализации настоящего изобретения. Следующие описания конкретных вариантов осуществления настоящего изобретения представлены для целей иллюстрации и описания. Они не предназначены для того, чтобы быть исчерпывающими или ограничивать настоящее изобретение точными раскрытыми формами. Очевидно, что возможны многие модификации и вариации в свете вышеописанных идей. Варианты осуществления показаны и описаны для того, чтобы наилучшим образом объяснить принципы настоящего изобретения и его практического применения, чтобы тем самым дать возможность другим специалистам в данной области техники наилучшим образом использовать настоящее изобретение и различные варианты осуществления с различными модификациями, которые подходят для конкретного наменного использования.

Пример 1. Нанесение на срезанную траву.

Методика.

Культивирование *G. diazotrophicus*: *G. diazotrophicus* штамм IMI 501986 (теперь IMI 50998) с плазмидой pRGS561, экспрессирующей GUS, культивировали на среде ATGUS, [0,8% (вес./об.) агар, дрожжевой экстракт (2,7 г л⁻¹), глюкоза (2,7 г л⁻¹), маннит (1,8 г л⁻¹), буфер MES (4,4 г л⁻¹), K₂HPO₄ (4,8 г л⁻¹) и KH₂PO₄ (0,65 г л⁻¹), pH 6,5] согласно требованиям. Экспрессию гена b-глюкуронидазы (*gusA*) тестировали путем посева на среду ATGUS, содержащую X-Gluc (5-бром-4-хлор-3-индолил-бета-D-глюкуроновой кислоты циклогексиламмонийную соль) при 50 мг л⁻¹; образование темно-синих колоний указывало на экспрессию гена *gusA*.

Процедуры инокуляции.

Вводную суспензию *G. diazotrophicus* готовили с получением оптической плотности при 600 нм в 1,1, что соответствует приблизительно 10⁹ колониеобразующих единиц (CFU) на миллилитр. Число CFU определяли посредством серийного разведения, осуществляя посев на среду ATGUS (с добавлением при необходимости антибиотиков) и подсчета колоний бактерий после 4 дней инкубации в чашках Петри (28°C, в темноте). Суспензию разбавляли до 10⁻⁴ с получением раствора, содержащего примерно 100 бактерий на мл, готового для нанесения распылением, что описано ниже.

Стандартную навеску из 0,5 г семян травы *Lolium perenne* сорта *Cassiopeia* высевали в кассеты для рассады с компостом John Innes № 1 и слегка накрывали компостом.

Отдельные кассеты помещали в кассеты большего размера и обеспечивали соответствующим количеством воды в комнате для выращивания при цикле день/ночь 21°C/15°C, 16/8 ч. в течение 20 дней. После этого траву срезали на высоте 2 см над уровнем почвы с использованием ножниц (обрезки удаляли) и следующие препараты наносили с использованием бытового ручного мелкокапельного распылителя.

Эксперимент 1.

Препараты:

Контроль с водой + 3% сахарозы Gd + вода + 3% сахарозы.

Эксперимент 2.

Препараты:

Gd + вода.

Gd + вода + 3% сахарозы.

Gd + вода + 0,1% Tween.

Gd + вода + 0,3% аравийской камеди.

Gd + вода + 3% сахарозы + 0,1% Tween.

Gd + вода + 3% сахарозы + 0,3% аравийской камеди.

Gd + вода + 3% сахарозы + 0,1% Tween + 0,3% аравийской камеди.

Сухой вес ростков.

Ростки извлекали из агара пинцетом, и весь оставшийся на корнях агар отмывали. Каждый росток помещали в бумажный мешок и помещали в печь при 80°C на 48 ч, а затем взвешивали.

Результаты эксперимента 1 и эксперимента 2 показаны на фиг. 1 и 2 соответственно.

Результаты на фиг. 1 показывают существенное увеличение среднего значения сухого веса травы (на графике: 0,09676 г для неинокулированной и 0,1276 г для инокулированной). Эти показатели сухого веса значительно различались при P<0,01. Таким образом, инокуляция посредством такого способа отчетливо приводит к значительному улучшению роста.

Результаты, показанные на фиг. 2, показывают значимое различие (P<0,001) между Gd/S/T/GA и следующими наивысшими показателями сухого веса (Gd/T и Gd/S/T), демонстрируя синергический эф-

фект комбинации из трех компонентов. Gd и Gd/S значимо не различались при $P=0,05$.

Пример 2. Колонизация чайного куста (*Camellia sinensis*) с использованием *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Azoticus).

Вегетативное размножение из стеблевого черенка.

Стандартным способом вегетативного размножения клонов чайного куста является использование однолистного черенка. Из более крупных стеблей, содержащих примерно от четырех до шести узлов и апикальные клетки, части стебля и листья отбирали исходя из состояния тканей (т. е. отсутствия насекомых и заболеваний). Участки, выбранные для отрезания, находились между участками красной и зеленой древесины, как рекомендовано в Yamasaki et al. Soil and Crop Management, (2008) SCM-23. Было установлено, что недавно созревшие побеги, содержащие слегка окрашенную в красный цвет кору, прилегающую к зрелым листьям с активно развивающимися пазушными почками, являются наилучшими с точки зрения укоренения.

Из предпочтительных частей отбирали образцы, содержащие часть стебля длиной 3-5 см и один здоровый лист. Каждую часть стебля вырезали путем осуществления диагонального надреза (1) примерно на 0,5 см выше листа (2) и другого диагонального надреза ниже листа вблизи междоузлия (3), избегая сдавливания или сплющивания раневого участка (см. фиг. 3А).

Нижнюю часть каждого стеблевого черенка чайного куста погружали в 1% раствор индолилмасляной кислоты и высаживали в отдельные горшки; при этом черенки высаживали таким образом, чтобы стебель принимал прямое или незначительно наклоненное положение, не касаясь листом почвы. Каждый горшок содержал смесь для черенков из песка и компоста John Innes номер 1 в соотношении 4:1, пропитанную водой. На отрезанные верхушки каждого черенка наносили 20 мкл воды или 20 мкл Gd при $2,5 \times 10^5$ CFU/мл в воде, при этом влажность для каждого образца поддерживали посредством накрывания каждого горшка пластиковым листом и обрызгивания небольшим количеством воды.

После 3 месяцев выращивания, с целью подтверждения успешной колонизации стеблевых черенков при использовании Gd неинокулированные и инокулированные стеблевые черенки извлекали из горшков. Каждый черенок затем разделяли на части, которые представляли собой (а) верхушку побега, включающую участок инокуляции (4) (фиг. 3В), (b) узловую часть (5) на фиг. 3В и (С) нижнюю часть побега, включающую любую ткань корня, (6) на фиг. 3В. Эти части затем подвергали быстрой заморозке в жидком азоте.

Выделение ДНК из каждой части черенка (т.е. 4, 5 и 6 на фиг. 3В) осуществляли с использованием реагента TRIzol согласно протоколу производителя и проводили ПЦР. Реакцию ПЦР проводили в виде двухстадийной реакции, описанной в публикации Tian et. al., (2009); на первой стадии использовали GDI-25F (5'-TAGTGGCGGACGGGTGAGTAACG-3') и GDI-923R (5'-CCTTGCGGGAACAGCCATCTC-3'), которые при амплификации давали продукт размером 899 п.о., содержащий ампликон для праймеров GDI139F (5'TGAGTAACGCGTAGGGATCTG-3') и GDI916R (5'-GGAAACAGCCATCTCTGACTG-3'), причем последние конструировали на основе информации о последовательности 16S рДНК, доступной в базе данных GenBank. После начальной стадии денатурации при 95°C в течение 3 мин следующий температурный профиль повторяли 32 раза: денатурация в течение 20 с при 95°C, отжиг в течение 45 с при 55°C и удлинение в течение 20 с при 72°C с конечной стадией удлинения в течение 5 мин при 72°C. Один микролитр этого продукта ПЦР отбирали и использовали в качестве матрицы для второй стадии ПЦР с использованием GDI39F и GDI916R. Модификации параметров на втором раунде включали повышение температуры отжига до 62°C в течение 15 с и увеличение числа циклов до 39. Продукты амплификации ПЦР анализировали в 1% агарозном геле, окрашенном бромидом этидия, а также секвенировали для подтверждения идентичности продукта (фиг. 4).

Интересно, что AzGd не выявляли в части 4 черенка чайного куста, что указывало на то, что AzGd перемещалась базипетально от раневого участка после инокуляции, но при этом выявляли в частях 5 и 6, соответственно.

Секвенирование и последующие результаты, полученные с помощью BLAST, подтвердили, что полосы, видимые для части 1 контрольных растений, являлись результатом неспецифического связывания используемого набора праймеров, при этом 4 полосы, наблюдаемые для частей 2 и 3 инокулированной ткани, были идентифицированы как относящиеся к *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pa15 (при 100% идентификации, покрытии 86% и E-величине $7e-04$). Данные результаты свидетельствуют о том, что AzGd, даже при низком числе копий в инокулированной ткани, успешно колонизировала *Camellia sinensis* после инокуляции в раневой участок. Вероятно, это является первым примером колонизации многолетнего растения при использовании Gd.

Пример 3. Исследование эффекта препарата в отношении показателей биомассы травы.

Траву выращивали в камере для выращивания растений (Fitotron®) (23°C/15°C при влажности 65%) в кассетах для рассады с использованием компоста John Innes № 1 в течение 2 недель. Траву затем срезали на высоте 8 см и на нее сразу же наносили распылением 10 мл препарата, состав которого изложен ниже, с использованием бытового распылителя.

Препараты:

1. Вода.
2. 3% сахарозы + 0,1% Tween + 0,3% аравийской камеди.
3. Вода + Gd ($2,5 \times 10^5$ CFU/мл).
4. Вода + 3% сахарозы + 0,1% Tween + 0,3% аравийской камеди + Gd ($2,5 \times 10^3$ CFU/мл).
5. Вода + 3% сахарозы + 0,1% Tween + 0,3% аравийской камеди + Gd ($2,5 \times 10^4$ CFU/мл).
6. Вода + 3% сахарозы + 0,1% Tween + 0,3% аравийской камеди + Gd ($2,5 \times 10^5$ CFU/мл).
7. Вода + 3% сахарозы + 0,1% Tween + 0,3% аравийской камеди + Gd ($2,5 \times 10^6$ CFU/мл).
8. Вода + 3% сахарозы + 0,1% Tween + 0,3% аравийской камеди + Gd ($2,5 \times 10^7$ CFU/мл).

Траву помещали обратно в Fitotron на следующие 2 недели при аналогичных ростовых условиях. 5 растений, выбранных случайным образом, срезали на уровне почвы для составления одного образца и взвешивали. Это повторяли еще пять раз с получением в целом шести образцов, соответствующих каждому препарату.

Эти образцы высушивали в печи в течение 48 ч и взвешивали.

Результаты показаны на фиг. 5. Данные результаты указывают на то, что при условии наличия некоторого количества сахарозы которая обеспечивает поддержание роста Gd, биомасса травы увеличивалась при добавлении Gd в зависимости от состава. Более того, увеличение было дозозависимым, при этом оптимальный рост наблюдали при $2,5 \times 10^6$ CFU/мл. Таким образом, такая доза может быть полезной, если подлежащая обработке трава представляет собой пастбищную траву, в случае которой максимальное количество биомассы является полезным. Однако, если подлежащая обработке трава представляет собой газонную траву или рулонный травяной газон, более низкий показатель биомассы с улучшенной зеленостью может быть полезным в плане улучшения внешнего вида без возрастания потребности в дополнительном срезании или скашивании. В данном случае можно использовать дозировку, составляющую либо менее, либо более $2,5 \times 10^6$ CFU/мл.

Пример 4. Полевое испытание.

Состав, содержащий воду + 3% сахарозы + 0,1% Tween + 0,3% аравийской камеди + Gd ($2,5 \times 10^5$ CFU/мл), нанесли на отдельный участок срезанной травы площадью 1 м^2 (стандартный газон на основе плевела *Lolium perenne*) по сравнению с участком неинкубированной срезанной травы площадью 1 м^2 , который обрабатывали только водой (контроль).

Состав и воду наносили в пределах 30 минут после скашивания травы, используя для работы бытовой мелкокапельный распылитель. Контрольный участок ограждали от обрабатываемого участка посредством пластиковой перегородки. Нанесение осуществляли ближе к вечеру в безветренную погоду.

На участках площадью 1 м^2 формировали подвыборки с использованием проволоочной сетки с квадратами площадью 20 см путем подсчета числа полностью вытянувшихся и сформировавшихся цветочных головок.

Результаты для каждого квадрата площадью 20 см на каждом участке усредняли, и данные результаты показаны на фиг. 6. Очевидно, что препарат на основе Gd, наносимый таким способом, в значительной степени оказывает воздействие на рост соцветий.

Пример 5. Сравнение компонентов композиции.

Способ из примера 3 повторяли с использованием разных композиций, включающих отдельные компоненты композиции, использованной в том эксперименте. Более конкретно, в данном эксперименте использовали следующие композиции.

Препараты:

1. Вода.
2. Вода + Gd ($2,5 \times 10^5$ CFU/мл).
3. Вода + 3% сахарозы + 0,1% Tween + 0,3% аравийской камеди + Gd ($2,5 \times 10^5$ CFU/мл).
4. 0,3% аравийской камеди + Gd ($2,5 \times 10^5$ CFU/мл).
5. 3% сахарозы + Gd ($2,5 \times 10^5$ CFU/мл).
6. 0,1% Tween + Gd ($2,5 \times 10^5$ CFU/мл).

Траву AberGlyn выращивали в почве с компостом John Innes № 1 в течение 2 недель в камере для выращивания растений (Fitotron®) при $23/15^\circ\text{C}$, влажности 80%. Траву срезали на высоте 8 см с использованием ножниц, удаляли обрезки и на траву сразу же наносили распылением 10 мл препарата с использованием бытового распылителя. Траву обратно помещали в камеру для выращивания растений и оставляли на следующие две недели.

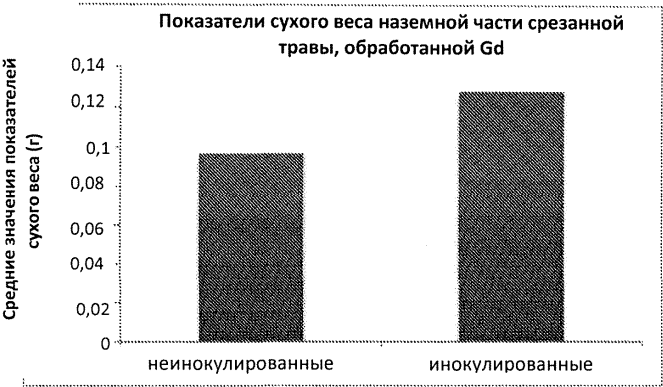
Случайным образом отбирали пять растений из кассеты, их объединяли для получения одного образца и взвешивали. Это повторяли еще пять раз с тем, чтобы в целом получить шесть образцов, соответствующих одному препарату. Траву сушили в течение 48 часов при 80°C , а затем взвешивали.

Результаты показаны на фиг. 7. Этот эксперимент показал, что используемый компонент оказывал эффект в отношении роста травы. В этом примере поверхностно-активное вещество обеспечивало наибольший прирост сухого веса. Аравийская камедь показала лишь незначительное улучшение по сравне-

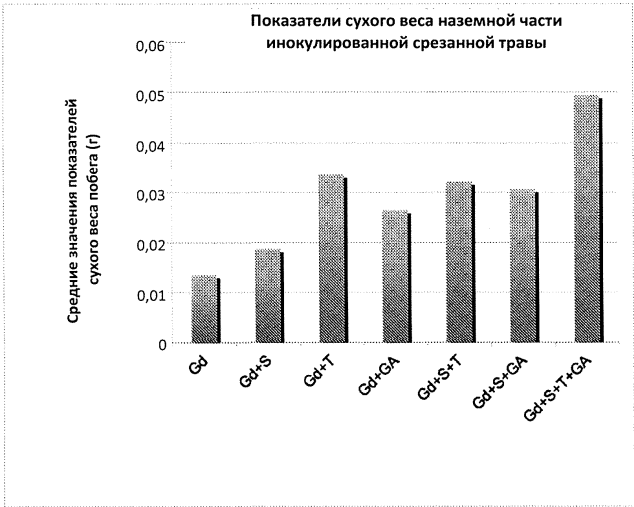
нию с контролем, предположительно вследствие того факта, что поверхностно-активное вещество может являться необходимым для содействия распространению Gd по растению и помогает жидкости проникать в раны травы (хотя в этом случае комбинация не показала ожидаемого улучшения). Снова же, эффективность препарата вода + Gd была подобной контролю, что указывает на то, что для колонизации ран Gd требует добавления по меньшей мере некоторых из данных компонентов.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

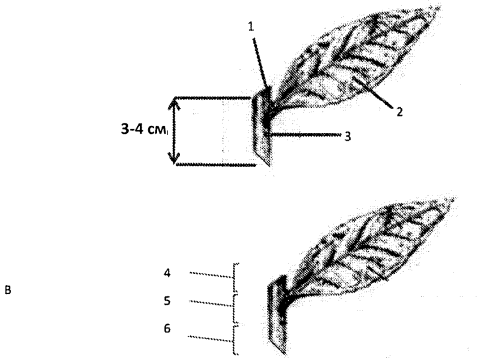
1. Композиция для введения *Gluconacetobacter diazotrophicus* в растение, содержащая *Gluconacetobacter diazotrophicus*, гидроколлоидный полисахарид и неионогенное поверхностно-активное вещество.
2. Композиция по п.1, где композиция содержит от 1 до 100 бактерий на миллилитр.
3. Композиция по п.1 или 2, где гидроколлоидный полисахарид представляет собой выделяемый в виде камеди полисахарид.
4. Композиция по п.3, где выделяемый в виде камеди полисахарид представляет собой полисахаридную камедь растительного происхождения, такую как аравийская камедь, или полисахаридную камедь бактериального происхождения, такую как ксантановая камедь.
5. Композиция по любому из пп.1, где неионогенное поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 80.
6. Композиция по п.1, где неионогенное поверхностно-активное вещество на 70% состоит из жирной кислоты - олеиновой кислоты, а остальная часть представляет собой комбинацию линолевой, пальмитиновой и стеариновой кислот.
7. Композиция по любому из пп.1-6, которая содержит от 0,0005 до 10% об./об. поверхностно-активного вещества.
8. Композиция по любому из пп.1-7, которая дополнительно содержит питательное вещество для *Gluconacetobacter diazotrophicus*.
9. Композиция по любому из пп.1-8, которая дополнительно содержит штамм *Terribacillus*.
10. Набор для введения *Gluconacetobacter diazotrophicus* в растение или семя, содержащий *Gluconacetobacter diazotrophicus*, гидроколлоидный полисахарид и неионогенное поверхностно-активное вещество.
11. Набор по п.10, где *Gluconacetobacter diazotrophicus* находятся в высушенной замораживанием форме.
12. Набор по п.10 или 11, где гидроколлоидный полисахарид и неионогенное поверхностно-активное вещество представляет собой концентрат, который может быть разбавлен и смешан с *Gluconacetobacter diazotrophicus* с получением композиции для введения *Gluconacetobacter diazotrophicus* в растения.
13. Штамм *Gluconacetobacter diazotrophicus*, обладающий азотфиксирующей активностью, депонированный в CABI (Великобритания) с регистрационным номером IMI 504998
14. Штамм *Gluconacetobacter diazotrophicus* IMI 504958, обладающий азотфиксирующей активностью, депонированный в CABI (Великобритания) с регистрационным номером IMI 504958.
15. Способ инокуляции растения азотфиксирующими бактериями *Gluconacetobacter diazotrophicus*, включающий предварительную стадию нанесения раны растущему растению и затем введение указанных бактерий в полученную рану, где указанные бактерии:
 - а) содержатся в композиции по любому из пп.1-9;
 - б) содержатся в наборе по любому из пп.10-12; или
 - в) содержат штамм по любому из пп.13-14.
16. Способ по п.15, где азотфиксирующие бактерии объединяют со штаммом *Terribacillus*.
17. Способ по любому из пп.15-16, где рана представляет собой результат проведения скашивания, срезания, нарезки черенков, обрезки, поедания сельскохозяйственными животными или сбора урожая.
18. Способ по п.17, где на предварительной стадии растение подвергают скашиванию, срезанию, нарезке черенков, обрезке или сбору урожая.
19. Способ по п.18, где азотфиксирующие бактерии соответственно наносят в пределах 1-2 ч после указанной предварительной стадии.
20. Способ по любому из пп.15-19, где растение представляет собой многолетнее, двухлетнее или возобновляемое однолетнее растение.
21. Способ по п.15, где растение представляет собой сельскохозяйственное растение, культурное растение, лесное растение или садовое растение.
22. Способ по п.15, где растение представляет собой плодовое дерево, кустарник, вьющееся растение, фуражную культуру, травянистое растение или траву.
23. Способ по п.22, где трава представляет собой газонную траву, пастбищную траву или рулонный травяной газон.



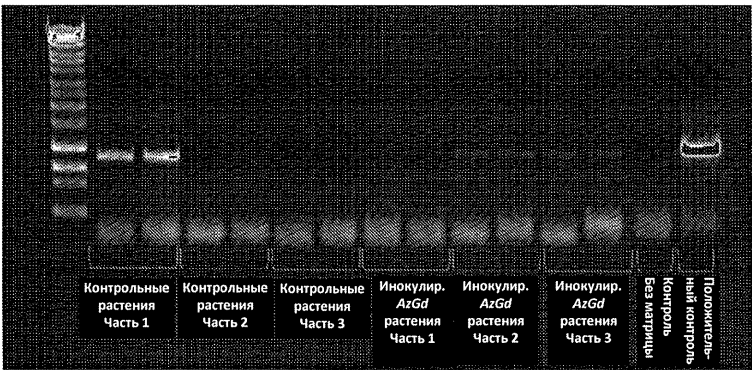
Фиг. 1



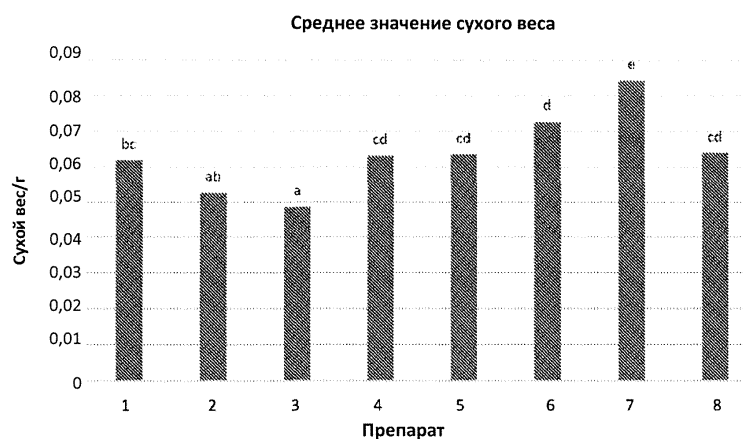
Фиг. 2



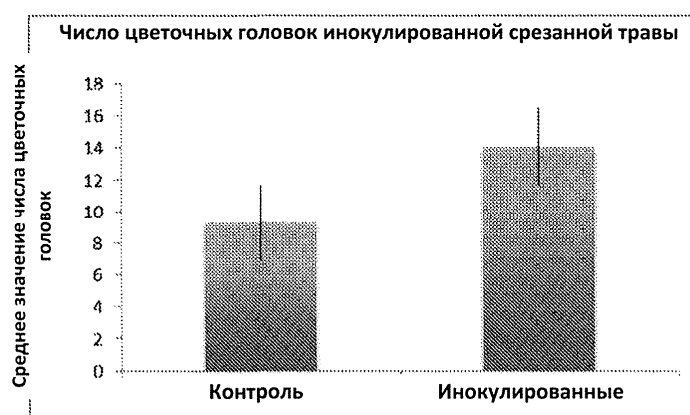
Фиг. 3



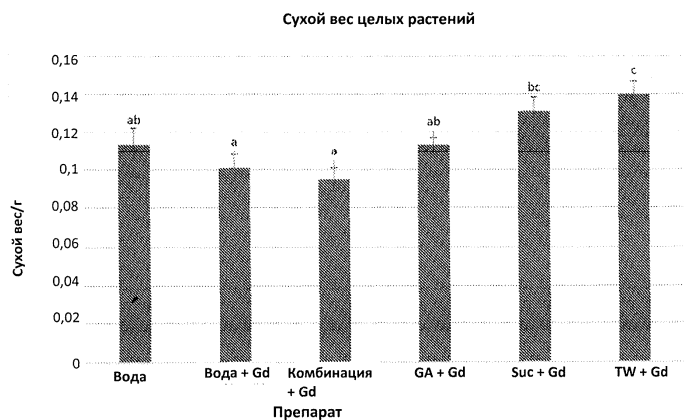
Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7

