

(19)



(10) **LT 4785 B**

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

- (11) Patento numeris: **4785** (51) Int. Cl. ⁷: **A01N 63/00**
C12N 1/20
- (21) Paraiškos numeris: **2000 039**
- (22) Paraiškos padavimo data: **2000 05 10**
- (41) Paraiškos paskelbimo data: **2000 12 27**
- (45) Patento paskelbimo data: **2001 04 25**
- (62) Paraiškos, iš kurios dokumentas išskirtas, numeris: —
- (86) Tarptautinės paraiškos numeris: **PCT/US98/24883**
- (86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: **1998 11 20**
- (85) Nacionalinio PCT lygio procedūros pradžios data: **2000 05 10**
- (30) Prioritetas: **974938, 1997 11 20, US**
994035, 1997 12 18, US
- (72) Išradėjas:
Jos M. RAAIJMAKERS, US
David M. WELLER, US
Linda S. THOMASHOW, US
R. James COOK, US
Zhengyu HUANG, US
Dmitri V. MAVRODI, US
- (73) Patento savininkas:
THE UNITED STATES OF AMERICA, represented by THE SECRETARY OF
AGRICULTURE, 1400 Independence Avenue S. W., Washington, DC 20250-
0302, US
WASHINGTON STATE UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION, N.E. 1615
Eastgate Boulevard, Pullman, WA 99163, US
- (74) Patentinis patikėtinis:
Marija LENKUTIENĖ, Patentinių paslaugų centras, UAB, J. Basanavičiaus g.
11/1, 2600 Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:

Biologinės medžiagos kovai su šaknų ligomis

(57) Referatas:

LT 4785 B

Siūlomi fluorescentinių *Pseudomonas spp.* kamieniai, efektyvūs kovai su ligomis, sukeliamomis vienos ar kelių *Rhizoctonia*, *Gaeumannomyces graminis*, *Phytophthora*. Siūlomi biologiniai kamieniai pasižymi unikaliu genotipu, identifikuojamu pagal jiems charakteringą juostinį modelį. Siūlomiems kamienams būdinga šaknų kolonizavimo geba, išsiskirianti didesniu populiacijos tankiu ant šaknų bei kolonizavimo aktyvumu, lyginant su žinomais Gg slopinančiais kamienais. Kita savybė - kamieno gebėjimas atkartoti biologinės kovos lygį, natūraliai gaunamą dirvoje TAD ("iššutimo" slopinimo) sąlygomis. Pateikti būdai kamienams atskirti bei identifikuoti. Pateikti kamienų panaudojimo būdai kovoje su Gg sukeltomis ligomis. Aprašytos transgeninės fluorescentinės *Pseudomonas* rūšys, pasižyminčios užkoduotomis antibiotiko 2,4-diacetilflorogliucinolio susidarymui padėtimis, o taip pat turinčios biosintezės vietas, koduojančias stabiliai fiksuojamo genome antibiotiko fenazin-1-karboksirūgšties sintezę.

Šis išradimas yra skirtas biologinei kovai su viena ar daugiau *Rhizoctonia*, *Gaeumannomyces graminis* ir *Pythium* sukeliamomis augalų šaknų ligomis, naudojant fluorescentinius *Pseudomonas* spp. kamienus ir ypač kamienus, kurie pasižymi unikalia smulkiagrūdžių kultūrų šaknų kolonizavimo geba, ir biologinės kovos su smulkiagrūdžių kultūrų šaknų puvinio ir ligomis bei velėnos žolių "iššutimo" dėmėmis aktyvumu. Išradimas taip pat susijęs su atskyrimu ir identifikavimu biologinei kovai skirtų kamienų, turinčių savyje biosintezės vietas (lokusus), kurios koduoja antibiotiko 2,4-diacetilflorogliucinolio gamybą, bei turi unikalų genotipą, įrodytą charakteringu juostiniu modeliu. Išradimas taip pat yra susijęs su kamienais, papildomai turinčiais biosintezės vietas, kurios koduoja antibiotiko fenazino-1-karboksirūgšties, kuri stabiliai fiksuojama genome, gamybą. Be to, išradimas apima transgeninių kamienų gavimo būdą ir jų pritaikymą kovai su augalų šaknų ligomis.

Rhizoctonia, *Pythium* ir *Gaeumannomyces graminis* sukeltos šaknų ligos kenkia svarbių kultūrų gamybai visame pasaulyje, mažina kultūrų derlingumą ir dėl to lemia žymius ekonominius nuostolius. Šaknų "iššutimo" liga, sukelia dirvožemio grybelio *Gaeumannomyces graminis* (Gg) (ypač rūšies *tritici* (Ggt)), *Rhizoctonia* šaknų puvinys, sukeliamas *Rhizoctonia solani* ir *R. oryzae*, ir *Pythium* šaknų puvinys, sukeliamas bet kurios ar keleto *Pythium* rūšių (ypač *Pythium ultimum* ir *P. irregulare*), yra svarbiausios smulkiagrūdžių kultūrų, kaip antai, kviečių, miežių, rugių, kvietrugių šaknų ligos visame pasaulyje.

Rhizoctonia - bazidiomikotino klasės grybeliai sukelia daugelio pasaulyje auginamų maistinių, pluoštinių ir dekoratyvinių augalų, įskaitant smulkiagrūdės kultūras, velėnos žolę, šparagus, kukurūzus, cukrinius runkelius, pomidorus, bulves, žirnius, ryžius, pupas, soją, braškes, prieskonius ir medvilnę, šaknų bei stiebo puvinį. Smulkiagrūdžių kultūrų šaknų puvinas, sukeltas *Rhizoctonia*, stebimas JAV šiaurės vakarų dalyje, Australijoje, Pietų Afrikoje, sutinkamas vidutinio klimato regionuose, kuriuose šios kultūros auginamos, ypač neįdirbtoje dirvoje (tiesiogiai sodinant eilutėmis). Puvinas, sukeltas *Rhizoctonia solani* AG8, pasireiškia rusvais

užuomazginių bei išvystytų šaknų kenksmingais pažeidimais, kurie apsupa ir nukerta šaknis. Augalai tokiomis sutrumpintomis šaknimis lieka sunykę ir galų gale žūva, nesukrovę viršūnės. Liga dengia augalus dėmėmis. Todėl ji įvairiai vadinama - plikoji dėmėtoji, purpurinių dėmių, duobelinė liga, miežių neūžauga. Tarp visų smulkiagrūdžių kultūrų miežiai yra labiausiai paveikiami *R. solani* AG8. *Rhizoctonia oryzae* užkrečia dygstančių sėklų gemalus, stabdo dygimą ir riboja užuomazginių šaknų formavimą iki vienos ar dviejų, kai tuo tarpu sveiki pasėliai išvysto penkias ar šešias užuomazgines šaknis. Pastarųjų dviejų *Rhizoctonia* rūšių, drauge su *Rhizoctonia cerealis* ir galbūt kitomis *Rhizoctonia* rūšimis, poveikį lemia dirvožemis, sėjos sistemos, piktžolių apdorojimo praktika ir galbūt iki šiol nenustatyti kiti veiksniai.

Dirvoje besiformuojantis patogeninis *Pythium* spp. kompleksas apima grybelių, priklausančių labiausiai gajiams mikrobiniams kolonistams agrokultūriniame dirvožemyje, grupę. Nustatyta, kad beveik visose pasaulio kultivuotose dirvose yra mažiausiai viena, dvi, trys ar net dešimt *Pythium* sporų rūšių. *Pythium* - oomicetės grybelių klasės narys, kaip ir *Rhizoctonia*, faktiškai veikia visus maistinius, pluoštinius ir dekoratyvinius augalus visame pasaulyje (jų pavyzdžiai pateikti aukščiau). *Pythium* žala smulkiagrūdžiams prasideda gemalo infekcija ir su tuo susijusiu vystymosi stabdymu, o po to - smulkiųjų šoninių (šalutinių) šaknelių ir plaukelių irimu. *Pythium* šaknų puvinio paveikti augalai įgyja menkai tręšiamų augalų išvaizdą, nes liga, ardamai veikdama šalutines šakneles ir plaukelius, sumažina šaknų absorbcinę galią. Egzistuoja kelios *Pythium* rūšys, gebančios pulti javus, dygstančių sėklų gemalus, šaknų galiukus ir smulkiąsias šakneles arba ir visą jautrų ir paprastai jauną arba meristeminių audinį.

Plačiai paplitusias smulkiagrūdžių kultūrų ir velėnos žolių ligas sukelia dirvožeminis grybelis *Gaeumannomyces graminis* (Gg), priklausantis *ascomycotina* grybelių klasei. Šios ligos lemia žymius kultūrų derliaus bei ekonominius nuostolius. "Iššutinimas", Gg varianto *tritici* (Ggt) sukeliamą ligą, pasireiškia pasaulio regionuose, kur auginami kviečiai. Tai, galimas dalykas, svarbiausia kviečių ir kitų smulkiagrūdžių kultūrų šaknų liga. Kviečių "iššutimo" simptomai: išilginiai šaknies pakenkimai, paaštrėjimo atvejais-visa

šaknis pajuodusi, grybelis stiebu migruoja augalo vainiko link, kur prasideda vainiko šaknis, ir į želmenis. Sunkiai užkrėsti kviečiai laukuose nustatomi pagal jų pabalusias viršūnes, kai šaknų vainiką užkrėtęs grybelis nutraukia vandens gabenimą į viršūnę ir augalas pirmo laiko žūva. Tokiomis aplinkybėmis galima netekti iki 50 % derliaus. Iki šiol nėra atsparių kultivuotų kviečių veislių, o registruoti fungicidai ne visada efektyvūs. Be to, kviečių augintojai kaskart labiau skatinami silpninti įdirbimą, siekiant kovoti su erozija. Tokia praktika skatina "iššutimą" ir kitas šaknų ligas. Nors tik kviečiai yra itin jautrūs "iššutimo" grybeliams, daugelis ir kitų *Gramineae* - miežiai, rugiai, kvietrugiai ir kt. taip pat gali būti užkrėsti.

Paprastai su "iššutimu" kovojama kultūrų sėjomaina ir žemės įdirbimo normatyvais, t.y. veiksmams, mažinančiais patogeno kenksmingumo potencialą. Tačiau, kadangi ilgalaikė sėjomaina neekonomiška, o žemės įdirbimas artina eroziją, javų auginime einama link mažesnio įdirbimo intensyvumo ir dviejų ar trijų kviečių derlių prieš pertrauką. Abi pastarosios priemonės skatina "iššutimą". Iki šiol genetiniai atsparumo šiai ligai šaltiniai kviečių sandaroje nežinomi. Tuo tarpu cheminės kovos būdai yra riboti. Todėl, siekiant stiprinti žemdirbystę, padaryti ją mažiau priklausančią nuo cheminių pesticidų, būtina vystyti kitokį požiūrį į kovą su "iššutimu" ir kitomis dirvožemio kilmės ligomis.

Kiti Gg grybeliai, pvz. *Gaeumannomyces graminis* variantas *avenae* (Gga) užkrečia avižas ir žolę "iššutimo" dėmių pavidalu, labiau pastebimu velėnos žolėje - smilgose. *Gaeumannomyces graminis* variantas *graminis* (Ggg) užkrečia kai kurias žoles ir, manoma, sukelia ryžių vainiko apvalkalo puvimą.

Visos kultūrinės dirvos tam tikru laipsniu pačios priešinasi Ggt ir kitiems dirvos patogenams. Tai vadinama "bendruoju slopinimu" (N. Gerlagh. Netherlands Journal of Plant Pathology 74: (Suppl. 2) 1-97 (1968)) arba "bendruoju pasipriešinimu" (D. Hornby, Annual Review of Phytopathology, Annual Reviews Inc. Palo Alto, CA (1983), pp. 65-85). "Bendrajį pasipriešinimą" apsprendžia bendras mikroorganizmų aktyvumas dirvoje. Be to, Ggt grybelio specifinis slopinimas (biologinė kova, žinoma kaip "iššutimo"

slopinimas) - (TAD) tam tikromis sąlygomis papildo "bendrąjį slopinimą" ir lemia praktiškai visišką "iššutimo" kontrolę. "Iššutimo" slopinimas (TAD) yra natūrali biologinė kova su liga, apibūdinama spontanišku ligos poveikio sumažėjimu ir jautrių Ggt grybeliams paplitusių monokultūrų (pvz. kviečių, miežių) derlingumo padidėjimu. Pirmą kartą TAD ("iššutimo" slopinimas) buvo pastebėtas daugiau kaip prieš 50 metų. Dabar šis reiškinys pripažįstamas pasaulinio masto fenomenu. Pažymėtinas TAD požymių panašumas plačiame dirvožemių rūšių, klimato, agronominių sąlygų, kuriose kultivuojami kviečiai, miežiai ir kitos smulkiagrūdės kultūros, diapazone. Lauko tyrimai aiškiai parodė, kad visur TAD vystosi pagal vieną ir tą patį modelį, reikalaujantį nepertraukiamos smulkiagrūdinių kultūrų kultivacijos, kai esama "iššutimo" patogenų. Dirvos tipas ir ankstesnė sėjimo istorija - veiksniai, vien tik moduluojantys TAD apimtį ir vystymosi greitį. Nepaisant TAD fakto, daugelis augintojų vengia atskirų monokultūrų dėl galimų žymių nuostolių. Vis dėlto, kaip nustatyta, TAD leidžia tikėtis derliaus padidėjimo ir jo stabilumo, kol pasirinkta monokultūra auginama. Praktinis TAD reiškinio panaudojimas - tai galimybė natūraliai biologiškai kovoti su "iššutimu". Vis dėlto empiriškai reiškinį naudojant, būtina nustatyti ir pritaikyti TAD sukeliančius mechanizmus. Iki šio laiko buvo apsiribojama bendrais reiškinio aprašymais, o TAD išsivystymo priežastys dar nėra pilnai suprantamos. Panašus "iššutimo" lopus, sukeltų Gga, nykimas atsiranda įsišaknijusioje velėnoje.

TAD buvo plačiai tirtas, turint tikslą nustatyti natūralaus "iššutimo" slopinimo mechanizmus. Labiausiai apibendrintos teorijos, aiškinančios TAD fenomeną, remiasi mikrobiologinės dirvožemio būsenos pakitimais, priešiškų bakterijų susidarymu, grybelių populiacijos ir patogenezės pakitimais bei gynybinių grybelių buvimu (D. Hornby in "Take-All Decline: A Theorist's Paradise", Soil-Borne Plant Pathogens, Ed. B. Schippers and W. Gams, Academic Press, New York (1979), pp. 133-156 ir D. Hornby, Annual Review of Phytopathology, Annual Reviews Inc., Palo Alto, CA (1983), pp. 65-85). Šiuos aiškinimus apžvelgė ir apibendrino Hornby. Jis priėjo išvados, kad

pasauliniu mastu negali būti vieno TAD mechanizmo. Ši pažiūra buvo priimta visų, dirbančių ligas slopinančių dirvožemių srityje.

Plačiausiai paplitęs TAD mechanizmo aiškinimas yra pagrįstas mikrobų tarpusavio sąveika: tarp "iššutimo" patogenų ir specifinių priešiško šaknų mikroorganizmų (R.J. Cook and A.D. Rovira, Soil Biology and Biochemistry 8: 269-273 (1976)). Mikrobų pasipriešinimo vaidmenį slopinant Ggt patvirtina eilė pavyzdžių. Pvz., Ggt slopinimą galima perduoti, įvedus į "iššutimui" imlią dirvą nedidelį (1-10 tūrio %) TAD dirvožemio kiekį. Be to, ligos slopinimo efektas TAD dirvožemyje panaikinamas bandinio pasterizavimu (esant 60 °C, 30 min.) drėgnu karščiu apdorojant metilo bromidu, ar auginant kultūras, kurios nėra patogeno šeimininkai.

Tiriant mikrobų pasipriešinimą TAD procese, daug pastangų skiriama specifinių Ggt-priešiško mikroorganizmų nustatymui, jų perkėlimui į dirvą, siekiant atgaminti slopinimą. Plati ištirtų mikroorganizmų įvairovė parodė, kad specifiniai mikroorganizmų kamienai skiriasi įvairiuose TAD dirvožemiuose. Cook ir Rovira (1976) padarė originalią prielaidą, kad tarp priešiško mikroorganizmų svarbiausią vaidmenį TAD procese vaidina fluorescingos *Pseudomonas* spp. rūšys. JAV patente Nr. 4456684 aprašomi *Pseudomonas* kamienai, kurie slopina ligas, sukeltas "iššutimo" ir kitų Gg grybelių. Patente pateikti kamienų atrankos ir panaudojimo būdai.

Daugelis labiausiai efektyvių kamienų gamina antibiotiką 2,4-diacetilflorogliucinolį (Phl) (C. Keel ir kt., Applied and Environmental Microbiology 62: 552-563 (1996)). Phl yra fenolio metabolitas, pasižymintis aktyvumu prieš daugelį bakterijų, virusų ir grybelių, įskaitant "iššutimo" patogeną (L.S. Thomashow and D.M. Weller, In: G. Stacey and N.T. Keen, Plant-microbe Interactions, vol. 1, Chapman & Hall, Ltd. London, pp. 187-236 (1996)). J.M. Raaijmakers ir kt. (Applied and Environmental Microbiology 63: 881-887 (1997)) praneša, kad Phl gaminančios fluorescingos *Pseudomonas* spp. buvo aptiktos ant kviečių šaknų trijose TAD dirvose, JAV, Vašingtono valstijoje. "Iššutimui" imliose dirvose, esančiose arti TAD laukų, Phl gaminančios fluorescingos *Pseudomonas* spp. neaptiktos, ar aptikus - jų tankis buvo 40 kartų mažesnis, negu TAD dirvose. Nors mikrobinių

biologinės kovos agentų, kaip praktinių priemonių kovoti su dirvožemyje esančiais patogenais, naudojimo perspektyva palanki ir daug žadanti, visi publikuoti ar patentuoti biologinės kovos su "iššutimu" agentai pasižymi nestabilaus veikimo trūkumu. Be to, kiekvienas jų yra specifinis tik tam tikrai dirvai ir nepajėgus atkartoti stabilios kovos lygį TAD dirvoje. Joks iki šiol tirtas mikroorganizmas nepademonstravo laukiamos iš kamieno gebos kovoti su liga kaip TAD atvejais. Dėl to nenuostabu, kad joks biologinės kovos su "iššutimu" agentas nebuvo pardavinėjimas. Vadinasi, yra reikalingos biologinės kovos su "iššutimu" efektyvių agentų, atkartojančių TAD dirvos slopinimą, nepriklausančių nuo dirvos tipo ir stabiliai veikiančių, paieškos.

"Iššutimo" ir *Rhizoctonia* šaknų puvinio patogenai, kolonizuojantys augalus - šeimininkus, gyvena audiniuose hifos ar grybienos pavidalu. *Pythium* rūšys gyvena dirvožemyje storasienių oosporų ar sporangijų pavidalu, susidariusių naudojant augalo maistines medžiagas parazituojančios. Visada visos trys ligos išsivysto tuo pat metu tuose pačiuose augaluose, nors viena šaknų liga gali dominuoti.

Nors *Pythium* rūšys egzistuoja visose smulkiagrūdėmis kultūromis apsėtose dirvose, *Pythium* žala šioms kultūroms (pasėlių augimo ir stiprumo stabdymas) yra didžiausia drėgname dirvožemyje, turinčiame savo sudėtyje daug molžemio ir mažesnį pH, negu 6,0. Leidžiant javams "savaimė" (kai pjūties metu sėklos išbarstomos dirvos paviršiuje) sudygti ir augti sudorotame lauke, 1-2 dienas prieš naują sėją apdorojant herbicidais, pvz., glifosatu (Round-up®, Monsanto), naikinamos piktžolės, tačiau tai skatina *Pythium* ir *Rhizoctonia* šaknų puvinį. Kai kviečiai sėjami į prieš tai nuimto kviečių derliaus ražienas, drėkinant dirvos paviršių purkštuvu ir paliekant nepašalintus šiaudus, stimuliuojamos visos trys šaknų ligos.

Prieš daugelį kviečių, miežių ir kitų kultūrų ligų kovojama auginant atsparių patogenams kultūrų veisles. Tačiau pastaroji priemonė efektyvesnė kviečių, miežių, rugių ir kt. lapų, o ne šaknų susirgimams. Vienintelė žinoma priemonė kovoje su "iššutimu" ir *Rhizoctonia* šaknų puvinio yra tolimas diploidinis giminaitis *Daysapryum villosum*, tačiau jis nebuvo naudojamas dėl genų pernešimo sunkumų per tokį taksonomiškai didelį atstumą. Šiuo metu

nėra prekiaujama kviečiais, miežiais, rugiais, ar kvietrugiais, atspariais "iššutimui", *Rhizoctonia* ir *Pythium* sukeliama šaknų puviniai.

Biologinės kovos su augalų grybeliniais patogenais būdai yra paremti *Pseudomonas* bakterinių kamienų, pasižyminčių specifiniu patogenams aktyvumu, naudojimu. JAV patentas Nr. 4456684 aprašo *Pseudomonas* kamienus, kurie slopina ligą, sukeltą "iššutimo" ir kitų Gg grybelių. Mikrobu antagonizmo tyrimai "iššutimo" slopinimo (TAD) procese, t.y. natūralioje biologinėje kovoje su "iššutimu" (apibrėžiamoje kaip spontaninis ligos slopinimas ir jautrių Ggt poveikiui monokultūrų (kviečių, miežių) derlingumo padidėjimas), yra nukreipti į specifinių Ggt-antagonistinių mikroorganizmų identifikavimą, jų įvedimą į dirvą patogenų slopinimui sukelti. Dauguma labiausiai efektyvių kamienų gamina antibiotiką 2,4-diacetilflorogliucinolį (Phl) (C. Keel ir kt., Applied and Environmental Microbiology 62: 552-563 (1996)). J. Raaijmakers ir kt. (Applied and Environmental Microbiology 63: 881-887 (1997)) praneša aptikę Phl gaminantį fluorescentinį *Pseudomonas* spp. kviečių, auginamų trijose JAV Vašingtono valstijos TAD dirvose, šaknyse.

Nors apskritai mikrobiniai biologinės kovos agentai yra perspektyvi esančių dirvoje patogenų kontrolės priemonė, visi publikuoti ar patentuoti biologinės kovos su "iššutimu" agentai veikia nestabiliai (nevienodu aktyvumu), naudotini tik tam tikrose dirvose, neatkartoja kontrolės lygio, esančio TAD dirvoje.

JAV patentas Nr. 4647533 aprašo *Pseudomonas* kamienus, kurie slopina *Pythium* sukeltas ligas. *Pseudomonas* kamienų bakterijos yra *Rhizoctonia solani* arba *Pythium ultimum* inhibitoriai medvilnėje (žiūr. JAV patentą Nr. 5348742, Howel ir kt.). Nurodoma, kad agentas *Bacillus* sp. L324-92 tuo pat metu slopina *Gaeumannomyces graminis*, *Rhizoctonia* ir *Pythium* rūšis (Kim ir kt. Phytopathology 87: 551-558 (1997)). Vis dėlto joks atskiras *Pseudomonas* kamienas, galintis efektyviai naikinti visus tris patogenus, šiame patente neaprašomas.

Mes išskyrėme unikalius biologinius agentus, skirtus kovoti su ligomis, sukeliomomis smulkiagrūdėse kultūrose ir velėnos žolėje dirvožemyje esančių *Gaeumannomyces graminis* (Gg) grybelių. Išradimas apima

unikalius fluorescentinių *Pseudomonas* rūšių (spp.) unikalius kamienus, kurie slopina (sulaiko, stabdo plitimą, sumažina aštrumą) ligas, sukeltas Gg (tokias, kaip "iššutimas"). Kamieniai, naudojami mažomis dozėmis, kolonizuoja šaknis, intensyviau negu kitos žinomos biologinės kovos su Gg medžiagos. Be to, siūlomų kamienų kolonizavimo geba ir biologinės kovos, aktyvumas nepriklauso nuo dirvos tipo.

Išradime pateiktos biologinės kovos medžiagos realizuoja griežtesnę kovą, negu iki šiol žinomos biologinės kovos su Gg sukeliamomis ligomis (pvz. "iššutimu") medžiagos. Pateikti kamieniai unikalūs savo sugebėjimu atkartoti biologinės kovos, esančios TAD dirvose, lygį.

Iš vienos pusės, išradime pateikti biologinės kovos agentai - tai fluorescentinių *Pseudomonas* spp. rūšių kamieno biologiškai grynos kultūros, turinčios biosintezės vietą (lokus), koduojančią antibiotiko 2,4-diacetilflorogliucinolio, kuris turi unikalų genotipą, gamybą (tai rodo charakteringas atsitiktinis sustiprintas polimorfinės DNR profilis (toliau tekste jis bus žymimas RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)), rodo biologinį aktyvumą 10-1000 kartų mažesnėmis dozėmis, lyginant su iki šiol žinomais "iššutimą" slopinančiais mikroorganizmais, ir pasižymi šaknų kolonizavimo gebos pranašumu (tai rodo 10-1000 kartų didesnis populiacijos tankis). Mes nustatėme, kad išskirti išradime pateikiamų kamienų pavyzdžiai pasižymi šaknų kolonizavimo geba, kuri net septyniuose auginimo cikluose pasireiškia populiacijos tankiu, siekiančiu 10^5 CFU (kolonijos sudarymo vienetu) vienam gramui šaknų, įskaitant rizosferos dirvožemį. Tokia šaknų kolonizavimo geba yra beprecedentė. Naujieji kamieniai veikia nepriklausomai nuo dirvožemio tipo.

Išradimas taip pat apima šių unikalių kamienų išskyrimo ir identifikavimo būdus. Bakterijų tyrimo protokolas yra pateiktas 6 figūroje. Toliau atrankos būdas yra aprašytas smulkiai.

Kitas išradimo aspektas - unikalių kamienų ar kompozicijų, turinčių kamienus, pritaikymas biologinei kovai su *Gaeumannomyces graminis* sukeliamomis ligomis. Pateikti išradime kamieniai, panaudoti sėklų, dirvos, vagų apdorojimui arba laistymui, lauko sąlygomis slopina Gg ir demonstruoja

beprecedentį slopinimo stabilumą, ekvivalentišką natūraliam TAD (žiūr. 1 lentelę), kas iki šiol nebuvo stebima. Be to, kadangi "iššutimas" slopinamas mažomis dozėmis, kamienų auginimo ir pritaikymo kaina 10-1000 kartų žemesnė, negu kitų vartojamų biologinės kovos su "iššutimu" agentų. Kamienas lemia ir natūralų TAD. Todėl akivaizdu, kad laukui turi pakakti jų vienkartinio panaudojimo. Tuo tarpu vartojant visus kitus žinomus biologinės kovos agentus, "iššutimas" reikalauja pakartotinio jų panaudojimo.

Išradimo objektas yra pateikti unikalius fluorescentinių *Pseudomonas* spp. kamienus, intensyviau kovojančius su Gg sukeltomis ligomis, negu kiti žinomi ir biologinei kovai naudojami kamieniai.

Kitas išradimo objektas - pateikti biologinės kovos kamienus, pasižyminčius šaknų kolonizavimo geba (aukštesniu šaknų populiacijos tankiu, platesniu poveikiu), kuri viršija bet kurio biologinės kovos su "iššutimu" agento kolonizavimo gebą. Pastaroji savybė itin vertinga, nes yra žinoma, kad šaknų ligų, tokių kaip "iššutimas", slopinime kolonizavimo gebos padidėjimas lemia didesnį ir stabilesnį aktyvumą biologinėje kovoje.

Kitas išradimo objektas - pateikti dirvos tipo neįtakojamus agentus, skirtus kovai su smulkiagrūdžių kultūrų ir velėnos žolių ligomis, sukeltomis *Gaeumannomyces graminis*.

Dar vienas išradimo objektas - pateikti kamienų pagal išradimą atrankos būdą, pagrįstą RAPD analize (žiūr. aukščiau) pagal charakteringą juostinį modelį.

Ir dar vienas išradimo objektas - pateikti biologinės kovos su smulkiagrūdžių kultūrų "iššutimu" ir velėnos žolių dėmėtomu būdą, kuriame naudojamosi išradime pateiktais kamienais ir agrokultūrinėmis kompozicijomis, kuriose yra šie kamieniai.

Kiti išradimo objektai ir pranašumai išryškės tolesniame aprašyme.

Antrame išradimo įgyvendinime mes pagaminome transformuotų fluorescentinių *Pseudomonas* spp. kamienų grynas biologines kultūras, turinčias biosintezės vietas (lokus), kurios koduoja antibiotiko fenazino-1-karboksirūgšties gamybą. Ši medžiaga stabiliai įvesta į genomą ir slopina ligas, sukeltas dirvoje esančios *Rhizoctonia* patogeno. Kamieniai, be

Rhizoctonia sukeltų ligų pasirinktinai slopina dar ir *Pythium* arba *Gaeumannomyces graminis* (Gg) sukeltas ligas, o taip pat turi galimybę kovoti su visomis trimis ligomis.

Išradimo antrojo įgyvendinimo biologinės kovos agentai gaunami stabiliai įvedant biosintezės vietas (lokus) fenazino-1-karboksirūgšties susidarymui į fluorescentinio *Pseudomonas* spp. kamieno genomą. Pastarasis kamienas, turintis biosintezės vietas (lokus), koduoja antibiotiko 2,4-diacetilflorogliucinolio susidarymą, žymimas kaip išradimo pirmojo įgyvendinimo kamienas. Jo unikali genotipą patvirtina RAPD (atsitiktinės sustiprintos polimorfinės DNR) profilis. Jam būdinga pranašesnė kolonizavimo geba, kuri bus aptariama toliau.

Transformuotų kamienų rūšiavimas, siekiant atrinkti kamienus, aktyviai slopinančius *Rhizoctonia* sukeliamas ligas, atliekamas naudojant šiltnamio biologinius bandymus. Šiltnamio bandymai pasirinktinai gali būti atliekami atrenkant transformuotus kamienus, taip pat efektyvius prieš ligas, sukeltas *Gaeumannomyces graminis* ar *Pythium*.

Prieš šiltnamio biologinius bandymus pasirinktinai atliekamas *Rhizoctonia* kultūros slopinimas *in vitro* transformuotu kamieniu.

Vadinasi, antrojo išradimo įgyvendinimo transformuoti biologinės kovos agentai tinka kovai su *Rhizoctonia* sukeltomis ligomis ir, pasirinktinai, ligomis, sukeltomis *Pythium* ar *Gaeumannomyces graminis*. Mes nustatėme, kad pavyzdiniai išradime pateikti transformuoti kamienai *Rhizoctonia* šaknų puvinį slopina labai mažomis dozėmis (iki 10^2 kolonijų formuojančių vienetų vienai sėklai; toliau šie vienetai - "colony forming units" bus žymimi CFU). Be to, mes nustatėme, kad išradime pateikti kamienų pavyzdžiai papildomai išlaiko pirmojo išradimo įgyvendinimo sugebėjimą slopinti kitas šaknų ligas, t.y. ligas, sukeltas *Gaeumannomyces graminis* arba *Pythium*. Taigi, kamienai pagal išradimą yra aktyvūs slopinant visas tris augalų šaknų ligas (sukeliamas *Rhizoctonia*, *Pythium* ir *Gaeumannomyces graminis*).

Dar vienas išradimo aspektas - unikalių kamienų ar kompozicijų, turinčių kamienus, panaudojimas biologinei kovai su augalo šaknų ligomis. Lauko sąlygomis, kamienais apdorojus sėklą, dirvą, vagas dirvoje arba

laistant, unikalūs kamienai pagal išradimą sugeba slopinti ligas, sukeltas *Rhizoctonia* ir pasirinktinai gali slopinti ligas, sukeltas *Pythium* arba *Gaeumannomyces graminis*.

Be to, šio išradimo pateikti biologinės kovos agentai gali būti panaudojami biologinės kovos mišinių sudarymui. Tokio mišinio sudėtyje yra bent vienas išradime pateiktas transgeninis kamienas. Kiti mišinio komponentai - vienas ar keli kiti biologinės kovos kamienai (pvz. papildomas kamienas pagal šio išradimo pirmąjį įgyvendinimą ir kiti biologinės kovos kamienai). Išradimas pateikia agrokultūrinės kompozicijas, savo sudėtyje turinčias bent vieną išradime pateiktą kamieną ir tinkančias kovai su bent viena augalų šaknų liga.

Likusieji išradimo objektai ir privalumai išryškės toliau pateiktame aprašyme.

Išradimas paaiškinamas brėžiniais, kur:

Fig. 1 - vaizdas, rodantis *P. fluorescens* Q8r1-96, ML4.9-96, L5.1-96 kamienų juostinius modelius (RAPD). Pirmasis takas žymi 1-kb laiptelį kaip standartą, palyginimui.

Fig. 2-4 rodo išradime pateikto *P. fluorescens* Q8r1-96 kamieno kolonizavimo gebą, lyginant su *P. fluorescens* M1-96 ir Q2-87 kamienais (nesusietais su išradimu) Quincy, Lind ir Moses Lake plėšininėse dirvose, atitinkamai.

Fig. 5 rodo išradime pateikto *P. fluorescens* Q8r1-96 kamieno kolonizavimo gebą Quincy, Lind ir Moses Lake plėšininėse dirvose.

Fig. 6 rodo fenazino biosintezės vietas (lokus), surištos su *tac* promotoriumi, fizikinį žemėlapi. Strėlėmis nurodyti genai, koduojantys fenazino biosintezės fermentus, ir jų genetinio kodo skaitymo kryptys. Simbolis P_{tac} žymi *tac* promotoriaus padėtį ir orientaciją.

Fig. 7 rodo pUTKm::phz plazmidės fizikinį žemėlapi. Pakreiptos linijos žymi fenazino biosintezės genus. Kanamicino atsparumo determinanto transkripcijų padėtis ir kryptys atvaizduotos atviros dėžutės pavidalu. Mažieji langeliai, pažymėti "X" rodo Tn5 19-bp baigmės galų padėtį.

Išradime siūlomi biologinės kovos agentai. Išradime siūlomi biologiniai agentai turi savo sudėtyje bent vieną biologiškai gryną

fluorescentinių *Pseudomonas* spp. kamieną. Pirmajame išradimo įgyvendinime šis kamienas charakterizuojamas tokiais būdingais bruožais: kamienas turi biosintezės vietą (lokus), kuri koduoja 2,4-diacetilflorogliucinolio susidarymą; kamienas turi unikalią genotipą, kaip rodo charakteringas, žemiau smulkiai aprašytas juostinis modelis, ir Fig. 1; kamienas slopina laukuose auginamų smulkiagrūdžių kultūrų ar velėnos žolių ligas, sukeltas Gg; kamieno kolonizavimo geba apibūdinama didesniu populiacijos tankiu ir plataus kolonizavimo aktyvumu, lyginant su žinomais Gg slopinančiais kamienais.

Kamienui būdingos šios papildomos ypatybės: biologinės kovos aktyvumas (ligos slopinimo geba) ir šaknų kolonizavimo geba, nepriklausoma nuo dirvos tipo; ir/arba smulkiagrūdėse kultūrose kamienas slopina Gg tokiu pat biologinės kovos lygiu kaip ir TAD sąlygomis išsivystęs lygis, t.y. jis atkartoja biologinės kovos lygį, stebimą "iššutimo" slopinimo (TAD) dirvoje. Pirmojo išradimo įgyvendinimo *P. fluorescens* kamienų pavyzdžiai: Q8r1-96, ML4.9-96 ir L5.1-96.

Antrajame išradimo įgyvendinime biologinės kovos agentai turi savo sudėtyje bent vieną biologiškai gryną fluorescentinių *Pseudomonas* spp. kamieną, kuris charakterizuojamas tokiais būdingais bruožais: kamienas turi biosintezės vietas (lokus), kurios koduoja fenazino-1-karboksirūgšties, stabiliai įvestos į jo genomą, susidarymą; kamienas išlaiko pirmojo įgyvendinimo kamieno biosintezės vietas (lokus), kurie koduoja 2,4-diacetilflorogliucinolio susidarymą; kamienas slopina ligas, sukeltas dirvožemio *Rhizoctonia* patogeno. Pasirinktinai kamienas slopina ligas, sukeltas *Pythium* arba ligas, sukeltas *Gaeumannomyces graminis* (Gg) ir, be to, ligas, sukeltas *Rhizoctonia*, arba būna aktyvus (išreiškia slopinimo gebą) prieš visas tris šaknų ligas. Antrojo išradimo įgyvendinimo *P. fluorescens* kamienų pavyzdžiai: Z30-97, Z32-97, Z33-97 ir Z34-97.

Charakteringas juostinis modelis. Biologiškai grynai fluorescentinių *Pseudomonas* spp. kamienai (priklausantys pirmajam išradimo įgyvendinimui) pasižymi būdingu juostiniu modeliu. Šis profilis gali būti identifikuotas RAPD analize, naudojant masalą M13, kaip aprašyta žemiau -

1-ajame pavyzdyje. Fig. 1 rodo juostinius modelius (RAPD) *P. fluorescens* Q8r1-96, ML4.9-96 ir L5.1-96 kamienų, kurie yra kamienų pagal išradimą pavyzdžiai. Pirmasis takas vaizduoja 1-kb laiptelius kaip standartą palyginimui. Kaip matyti iš Fig. 1, kamienų bendros juostos yra: 330 ± 20 bp; 600 ± 50 bp; 700 ± 50 bp; 800 ± 50 bp; 900 ± 50 bp; 1100 ± 60 bp. 800 ± 50 bp juosta intensyviausia.

Nagrinėjant išradimo pirmąjį įgyvendinimą, kamienai charakteringas juostinis profilis pasitvirtina, jei kamienas turi juostas ties 600 ± 50 bp; 700 ± 50 bp; 800 ± 50 bp; 900 ± 50 bp sąlygomis, aprašytomis žemiau, 1-ajame pavyzdyje. Pageidautiname įgyvendinime, kamienas taip pat turi juostas ties 330 ± 20 bp ir 1100 ± 60 bp.

Kitas identifikavimo, ar kamienas turi pirmajam išradimo įgyvendinimui charakteringą juostinį modelį, būdas - tiriamo kamieno ir *P. fluorescens* kamieno Q8r1-96 vizualus juostų palyginimas, sugretinant tarp 600 ± 50 bp ir 900 ± 50 bp agarų gelio terpėje. Jei testuojamo kamieno profilis atitinka Q8r1-96 profilį šioje srityje, testuojamas kamienas turi išradimo apibrėžtą charakteringą juostinį modelį (RAPD analizės parodytą DNR profilį).

Kitas identifikavimo būdas, nustatant, ar transformuotas kamienas turi išradimo pirmajam įgyvendinimui charakteringą juostinį modelį, yra išradimo pirmojo įgyvendinimo pavyzdžio *P. fluorescens* Q8r1-96, veikiančio pirmojo įgyvendinimo kamieno arba išradimo kamieno pavyzdžio, tokio, kaip Z34-97, sugretinimas agarų gelyje su tiriamu kamieniu ir vizualinis palyginimas juostų tarp apytikriai 600 ± 50 bp ir 900 ± 50 bp. Jeigu tiriamo kamieno profilis atitinka pirmojo įgyvendinimo kamieno Q8r1-96 pavyzdžio, veikiančio motininio kamieno arba išradimo kamieno pavyzdžio šioje srityje profilį, tai tiriamas kamienas turi charakteringą juostinį profilį, įgyvendintą šiuo išradimu.

Antrajame išradimo įgyvendinime transformuotas kamienas, pageidautina, turi tokią papildomą identifikavimo charakteristiką: kamienas išlaiko bent keturias charakteringas modelio juostas, būdingas motininiam ar pirmojo įgyvendinimo kamienai, koduojančiam 2,4-diacetilflorogliucinolį. Antrojo įgyvendinimo transformuoti kamieniai turi tokį identifikuojantį charakteringą juostinį modelį kaip ir motininiai arba pirmojo įgyvendinimo

kamienai. Šis profilis gali būti nustatomas RAPD analizės metodu, naudojant M13 pradmenį, kaip aprašyta žemiau, 5 ir 11-ajame pavyzdžiuose. Fig. 1 vaizduoja RAPD juostinio modelio charakterį, gaunamą išradimo pirmojo įgyvendinimo *P. fluorescens* Q8r1-96, ML4.9-96 ir L5.1-96, kurie yra pirmojo įgyvendinimo kamienų pavyzdžiai. Takas 1 rodo 1-kb laiptelius kaip, standartą palyginimui. Iš Fig. 1 seka, kad pastarieji kamienai turi bendras juostas ties 330 ± 20 bp, 600 ± 50 bp, 700 ± 50 bp, 800 ± 50 bp, 900 ± 50 bp ir 1100 ± 60 bp. 800 ± 50 bp juosta būna intensyviausia.

Transformuotieji kamienai Z32-97, Z33-97 ir Z34-97 su savo motininio kamienų *P. fluorescens* Q8r1-96 turi tokias bendras juostas ties 330 ± 20 , 600 ± 50 , 700 ± 50 , 800 ± 50 , 900 ± 50 ir 1100 ± 60 bp. Transformuotas kamienas Z30-97 su savo motininio kamienų Q8r1-96, turi šias bendras juostas: 600 ± 50 , 700 ± 50 , 800 ± 50 ir 900 ± 50 bp.

Pagal šį išradimą transformuotas kamienas turi motininio kamieno pavyzdžio charakteringą juostinį modelį, jei jis turi juostas ties 600 ± 50 , 700 ± 50 , 800 ± 50 ir 900 ± 50 bp 5-ajame ar 11-ajame žemiau pateiktuose pavyzdžiuose nurodytomis sąlygomis.

Pageidautina, kad transformuoto kamieno juostos būtų ties 330 ± 20 bp ir 1000 ± 60 bp.

Biologinės kovos aktyvumas. Biologiškai gryni išradimo pirmojo įgyvendinimo fluorescentinių *Pseudomonas* spp. kamienai sugeba slopinti (stabdo veikimo sferą, aštrumą) ligas, sukeltas Gg (pvz. "iššutimą") smulkiagrūdėse kultūrose ar velėnos žolėje. Duomenys apie biologinės kovos aktyvumą yra pateikti pavyzdžiuose, 1, 2 ir 4-ojoje lentelėse (žiūr. žemiau). 2-ojoje 3-ojo pavyzdžio lentelėje parodoma, kad Q8r1-96 kamienas lauko sąlygomis 20 % sumažina kviečių užkrėstumą "iššutimu". 4-ojoje 4-ojo pavyzdžio lentelėje parodoma, kad Q8r1-96 beveik du kartus efektyviau slopina "iššutimą", negu *P. fluorescens* Q2-87 kamienas (žinomas slopinantis, Phl gaminantis kamienas), po devynių kviečių auginimo ciklų.

Kaip aptariama žemiau, Q8r1-96 atkartoja TAD dirvožemio biologinės kovos lygį.

Biologiškai gryni fluorescentinių *Pseudomonas* spp. kamienai turi biosintezės vietas (lokus), koduojančias antibiotiko fenazino-1-karboksirūgšties susidarymą. Šis antibiotikas stabiliai įjungtas į genomą. Toks kamienas slopina ligas (apriboja jų veikimo sferą bei aštrumą), sukeltas dirvoje esančio *Rhizoctonia* patogeno. Pasirinktinai, šie kamienai slopina *Pythium* ar *Gaeumannomyces graminis* sukeltas ligas, papildomai ligoms, sukeltoms *Rhizoctonia*. Kamienai gali slopinti ir visas tris ligas.

6, 7 ir 8-ojoje lentelėse (8 pavyzdyje, žemiau) yra pateikti duomenys apie biologinės kovos aktyvumą. 6-ojoje lentelėje parodyta, kad transformuotų Z30-97, Z32-97 ir Z34-97 kamienų dozės 10^2 - 10^3 CFU (koloniją formuojančių vienetų) vienai sėklai sumažina *Rhizoctonia solani* AG8 užkrėstų kviečio šaknų procentą labiau negu tų pačių dozių motininis kamienas Q8r1-96, *P. fluorescens* 2-79 (fenazino-1-karboksirūgšties genų šaltinis) ir du neapdoroti kontroliniai bandiniai. Kamienas (motininis) Q8r1-96 veikia ekvivalentiškai kamienams Z30-97 ir Z32-97 tik tai, jei slopinant *Rhizoctonia* yra naudojama didesnė Q8r1-96 dozė. 7-oji lentelė (8 pavyzdyje, žemiau) rodo, kad *Pythium* slopinimo eigoje Z34-97 kamieno dozė 10^2 CFU vienai sėklai tiek pat efektyvi, kiek ir kamieno Q8r1-96 dozė 10^3 CFU vienai sėklai. Iš 8-osios (8 pavyzdys, žemiau) lentelės matyti, kad Z34-97 kamienas žymiai slopina *Gaeumannomyces graminis* variantą *tritici* (Ggt). 4-8 lentelės (8 pavyzdyje, žemiau) rodo, kad Z34-97 gali slopinti visas tris šaknų ligas.

Kolonizavimo geba. Biologiškai gryni fluorescentinių *Pseudomonas* spp. pirmojo įgyvendinimo kamienai rodo unikalią kolonizavimo gebą, kuri pasižymi tiek (a) didesniu populiacijos tankiu ant šaknų paviršiaus, tiek (b) didesniu kolonizavimo aktyvumu, lyginant su žinomais slopinančiais kamienais, t.y. išradime pateikti kamienai sugeba tiek kolonizuoti, tiek ir išsilaikyti šaknies paviršiuje. Žemiau pavyzdžiais parodyta, kad išradime pateikti kamienai sugeba kolonizuoti šaknis, esant vidutiniam populiacijos tankiui mažiausiai 10^5 CFU vienam šaknų masės gramui, įskaitant susijusį rizosferinį dirvožemį, mažiausiai 7-is vienas po kito einančius derliaus ciklus. Fig. 2 vaizduoja kviečių (cv. Penawawa) šaknų kolonizavimą Q8r1-96 kamieniu 9-is ciklus Quincy plėšiniame dirvožemyje. 5-ojo ciklo eigoje Q8r1-

96 populiacijos tankis buvo apie 1000 kartų didesnis, negu *P. fluorescens* Q2-87 ir M1-96 kamienų (pagal išradimą). Lind ir Moses Lake plėšininuose dirvožemiuose (Fig. 3, 4) Q8r1-96 taip pat parodė žymiai didesnius populiacijos tankius.

Išradimo pirmajam įgyvendinimui priklausantys kamienai pasižymi charakteringa geba kolonizuoti, jei jie kolonizuoja kviečių šaknis, kai jų sukeltas vidutinis populiacijos tankis siekia mažiausiai apie 10^5 CFU vienam šaknų gramui, įskaitant šaknies plaukelių zonas (rizosferą) bent 5-is vienas po kito einančius auginimo ciklus, sąlygomis, aprašytomis žemiau, 4-ajame pavyzdyje.

Pagal išradimo antrąjį įgyvendinimą, biologiškai gryni transgeniniai kamienai sugeba kolonizuoti augalų sėklas ir šaknis. 9-oje lentelėje (9 pavyzdys, žemiau) parodyta, kad išradimo iliustracijai pateiktų kamienų pavyzdžiai siekė tą patį populiacijos tankį, kaip ir motininis kamienas, praėjus 66-ioms valandoms ir vienai savaitei po apdorotų sėklų sėjos.

Nepriklausomumas nuo dirvos tipo. Pagal išradimo pageidautiną įgyvendinimą, kamienas turi dar tokią savybę, kad jo biologinės kontrolės aktyvumas ir šaknų kolonizavimo geba nepriklauso nuo dirvos tipo. Iš Fig. 5 galima įsitikinti, kad per 7-is ciklus Q8r1-96 kamieno populiacijos tankis nepriklausė nuo dirvos tipo.

TAD ("iššutimą" slopinančios) dirvos biologinės kovos atkartojimas. Kita išradime siūlomo kamieno pageidautina savybė – gebėjimas slopinti smulkiagrūdžių kultūrų ligas, sukeliamas Gg, biologinės kovos lygiu, ekvivalentišku lygiui, kuris stebimas dirvoje "iššutimo" slopinimo (TAD) atvejais, tai yra, kamienas sugeba atkartoti biologinės kovos lygį, pasiekiamą TAD dirvoje. 1-oji lentelė (1 pavyzdys, žemiau) rodo, kad sėklas apdorojus Q8r1-96 kamieno 10^4 CFU vienai sėklai (koloniją formuojančių vienetų/sėklai) doze ir jas pasėjus Quincy plėšininiam laidžiam dirvožemyje, jis tiek pat efektyviai slopino "iššutimą", kaip ir Quincy TAD dirva. Be to, Q8r1-96 kamienas Lind plėšininėje (laidžioje) dirvoje buvo toks pat efektyvus, kaip ir Quincy dirvožemis TAD, pridėjus jo 10 masės %/masei į Lind

plėšininį dirvožemį. Šis "iššutimo" slopinimo atkartojimas, ekvivalentiškas natūraliam "iššutimo" slopinimui, yra beprecedentis.

Transgeninių slopinančių kamienų pritaikymas kovai su augalų šaknų ligomis. Pagal antrąjį išradimo įgyvendinimą, transgeninių mikroorganizmų kamienai gali būti sėkmingai naudojami kovai su augalo šaknų ligomis, kaip antai, su ligomis, sukeliamomis *Rhizoctonia* patogeno, ir pasirinktinai, sukeliamomis *Pythium* bei *Gaeumannomyces graminis*. Išradime pateikti biologinės kovos agentai ypatingai naudojami kovai su smulkiagrūdžių kultūrų (pvz. kviečių, miežių, rugių ir kvietrugių) ir velėnos žolių ligoms. Be to, kamienai gali būti naudojami kovai su kitų maistinių, pluoštinių ir dekoratyvinių augalų šaknų ligomis. Pastarieji augalai yra jautrūs šaknų ligoms, sukeliamoms dirvos patogenų: *Rhizoctonia*, *Pythium* ir *Gaeumannomyces graminis*. Prie tokių augalų priskirtini: šparagai, kanola, kukurūzai, cukriniai runkeliai, pomidorai, bulvės, žirniai, ryžiai, pupos, sojos, braškės, moliūgai ir medvilnė.

Biologinei kovai su gydomo augalo šaknų liga arba su konkrečiu augalo ligomis realizuoti augalas buvo auginamas vieno ar daugiau fluorescentinio *Pseudomonas* kamieno pagal išradimą veiksmingo slopinimo kiekio aplinkoje. Veiksmingas biologinei kovai kiekis yra apibrėžiamas kaip toks biologinės kovos agento kiekis, kuris reikalingas gydomo augalo šaknų ligos ar ligų veiksmingam slopinimui (ligos veikimo, aštrumo nuslopinimui ar sumažinimui), lyginant su ligomis, atsirandančiomis neapdorotame dirvožemyje. Prileidžiama, kad vanduo, trąšos, dirvos ir oro temperatūra nėra gydomo augalo vystymąsi lemiantys veiksniai. Tyrimų eigoje veiksmingas kiekis nustatomas pakartotiniais žinomais šioje srityje bandymais.

Biologinė kova realizuojama, įvedus efektyvų biologinės kovos agento kiekį į augalus, sėklas ar į augalo ar sėklos lokusą. Pvz., kamieną galima įvesti sėklų, dirvos, vagos apdorojimu ar dirvos bei velėnos laistymu. Gali būti panaudotos šviežios ar šalčiu išdžiovintos ląstelės.

Kamienas gali būti įvedamas į kompozicijas, tinkamas naudoti augalams, kuriems šaknų ligų slopinimas yra pageidaujamas. Jis gali būti sumaišomas su bet kuriuo agrokultūroje priimtiniu nešikliu ar su agronomiškai

tinkamu nešikliu, kuris neveikia kamieno aktyvumo. Nešiklių pavyzdžiai - vanduo, buferis, metilceliuliozė, durpžemis ar vermikulitas. Kai kamienas vartojamas suspensijos ar emulsijos pavidalo (skysto nešiklio terpėje), į suspensijos ar emulsijos sudėtį pasirinktinai gali įeiti įprastiniai priedai: paviršiaus aktyviosios medžiagos bei drėkinantys agentai, kaip kad žinoma šioje srityje. Kamieno pagal išradimą sudėtyje gali būti kitų kamienų, skirtų biologinei kovai, įskaitant kitus išradimo antrojo įgyvendinimo kamienus, pirmojo įgyvendinimo kamieną, arba kamienus, žinomus šioje srityje.

Naudojimo būdų pavyzdžiai ir efektyvūs kiekiai yra aprašyti žemiau. Kiekis, atitinkantis atskiros atvejo veiksmingumo diapazoną, nustatomas eksperimentiniais bandymais.

Smulkiagrūdžių kultūrų, velėnos žolių ar kitų maistinių, pluoštinių, dekoratyvinių augalų sėkloms apdoroti bakterijos pridedamos į 0,5-2,0 % metilceliuliozės turinčią suspensiją, siekiant sumažinti bakterijų džiūvimą ir skatinti jų sukibimą su sėklomis. Suspensija dedama į sėklas ir maišoma, kol kiekviena sėkla pasidengia 10^2 - 10^5 CFU vienai sėklai. Apskritai, pageidautinas kiekis yra apie 10^2 - 10^4 CFU vienai sėklai. Po šio apdorojimo sėklos džiovinamos oru.

Apdorojant dirvą, bakterijos suspenduojamos vandenyje ar buferyje ir pilamos į dirvą, kol pasiekama apie 10^2 - 10^3 CFU vienam dirvožemio gramui. Apdorojant velėną, bakterijos suspenduojamos vandenyje ar buferyje kaip laistymo medžiaga, turinti iki 10^2 - 10^5 CFU vienam mililitrui.

Tiesiogiai apdorojant šaknis, jos panardinamos į bakterijų suspensiją 10^2 - 10^5 CFU vienam suspensijos mililitrui.

Tipinis reikalavimas suspensijai, esant kietam nešikliui (pvz., durpžemiui, vermikulitui), yra apie 10^6 - 10^9 CFU vienam nešiklio gramui. Esant skystam nešikliui, šis reikalavimas siekia 10^8 - 10^{10} CFU vienam nešiklio mililitrui. Šaldymu džiovinant ląstelių atveju tipinis reikalavimas yra apie 10^{10} - 10^{11} CFU vienam suspensijos gramui. Suspensijos su šaldymu džiovinant ląstelėmis gali būti su priedais, žinomais šioje srityje.

Rūšiavimo būdas. Išradimo pirmasis įgyvendinimas apima būdus, skirtus unikalių, išradime pateiktų fluorescentinių *Pseudomonas* kamienų

atrankai. Naudojant mūsų būdą, gaunami mikroorganizmų kamienai, pasižymintys aukščiau aprašytomis charakteristikomis. Trumpai tariant, mūsų būdas apima šias stadijas: (1) smulkiagrūdžių kultūrų ir velėnos žolių kultivavimą vienas po kito einančių auginimo ciklų metu, "iššutimą" slopinančiame dirvožemyje (t.y. "iššutimą" silpninančiame dirvožemyje), praturtinant jį fluorescentinėmis *Pseudomonas* spp., turinčiomis biosintezės vietą (lokus), kuri koduoja 2,4-diacetilflorogliucinolio gavimą (taip pat nurodomomis kaip Phl gaminančiomis fluorescentinėmis *Pseudomonas* spp.); (2) potencialiai slopinančių fluorescentinių *Pseudomonas* bakterijų kamienų išskyrimą; (3) išskirtų kamienų rūšiavimą, siekiant atrinkti kamienus, turinčius biosintezės vietas (lokus), koduojančias 2,4-diacetilflorogliucinolio susidarymą. Tai atliekama kryžminant koloniją su 2,4-diacetilflorogliucinoliniui specifiniu DNR bandiniu, siekiant nustatyti Phl gaminančius agentus; ir (4) RAPD analizės panaudojimą turintiems charakteringąjį juostinį modelį (aprašytą aukščiau) kamienams atrinkti. Po (3) stadijos gali būti pasirinktinai patvirtinamas Phl susidarymas.

Siūlomas atrankos būdas pagal išradimą toliau yra aprašomas smulkiau.

1-oji stadija. Einantys vienas paskui kitą auginimo ciklai, praturtinantys dirvą Phl gamintojais.

Šioje stadijoje smulkiagrūdės kultūros ar velėnos žolės yra kultivuojamos paeiliui einančiais auginimo ciklais natūraliame "iššutimą" slopinančiame dirvožemyje, siekiant praturtinti jį Phl gaminančiomis fluorescentinėmis *Pseudomonas* spp.: (a) - smulkiagrūdės kultūros ar velėnos žolės auginamos TAD dirvožemyje šiltnamio sąlygomis, mažiausiai 3 savaites, esant sąlygoms, palankioms smulkiagrūdžių kultūrų ar velėnos žolės augimui, siekiant užauginti daigus; (b) - surenkamas dirvožemis drauge su smulkiagrūdžių kultūrų ar žolių daigais ir šaknimis ir viskas gerai sumaišoma; (c) - pakopos (a) ir (b) kartojamos bent 4 vienas po kito einančius ciklus. Pasibaigus eiliniam ciklui, pakopoje (b) pagamintas mišinys naudojamas sėklų daiginimui po to einančiame cikle.

2-oji stadija. Fluorescentinių *Pseudomonas* spp. išskyrimas iš cikluose išsivysčiusių šaknų TAD dirvožemyje.

Šioje stadijoje potencialiai slopinantys fluorescentinių *Pseudomonas* bakterijų kamienai išskiriami iš (1) stadijoje vienas po kito einančiais ciklais kultivuotų smulkiagrūdžių kultūrų ar velėnos žolių šaknų bei dirvožemio susijusios rizosferos (šaknies plaukelių). Tai atliekama auginant kamienus *Pseudomonas* atrenkančioje terpėje. Parenkama tokia auginimo trukmė bei sąlygos, kad būtų realizuotas efektyvus *Pseudomonas* augimas ir augančių terpėje kamienų atranka.

3-oji stadija. Kolonijos kryžminimas (hibridizavimas) su specifiniais bandiniais (zondais), siekiant nustatyti Phl gamintojus.

Šioje stadijoje išskirti 2-ojoje stadijoje kamienai yra rūšiuojami, siekiant atrinkti kamieną, turintį biosintezės vietą (lokus), koduojančią 2,4-diacetilflorogliucinoliui (Phl) susidarymą, kryžminant kamienų koloniją su 2,4-diacetilflorogliucinolio specifiniu bandiniu (zondų) ir po to atrenkant sukryžmintus su bandiniu kamienus. Atrinktos individualios kolonijos surenkamos, pasėjamos, dar kartą sėjamos ruoželiais tol, kol kamienas tampa stabilus ir grynas, t.y. kol pasidaro biologiškai gyna kultūra. Kamienas gali būti laikomas glicerolyje, -80 °C temperatūroje, siekiant išlaikyti jo stabilumą.

3a stadija (pasirinktinė). Phl gamintojų patvirtinimas PCR būdu. Šiame pasirinktiniame etape patvirtinamas Phl gaminančių kamienų egzistavimas. Tai atliekama naudojant pradmenis, kurie amplifikuoja sekas Phl biosintezės vietose (lokus). Tie kamienai, kurie parodo teigiamą PCR reakciją, atrenkami.

4-oji stadija. RAPD analizė, siekiant nustatyti Phl gamintojus su apibrėžtu jų juostiniu modeliu.

Šioje stadijoje atliekama RAPD analizė, naudojant M13 pradmenį (seka: GGTGGTCAAG) (žiūr. aukščiau, Keel ir kt.). Pradmuo M13 perkamas iš Operon Technologies Inc., Alameda, Calif.. Atrenkami kamienai, turintys juostas ties 600±50, 700±50, 800±50, 900±50 bp. Pageidautina, kad kamienai taip pat turėtų juostas ties 330±20, 1100±60bp.

Naudodami šį būdą, mes gavome *P. fluorescens* Q8r1-96, L5.1-96 ir ML4.9-96 kamienų biologiškai grynas kultūras, kurios priskirtinos išradimo pirmojo įgyvendinimo pavyzdžiams.

Transgeninių kamienų gavimas. Išradimo antrojo įgyvendinimo kamienai gaunami pagal rekombinantinės DNR technologiją, kurioje fenazino-1-karboksirūgšties biosintezės vieta (lokus) yra stabiliai įvedama į motininio fluorescentinio *Pseudomonas* kamieno genomą, kurio charakteristikos aprašytos žemiau. Genetinė vieta (lokus) fenazino-1-karboksirūgšties biosintezės, paimta iš bakterijų kamieno (pvz., iš fluorescentinio *Pseudomonas*), modifikuojama įvedant fenazino biosintezės genus už promotoriaus, tokio kaip *tac*. Ši konstrukcija po to klonuojama plazmidėje. tokioje kaip pUT, turinčioje mini - Tn5 su klonavimo padėtimis, tokiomis kaip *SfiI* arba *NotI* ir sugebančioje tarpininkauti stabiliai įtvirtinant fenazino biosintezės genus recipiente fluorescentiniame *Pseudomonas*. Plazmidė su fenazino biosintezės vietomis (lokus) ir promotoriumi pernešama į kamieną, tokį kaip *Escherichia coli* S17-1 (λ pir). Fenazino biosintezės genai stabiliai įtvirtinami recipiento *Pseudomonas* kamieno, pastarąjį suporuojant su *E. coli* kamieniu. Po suporavimo kultūros suspenduojamos buferyje ir auginamos ant KMB plius kanamicinas. Laikoma, kad fluorescentiniai ir kanamicinui atsparūs kamienai ir yra spėjamieji transformuoti (transgeniniai) kamienai.

Kaip aptariama 5-jame pavyzdyje (žemiau), genetinių vietų (lokus) pernešimo variantas fenazino-1-karboksilinės rūgšties biosintezės buvo sukonstruotas, panaudojus fenazino biosintezės genus iš *Pseudomonas fluorescens* 2-79 (NRRL B-15132) kamieno. Fenazino biosintezės (*phz*) vieta (lokus) yra lokalizuota *P. fluorescens* 2-79 kamieno 8, 505-bp BglII-XbaI DNR fragmente ir sudaryta iš 9 genų, žymimų: *phzABCDEFGF*, *phzI* ir *phzR*. Pilna gautos iš *P. fluorescens* 2-79 *phz* vietos (lokus) genų seka yra išvardinta GenBank kompiuterinėje duomenų bazėje (kodas: L48616).

phzABCDEFGF genai sudaro vieną operoną ir yra atsakingi už fenazino-1-karboksirūgšties (PCA) susidarymą kamieno *P. fluorescens* 2-79. *phzC*, *phzD* ir *phzE* genų produktai panašūs į fermentus, skatinančius šikimo

ir chorizmo rūgščių medžiagų apykaitą, ir drauge su PhzF yra būtini PCA susidarymui. PhzG panašus į piridoksamino-5'-fosfatoksidazės ir, galbūt, yra PCA sintezuojančių fermentų kofaktoriaus šaltinis. *phzA* ir *phzB* genų produktai yra labai homologiški vienas kito atžvilgiu ir gali stabilizuoti spėjamą PCA sintezuojantį multifermentinį kompleksą. Genai *phzABCDEFG* yra lokalizuoti fenazino biosintezės vietos (lokus) (kamienas 2-79) 6,8-kb BglIII-XbaI fragmente. Šis DNR fragmentas, kontroliuojant *tac* promotorium, buvo patalpintas ir po to klonuojamas tarpininkaujančioje, žemiau aprašytoje plazmidėje. Gauta plazmidė panaudota stabiliems chromosominiams įjungimams (įsiuvams) į fluorescecinį *Pseudomonas* spp. kamieną generuoti, kurie (įjungimai) patys savaime negali sudaryti fenazino junginių.

Bakterijų kamienams konstruoti genų inžinerijos metodu buvo panaudota sistema, pagrįsta Tn5 translokacijos savybėmis ir plazmidės pUT tarpininkavimu (V. de Lorenzo, V. Herrero, U. Jakubzik and K. N. Timmis, *Journal of Bacteriology* 172:6568-6572 (1990)). pUT plazmidė pasižymi π baltymo kilmės struktūros elementų pasikartojimu, būdingu R6K plazmidei. Todėl pUT išsilaiko tik π baltymą gaminančiose bakterijose, pvz., specialiai sukonstruotame *Escherichia coli* S17-1 (λ pir) kamienne. pUT taip pat pasižymi plazmidės RP4 *oriT* pernešimo ypatybėmis. Dėl to pUT užtikrina našų pernešimą iš donorinių *E. coli* kamienų į recipientinius *Pseudomonas* kamienus, išreišdamas RP4 jungiamąsias funkcijas. Pagaliau, pUT neša IS50_R geną *tnp*, koduojantį Tn5 minielementų perkėlimą. Ši aukščiau aprašyta pristatymo sistema įtvirtina fenazino biosintezės genus apdorojamo *Pseudomonas* kamieno chromosomose, kur jie palaikomi nedideliu, dažnai natūralių, kopijų skaičiumi bent teoriškai, turėtų būti tokie stabilūs, kaip ir kiti chromosomų genai.

Po suporavimo kultūros suspenduojamos buferyje ir auginamos ant KMB plius kanamicinas. Fluorescentiniai ir kanamicinui atsparūs kamienai laikomi spėjamai transformuotais. Atrinktos individualios kolonijos surenkamos, pasėjamos ir dar kartą sėjamos, kol kamienas tampa stabilus ir grynas, t.y. jis tampa biologiškai gryna kultūra. Kamienas

gali būti saugojamas glicerolyje, - 80 °C temperatūroje, siekiant išlaikyti jį stabilų.

Atranka šiltnamyje. Transformuotų kamienų rūšiavimas, siekiant atrinkti tuos, kurie slopina *Rhizoctonia* sukeltas ligas (pvz., kviečių šaknų puvinys), atliekamas šiltnamio biologiniuose bandymuose. Dirvožemis užkrečiamas *Rhizoctonia* kultūra ir patalpinamas plastiko vamzdeliuose, kaip aprašyta 8-ajame pavyzdyje, žemiau. Tiriamos jautriosios kultūros (pvz., kviečių) sėklos yra apdorojamos transformuotu kamieniu ir pasėjamos į šį dirvožemį. Jei norima atrinkti transformuotus kamienus, kurie taip pat yra efektyvūs prieš ligas, sukeltas *Gaeumannomyces graminis* (Gg) ar *Pythium*, šiltnamių biologiniams bandymams atitinkamai naudojami Gg ar *Pythium* spp. kaip sėjamoji kultūra.

Pasirinktinė *in vitro* atranka. Prieš atranką šiltnamyje pasirinktinai galima transformuotų kamieniu slopinti *Rhizoctonia* kultūrą *in vitro*. Transformuotas kamienas suporuojamas su patogenu ant agaro plokštelės ir matuojama slopinamos zonos apimtis. Žemiau, 6-ajame pavyzdyje nurodoma, kad iliustratyvūs biologiškai gryni transgeniniai kamienai pavyzdžiai demonstravo intensyvesnį *Gaeumannomyces graminis tritici* rūšies, *Rhizoctonia solani* AG8 ir *Pythium irregulare* slopinimą, negu motininis *P. fluorescens* Q8r1-96 kamienas.

5 lentelėje (6-asis pavyzdys, žemiau) parodyta, kad transgeninių kamienų slopinimo zonos žymiai platesnės, negu Q8r1-96. Bendrai paėmus, kamienai slopina *Pythium* sukeltas ligas ar ligas, sukeltas Gg papildomai ligoms, sukeltoms *Rhizoctonia*, arba sugeba kontroliuoti visas tris ligas.

Išradimo antrajame įgyvendinime taikant mūsų būdą, gavome biologiškai grynas *P. fluorescens* kamienų kultūras: Z30-97, Z32-97, Z33-97 ir Z34-97, kurios yra pavyzdžiai pagal išradimą. Pastarieji kamienai buvo gauti transformuojant išradimo pirmojo įgyvendinimo motininį kamieną *P. fluorescens* Q8r1-96, siekiant įvesti stabiliai į genomą biosintezės vietą (lokus) fenazino-1-karboksirūgšties susidarymui. Tai smulkiai aptariama 5-ajame pavyzdyje, žemiau. Motininis kamienas Q8r1-96 paprastai gamina antibiotiką 2,4-diacetilflorogliucinolį (Phl). Įvedimas į pastarąjį kamieną

fenazino-1-karboksirūgšties (PCA) biosintezės genų, suteikė transformuotiems kamienams sugebėjimą gaminti PCA ir Phl drauge.

6-ajame pavyzdyje (žemiau) parodyta, kad fenazino-1-karboksirūgšties biosintezės genų pridėjimas paveikia transformuotus kamienus taip, kad jie daug aktyviau slopina *Rhizoctonia* sukeltą šaknų puvinį, negu motininis Q8r1-96 kamienas ar fenazino-1-karboksirūgšties biosintezės vietų (lokus) šaltinis – kamienas 2-79. Pavyzdyje pažymėta, kad kamienas Z34-97 efektyviai slopina *Rhizoctonia*, esant mažai dozei 10^2 - 10^3 . Tokia dozė 100-1000 kartų mažesnė, negu *Rhizoctonia* slopinimui reikalingos kamienų *P. fluorescens* Q8r1-96 ir *Bacillus* sp. L324-92 dozės.

Kamienų charakteristikos. Motininiam kamienui Q8r1-96 būdingi fiziologiniai požymiai ir substrato naudojimo ypatumai yra tipiški *P. fluorescens* kultūrai, kaip nurodo Bergey žinynas (žiūr. 10 lentelę žemiau). Q8r1-96 kamienas taip pat gamina antibiotiką 2,4-diacetilflorogliucinolį. Transformuoti kamienai, gauti išradime (jų pavyzdys - Z34-97), turi motininio kamieno požymių, išskyrus tai, kad transformuoti kamienai be 2,4-diacetilflorogliucinolio gamina dar ir fenazino-1-karboksirūgštį.

Deponavimo patvirtinimas. Biologiškai grynos kamienų Q8r1-96, L5.1-96, ML4.9-96 kultūros buvo deponuotos 1997 m. liepos 8 dieną pagal Budapešto sutarties (Treaty in the Agricultural Research Culture Collection - NRRL) 1815 North University Street, Peoria, Illinois 61604, reikalavimus. Deponuotoms kultūroms suteikti atitinkami priėjimo numeriai: NRRL B-21806, NRRL B-21807 ir NRRL B-21808. Kamienai, turintys NRRL B-21806, NRRL B-21807 arba NRRL B-21808 identifikavimo charakteristikas, yra šio išradimo produktai. Šis išradimas apima bet kurią kamieno kultūrą, turinčią kamienų NRRL B-21806, NRRL B-21807 arba NRRL B-21808 identifikavimo charakteristikas, įskaitant subkultūras (ir jų variantus), kurioms būdingos koduojančios antibiotiko 2,4-diacetilflorogliucinolio susidarymą vietos (lokus) ir charakteringi juostiniai modeliai (aprašyti aukščiau) ir kurios išlaiko Gg sukeliamų smulkiagrūdžių kultūrų ir velėnos žolių ligų slopinimo bei charakteringą šaknų kolonizavimo gebą. Terminu "variantai" čia pažymėti

transformantai ir mutantai, kuriems priskirtinos aukščiau įvardintos charakteristikos.

Biologiškai grynos *P. fluorescens* kamienų Z32-97, Z33-97 ir Z34-97 kultūros buvo deponuotos 1997 m. gruodžio 11 dieną, o biologiškai gryna *P. fluorescens* kamieno Z30-97 kultūra deponuota 1997 m. gruodžio 15 dieną agrokultūrų kolekcijoje (Agricultural Research Culture Collection) (NRRL), 1815 North University Street, Peoria, Illinois 61604. Deponuotoms kultūroms buvo suteikti atitinkami priėjimo numeriai: NRRL B-21905, NRRL B-21906, NRRL B-21907 ir NRRL B-21908. Visi kamienai deponuoti pagal Budapešto sutartį. Turintys NRRL B-21905, NRRL B-21906, NRRL B-21907 arba NRRL B-21908 identifikavimo charakteristikas kamienai yra šio išradimo produktai. Šis išradimas apima bet kurią kamieno kultūrą, turinčią identifikavimo charakteristikas NRRL B-21905, NRRL B-21906, NRRL B-21907 arba NRRL B-21908 kamienų, įskaitant subkultūras (ir jų variantus), kurioms būdingos koduojančios antibiotiko fenazino-1-karboksirūgšties susidarymą vietos (lokus), stabiliai įvestos į genomą, kurios slopina *Rhizoctonia* patogeno sukeltas ligas ir išlaiko motininio kamieno 2,4-diacetilflorogliucinolio vietas (lokus). Pageidautiname įgyvendinime kamienas taip pat išlaiko keturias motininio kamieno genetinio profilio juostas (kaip buvo parodyta aukščiau). Terminu "variantas" čia pažymėti transformantai ir mutantai, kuriems priskirtinos aukščiau išdėstytos charakteristikos.

Išradime pateiktų kamienų auginimas. Pirmojo įgyvendinimo fluorescentinių *Pseudomonas* spp. kamienai gali būti auginami bet kurioje tinkamoje kietoje ar skystoje bakteriologinėje terpėje. Terpės pavyzdys - Kingo B terpė. Kamienai auginami aerobinėse sąlygose, esant temperatūrai, tinkamai organizmų vystymuisi, t.y. nuo 15 °C iki 30 °C. Labiausiai tinkamas temperatūros intervalas: apie 24-28 °C. Maitinančios terpės pH yra rekomenduotinas apytikriai neutralus, t.y. pH $\approx$ 6,7-7,2.

Išradimo antrojo įgyvendinimo fluorescentinių *Pseudomonas* spp. kamienai gali būti auginami bet kurioje tinkamoje kietoje ar skystoje bakteriologinėje terpėje. Kingo B terpė - pavyzdinė. Kamienai auginami aerobinėse sąlygose, esant tinkamai organizmų vystymuisi temperatūrai, t.y.

apie 15-30 °C; labiausiai tinkamas temperatūros intervalas: 24-28 °C. Maitinančios terpės pH yra rekomenduotinas neutralus, t.y. $\text{pH} \cong 6,7-7,2$.

Atsarginių kultūrų priežiūra. Kiekvienas kamienas turi būti laikomas sąlygose, užtikrinančiose jo stabilumą. Tokios sąlygos - glicerolio terpė (-80°C).

Gg slopinančių kamienų naudojimas. Išradime pateikti mikroorganizmų kamienai naudotini kovai su smulkiagrūdžių kultūrų ar velėnos žolių ligomis, sukeltomis Gg. Smulkiagrūdžių kultūrų pavyzdžiai - kviečiai, miežiai, rugiai ir kvietrugiai. Gg sukeliama ligų pavyzdžiu gali būti sukeliamas Ggt "iššutimas", kuris yra svarbiausia kviečių šaknų liga, o taip pat kitų *Graminae*, tokių kaip ir miežiai, rugiai ir kvietrugiai. Kiti grybeliai (Gg grupės) Gga infekuoja avižas ir žolę. Jie identifikuojami pagal "iššutimo" dėmes velėnos žolėje - ypač laukų žolėje. Ggg taip pat infekuoja kai kurias laukų žoles.

Biologinei kovai su Gg sukeliamomis ligomis būtina smulkiagrūdės kultūros bei žolę auginti, pridėjus į dirvą atitinkamą išradime pateiktą fluorescentinių *Pseudomonas* kamienų (vieno ar kelių) reikalingą slopinimui kiekį. Efektyvi biokontrolė apibrėžiama tokio biologinio agento kiekiu, kuris slopina (sustabdo plėtimąsi, mažina aštrumą) Gg grupės sukeltas ligas, lyginant su neapdorotu kontroliniu bandiniu. Optimaliai biologiškai gryna kultūra yra taikoma siekiant susilpninti augalo šaknų ligą mažiausiai 15 %, lyginant su neapdorotu kontroliniu bandiniu lauke, kur auginamos smulkiagrūdės kultūros arba velėnos žolė. Biokontrolėi realizuoti efektyvus biokontrolės agento kiekis taikomas augantiems augalams ar jo sėkloms, arba yra įvedamas į augalo ar sėklų lokusą (vietą). Pvz., kamienas yra naudojamas apdorojant sėklas, dirvą, vagas ar drėkinant velėną bei dirvą. Gali būti naudojamos šalčiu džiovintos ląstelės.

Kamienas gali būti įmaišytas į kompozicijas, kurios naudojamos smulkiagrūdėms kultūroms ir velėnos žolėms. Jį galima sumaišyti su bet kuriuo agrokultūros ar agronomijos siūlomu nešikliu, neturinčiu įtakos kamieno aktyvumui. Nešiklių pavyzdžiai - vanduo, buferis, metilceliuliozė, durpžemis ar vermikulitas. Kai kamienas vartojamas suspensijos ar

emulsijos pavidalo (skysto nešiklio terpėje), suspensijos ar emulsijos sudėtyje gali būti įprastiniai priedai: paviršiaus aktyviosios medžiagos bei drėkinantys agentai. Išradime pateiktas kamienas gali būti komponuojamas ir su kitais, biologinei kovai tinkamais kamienais.

Naudojimo būdų pavyzdžiai ir efektyvūs kiekiai aprašyti žemiau. Kiekis, atitinkantis konkretaus atvejo efektyvumo diapazoną, nustatomas eksperimentiniais bandymais.

Smulkiagrūdžių kultūrų ar velėnos žolių sėklų apdorojimui bakterijos įvedamos į 0,5-2,0 % metilceliulozės suspensiją, siekiant iki minimumo sumažinti bakterijų džiūvimą ir stimuliuoti jų sankabumą su sėklomis. Suspensija ir sėklos maišomos tol, kol kiekviena sėkla pasidengia 10^2 - 10^6 CFU vienai sėklai. Apskritai, pageidautinas koloniją sudarančių vienetų kiekis yra apie 10^4 - 10^5 CFU vienai sėklai. Apdorotos sėklos išdžiovinamos ore.

Apdorojant dirvožemį, bakterijos suspenduojamos vandenyje ar buferyje ir naudojamos pirmojo dirvožemio sudrėkinimo metu, siekiant gauti apie 10^2 - 10^6 CFU vienam dirvožemio gramui. Apdorojant velėną, 2 ml laistymo medžiagos, turinčios 10^2 - 10^6 bakterijų viename mililitre, supilama į 1 cm diametro žolės plotą.

Tipinis reikalavimas kolonizavimo aktyvumui, esant kietam nešikliui (pvz., durpžemiui ar vermikulitui), yra apie 10^7 - 10^9 CFU vienam nešiklio gramui. Kai nešiklis skystas, reikalaujama 10^8 - 10^{10} CFU vienam nešiklio mililitrui. Šaldymu džiovintai konsistencijai tipinis kiekis yra 10^{10} - 10^{11} CFU vienam konsistencijos gramui ir savo sudėtyje gali turėti priedų, žinomų šioje srityje.

Motininiai kamienai transgeninių kamienų pagal išradimą gavimui. Išradime gaunamiems transgeniniams kamienams sudaryti yra tinkami motininiai kamienai, turintys šias charakteristikas: kamienas turi biosintezės vietas (lokus), koduojančias 2,4-diacetilflorogliucinolio susidarymą, ir unikalų genotipą, kaip parodyta būdingu jo genomui juostiniu modeliu (smulkiai aprašytu žemiau, ir parodytu Fig. 1). Šis profilis gali būti indentifikuotas RAPD analize, naudojant M13 pradmenį, kaip pavaizduota žemiau, 5-me pavyzdyje. Pavyzdiniai motininiai kamienai yra *P. fluorescens* kamienai: Q8r1-96, L5.1-96 ir ML4.9-96, aptarti anksčiau.

Pagal šį išradimą motininis kamienas turi charakteringą juostinį profilį, jei spektro juostos yra ties $600\pm 50\text{bp}$, $700\pm 50\text{bp}$, $800\pm 50\text{bp}$, $900\pm 50\text{bp}$, esant sąlygoms, aprašytoms 5 pavyzdyje. Transgeniniame kamienne motininio kamieno juostos pasipildo ties $330\pm 20\text{bp}$ ir $1100\pm 60\text{bp}$. Norint alternatyviai identifikuoti, ar motininis kamienas turi charakteringą juostinį modelį, testuojamas kamienas agarų gelyje vizualiai palyginamas su *P. fluorescens* kamieniu Q8r1-96 $600\pm 50\text{bp}$ ÷ $900\pm 50\text{bp}$ juostų intervale. Jei tikrinamo kamieno profilis šiame intervale sutampa su Q8r1-96 profiliu, tikrinamas kamienas turi charakteringą motininiam kamienui juostinį modelį ir papildomai slopina sukeltas Gg laukuose auginamų smulkiagrūdžių kultūrų arba velėnos žolės ligas bei rodo šaknų kolonizavimo gebą, pasižyminčią tiek didesniu populiacijos tankiu, tiek didesniu kolonizavimo aktyvumu, lyginant su žinomais Gg slopinančiais kamienais.

Motininio kamieno aktyvumas biologinėje kovoje. Biologiškai gryną fluorescentinių *Pseudomonas spp.* kamienų aktyvumas biologinėje kovoje aptartas aukščiau.

TAD ("iššutimą" slopinančios) dirvos biologinės kovos atkartojimas. Išradime pateiktas motininis kamienas yra charakterizuojamas kaip slopinantis smulkiagrūdžių kultūrų Gg sukeltas ligas tuo pačiu biologiniu lygiu, kaip ir tada, kai smulkiagrūdės kultūros auginamos natūraliose TAD ("iššutimo" slopinimo) sąlygose. Tai yra, kamienas sugeba atkartoti biologinės kovos lygį, būdingą TAD dirvai. Pvz., pavyzdinio motininio kamieno Q8r1-96 naudojimo dozė 10^4 CFU vienai sėklai, po to pasėtai Quincy plėšininėje pralaidžioje dirvoje, tiek pat efektyviai slopino "iššutimą", kaip ir Quincy TAD dirva. Be to, Q8r1-96 Lind plėšininėje pralaidžioje dirvoje buvo tiek pat efektyvus, kaip ir Quincy TAD dirva, pridėta į Lind dirvą 10 masės%/masės. "Iššutimo" slopinimo atkartojimas, ekvivalentiškas natūraliam TAD, yra beprecedentis.

Motininį kamieną, pageidautina, naudojamą kaip atsarginę medžiagą aukščiau minėtuose procesuose, gavimo būdas yra aptartas aukščiau, atžvilgiu motininio kamieno - biologiškai gryną *P. fluorescens* kultūrų pavyzdžių: Q8r1-96, L5.1-96 ir ML4.9-96.

Motininių kamienų auginimas ir atsarginių jų kultūrų priežiūra yra vykdoma kaip aprašyta aukščiau, ryšium su transgeninių kamienų paruošimu pagal šį išradimą.

PAVYZDŽIAI

Žemiau pateikti pavyzdžiai yra skirti vien tik plačiau iliustruoti išradimą, o ne apriboti jo teisinę apimtį, kuri yra nustatyta apibrėžtyje.

1 pavyzdys

Šis pavyzdys aprašo pirmojo išradimo įgyvendinimo fluorescentinių *Pseudomonas* spp. atranką.

Apžvalga. *Pseudomonas fluorescens* kamienai Q8r1-96, L5.1-96, ML4.9-96 buvo išskirti 1996 metais iš kviečių, auginamų dirvožemyje, surinktame iš agrokultūrinių laukų, esančių TAD būsenoje, šaknų prie Quincy, Lind, Moses Lake, Vašingtono valstijoje (JAV). Q8r1-96 buvo išskirtas iš kviečių, augintų Quincy TAD dirvoje, šaknų, per 8 vienas po kito einančius ciklus (trunkančius po tris savaites); L5.1-96 išskirtas iš kviečių, augintų Lind TAD dirvoje, šaknų, per vienas po kito einančius 5 ciklus; ML4.9-96 - iš kviečių šaknų, augintų Moses Lake TAD dirvoje per vienas po kito einančius 4 ciklus (kiekvieno trukmė - 3 savaitės).

Toliau yra pateiktas smulkus dirvožemių aprašymas ir išskyrimo bei charakterizavimo technika.

Dirvožemiai. Trys skirtingi dirvožemiai buvo paimti iš Quincy, Lind, Moses Lake apylinkių Vašingtono valst.(JAV) agrokultūrinių laukų, esančių TAD būsenoje. Visos trys dirvos yra slopinančios kviečių "iššutimą". 1995 metų duomenimis, Lind TAD laukas buvo be pertraukos užsėjamas kviečiais 28 metus. Quincy ir Moses Lake TAD laukai (1980 m. duomenimis) buvo kviečiais be pertraukos užsėjami 22 metus, o 1980-95 metais juose augintos šalia kviečių ir kitos kultūros. Dirvų bandiniai buvo paimti 1995 m. kovo mėnesį iš 30-ties cm viršutinio dirvos sluoksnio ir džiovinami ore 1 savaitę. Po to, prieš naudojimą bandiniai buvo sijojami (sieto tankis - 0,5 cm dydžio

skylutės). Bandinių fizikinės ir cheminės savybės nustatytos Idaho Universiteto Analitinių mokslų laboratorijoje.

1 etapas: vienas po kito einantys kviečių augimo ciklai, siekiant pagausinti Phl gamintojus.

Po 12 kviečio sėklų buvo pasodintos keturkampiuose PVC puodeliuose (aukštis - 8 cm, plotis - 7,5 cm), kuriuose buvo po 200 g sijoto natūralaus dirvožemio (Quincy, Lind ar Moses Lake TAD dirvos), sudrėkinto 50 ml vandens su metalaksilu (Novartis, Greensboro, NC), 2,5 mg·ml⁻¹ aktyvaus ingrediento, siekiant kontroliuoti *Pythium* šaknų puvinį. *Pseudomonas* pastarojo fungicido neveikiamos. Virš sėklų buvo paskleistas 1 cm storio dirvožemio sluoksnis. Augalai buvo auginami kontroliuojamos aplinkos kameroje, 16 °C temperatūroje, su 12 val. šviesos periodu. Du kartus per savaitę į puodelius įpilama 50 ml atskiesto santykiu 2:3 tūris/tūris Hoaglundo tirpalo (tikrai makroelementai). Praėjus 3-4 auginimo savaitėms, augalų želmenys buvo nupjauti prie dirvos paviršiaus, o žemė su šaknimis perdėta į plastiko maišelį, stipriai plakama, siekiant aeruoti ir sumaišyti. Taip "kultivuotas" dirvožemis, išlaikytas apie savaitę 15 °C temperatūroje, vėl gražintas į tą patį puodelį ir iš naujo užsėtas 12 kviečio sėklų. Ši augalų auginimo ir nupjovimo procedūra kartota mažiausiai 4 (iki 8) vienas po kito einančių ciklų. Ciklų metų buvo atsitiktinai atrenkami augalo keturi pavyzdžiai iš kiekvieno pakartojimo ir šaknų pavyzdžiai buvo ruošiami, siekiant nustatyti antibiotiką gaminančio fluorescentinio *Pseudomonas* spp. populiacijos mastą.

2 etapas: fluorescentinių *Pseudomonas* spp. išskyrimas iš TAD dirvožemyje ciklais augintų kviečio šaknų.

Keturi atsitiktinai pasirinkti augalai, auginti 1-e etape, buvo imami nuo kiekvieno pakartojimo, ir laisvai prilipusi žemė buvo atsargiai nukratoma nuo šaknų. 1 g šaknų su šaknų plaukeliais buvo suspenduojamas 5-iose ml sterilaus vandens ir vieną minutę stipriai kratomas Vortex maišiklyje. Po to vieną minutę bandinių ląstelės buvo ardomos ultragarsu ultragarsiniame valytuve, ir eiliniai šaknų skiediniai užnešami ant King'o B terpės [KMB] agaro (proteozės peptonas - 20 g; glicerolis - 10 ml; K₂HPO₄ - 1,5 g; MgSO₄

- 1,5 g; agaras -15 g; H₂O -1000 ml), praturtinto cikloheksimidu (100 µg·ml⁻¹), chloramfenikoliu (13 µg·ml⁻¹) ir ampicilinu (40 µg·ml⁻¹) [KMB⁺]. Plokštelės inkubuojamos 25 °C temperatūroje. Po 48 valandų kolonijos buvo sunumeruotas. Fluorescentinių *Pseudomonas* spp. kolonijos ultravioletinėje šviesoje (bangos ilgis - 366 nm) buvo atskirtos nuo nefluorescentinių kolonijų.

3 etapas: Kolonijos kryžminimas (hibridinimas) su specifiniu zonu, siekiant nustatyti Phl gamintojus.

Skaitlingos fluorescentinės *Pseudomonas* spp. rūšys, turinčios Phl gaminančius genus, nustatomos kolonijos hibridinimu. Bakterijų kolonijų pernešimas į Hybond-N⁺ nailono membranas (Amersham) buvo atliktas standartiniais būdais. Išdžiovintos ore membranos 1 val. šildytos vakuuminėje krosnyje, 80 °C temperatūroje. Bakterijų ląstelių atplaišoms pašalinti membranos buvo plaunamos 1,5 val. 42 °C temperatūroje, tirpale, kurio sudėtis: 2 x SSPE (20 mM NaH₂PO₄ [pH 7,4]; 0,36 M NaCl, 2 mM EDTA); 0,1 % natrio dodecilsulfato (SDS) ir proteinazės (100 µg·ml⁻¹). Po to membranos vėl plautos 1 val. 56 °C temperatūroje, 2 x SSPE ir 0,1 % SDS tirpale. Hibridinimas atliktas standartiniais būdais, išlaikant itin griežtas sąlygas: 1,5 val. išankstinis hibridinimas 65 °C temperatūroje, 12 val. hibridinimas 65 °C temperatūroje, du kartus membrana plaunama po 5 minutes kambario temperatūroje 2 x SSC ir 0,1 % SDS tirpale, du kartus ji plaunama 30 minučių 65 °C temperatūroje 0,1 x SSC ir 0,1 % SDS tirpale.

Zondai generuojami iš sekų biosintezės vietose (lokus), sudarančiose 2,4-diacetilflorogliucinolį (genų banko kodo Nr. U41818). Zondas konstruotas iš kamieno Q2-87 vidinių geno Phl D sekų, atsitiktinai atžymint PCR fragmentus, naudojant neradioaktyvią DIG sistemą (Boehringer Mannheim). Hibridizuoti zondai buvo imunodetektuojami anti-digoksigenino-AP-Fab fragmentais ir vizualizuoti kolorimetriniais substratais - tetrazolio nitromėlio druska ir 5-brom-4-chlor-3-indolilfosfatu (pagal tiekėjo protokolus).

Norint atskirti Phl gamintojus, membranos signalai sugretinami su kolonijomis, paskleistomis ant agaro plokštelės. Kiekviena individuali kolonija, duodanti signalą membranoje, buvo surinkta, pasėta ir dar kartą

pasėta ruoželiais, kol kamienas tapo stabilus ir grynas, t.y. pasidarė biologiškai gryna kultūra. Kiekvienas kamienas po to buvo saugomas glicerolyje, 80 °C temperatūroje, siekiant išlaikyti jį stabilų.

3a etapas (pasirinktinis): PhI gamintojų patvirtinimas PCR būdu.

Šis etapas leidžia iš kolonijos hibridinimo analizės eliminuoti tariamai teigiamus kolonijos hibridinimo signalus.

Šilumos ardomų bakterijų suspensijos, naudotos PCR analizėje, buvo paruoštos iš kultūrų, 48 valandas 25 °C temperatūroje augintų ant KMB. Dvi bakterijų kolonijos (2 mm diametro) buvo suspenduotos 100 µl lizės tirpale (0,05 M-NaOH; 0,25 % SDS) ir inkubuojamos 15 minučių, 100 °C temperatūroje. Po to suspensija centrifuguojama 1 min., esant 12000 aps. per min. ir 50 kartų praskiesta steriliu distiliuotu vandeniu. Kiekvienai reakcijai naudota 5 µl praskiestos suspensijos.

Pradmenys ir PCR analizė. Pradmenys - oligonukleotidai, panaudoti PCR, formuojami iš vidinių *P. fluorescens* Q2-87 struktūros sekų 2,4-diacetilflorogliucinolio (PhI) biosintezės vietoje (lokus) (genų banke priėjimo Nr. U41818). Pradmenys buvo susintetinti Operon Techn. Inc. (Alameda, CA). Pradmenys PhI2a (seka: GAGGACGTCTGAAGACCACCA) ir PhI2b (seka: ACCGCAGCATCGTGTATGAG) buvo suformuoti iš vidinių *phI D* struktūros sekų. Tai leidžia prognozuoti baltymą iš 349 aminorūgščių, homologišką chalkono sintezei iš augalų.

PCR amplifikacija atlikta 25-iuose µl reakcijos mišinio, kurio sudėtis: 5 µl praskiestos šilumos išardytų ląstelių suspensijos, 1 x GeneAmp PCR buferis (Perkin Elmer Corp., Norwalk, CT), po 200 µM kiekvieno dATP, dTTP, dGTP ir dCTP (Perkin Elmer), 20 pM kiekvieno pradmens ir 2,0 U AmpliTag DNR polimerazės (Perkin Elmer). Kiekvienas mišinys buvo padengtas vienu mineralinės alyvos lašu.

Amplifikacijos atliktos termostate (Perkin Elmer Thermal Cycler 480). PCR programą sudarė pradinis denatūravimas (2 min. 94 °C temperatūroje), lydymas 30 ciklų po 60 sek., esant 94°C; 45 sek., esant 67°C ir 60 sek., esant 72 °C temperatūrai. PCR produktų (po 9 µl) pavyzdžiai atskiriami 1,2 % agaro gelyje su 1 x TBE buferiu (90 mM Tris-boratai, 2 mM EDTA; (pH 8,3))

per tris valandas, esant 75 V. Toliau gelis dažomas etižio bromidu (30 min.). PCR produktai vizualizuoti ultravioletiniame transiliuminatoriuje.

4 etapas: RAPD analizė Phl gamintojų nustatymui pagal identifikuojantį juostinį modelį. RAPD analizė (Random Amplified Polymorphic DNA - atsitiktinė amplifikuota polimorfinė DNR) su pradmeniu M13 atlikta, turint tikslą sugrupuoti skirtingus Phl gaminančius fluorescentinius *Pseudomonas* kamienus, išskirtus iš šaknų kviečių, augintų Quincy, Lind ir Moses Lake TAD dirvožemyje.

DNR amplifikacija atlikta 25 μ l reakcijos mišinio, kurio sudėtyje - 5 μ l praskiestos, šilumos suardytų ląstelių suspensijos, 1 x GeneAmp PCR buferio (Perkin Elmer Corp., Norwalk, CT) ir po 200 μ M dATP, dTTP, dGTP ir dCTP (Perkin Elmer), 80 pM pradmens M13 ir 2,0 U AmpliTag DNR polimerazės (Perkin Elmer). Kiekvienas mišinys užpiltas mineralinės alyvos lašu. Amplifikacijos atliktos Perkin Elmer terminiaame ciklų uždaviklyje 480. PCR programą sudarė pradinis denatūravimas (1 min. 30 sek. 94 °C temperatūroje), lydimas kaskart 2 ciklų procedūrų: 30 sek. 94 °C; 30 sek. 36 °C; 2 min. 72 °C temperatūroje. Po pastarųjų - kaskart 40 ciklų: 20 sek. ciklai 94 °C; 15 sek. ciklai 36 °C, 15 sek. ciklai 45 °C; 1,5 min. ciklai 72 °C temperatūroje. Po to dar vienas 10 min. ciklas 72 °C temperatūroje. PCR produktų pavyzdžiai (po 9 μ l) atskiriami 2,5 % agarose gelyje, įsodrintame 1 x TBE buferiu (90 mM Tris-borato; 2 mM EDTA (pH 8,3)), 5 valandas, esant 75 V. Po to gelis dažomas etidžio bromidu 60 min.. PCR produktai vizualizuojami ultravioletiniame transiliuminatoriuje.

Išradime pateikti biologiškai gryni fluorescentiniai *Pseudomonas* kamienai rodo unikalų juostinį modelį, kaip demonstruoja RAPD analizė (pradmuo M13). Fig. 1 rodo *P. fluorescens* Q8r1-96, ML4.9-96 ir L5.1-96 kamienų juostinius modelius (RAPD spektrą). 1-asis takas rodo laiptelius 1-kb kaip palyginamuosius. Iš Fig. 1 matyti, kad išradime pateiktiems kamienams būdingas juostų rinkinys yra: 330 $\pm$ 20bp, 600 $\pm$ 50bp, 700 $\pm$ 50bp, 800 $\pm$ 50bp, 900 $\pm$ 50bp ir 1100 $\pm$ 60bp.

2 pavyzdys

Šis pavyzdys parodo, kad išradimo pirmojo įgyvendinimo biokontrolės

kamienas atkartoja TAD biologinės kovos lygį.

P. fluorescens kamienas Q8r1-96 atskirtas ir daugintas aukščiau aprašytu 1-ajame pavyzdyje būdu. Bakterijos buvo suspenduotos 0,5 % metilceliuliozėje ir sumaišytos su kviečių sėklomis (Cv. Penawawa) doze 10^4 CFU vienai sėklai. Sėklos, panaudotos kaip kontroliniai bandiniai, gavo tiksliai metilceliuliozę. Quincy plėšininis, Quincy TAD, Pullman pralaidusis ir Pullman TAD dirvožemiai buvo modifikuoti 0,5 % masė/masė) avižų grūdine medžiaga (0,25-0,5 mm dydžio), turinčia "iššutimo" patogeno. Po keturias tiriamas sėklas pasėta keturkampiuose plastikiniuose puodeliuose (3 cm x 3 cm), užpildytuose (po 50 g) sijotu natūraliu dirvožemiu, sudrėkintu vandeniu, praturtintu metalaksilu (Novartis, Greensboro, NC) su 2,5 mg/ml aktyvaus kovoje su *Pythium* ingrediento. Augalai auginti kontroliuojamoje klimatinėje kameroje, 16 °C temperatūroje su 12 val. šviesos periodu. Du kartus per savaitę puodelių turinys gavo (2:3 tūris/tūris) Hoaglund'o skiedinio (makroelementai). Praėjus keturioms savaitėms, želmenys buvo nupjauti, šaknų ligos būseną įvertinta, daigai sveriami ir matuojami.

Rezultatai pateikti žemiau, lentelėje. Rezultatai rodo, kad įvestas į Quincy plėšininį ar Pullman pralaidų dirvožemį Q8r1-96 kamienas demonstruoja tokį pat ligos slopinimo mastą, kaip ir Quincy TAD, Pullman TAD dirvožemiai ar perkeltas į Pullman pralaidų Quincy TAD dirvožemis.

Q8r1-96 kamienas nedidina Pullman TAD dirvožemyje stebimo ligos slopinimo lygio.

1 LENTELE: Phl gaminančio *Pseudomonas fluorescens* kamieno Q8r1-96 ir Quincy TAD perkeltos dirvožemio poveikis "iššutimo" aštrumui natūraliuose dirvožemiuose

Apdoroti dirvožemiai ^{u)}	Phl gamintojai ^{v)} (CFU vienam šaknų gramui)	Ligos ^{v, w)} aštrumas	Augalo masė ^{v)} (mg)	Daigo aukštis ^{v)} (mm)
1 eksperimentas				
Quincy plėšininis	nerasta ^{x)}	4,2 a	180 a	106 a
Quincy plėšininis. + Q8r1-96	$4,6 \times 10^6$ a	3,1 b	262 b	133 b
Quincy TAD	$3,7 \times 10^5$ b	2,5 b	281 b	139 b
2 eksperimentas				
Pullman Cond. (pralaidus)	nerasta	3,8 a	212 a	142 a
Pullman Cond. + Quincy TAD (9:1) ^{y)}	$4,5 \times 10^5$ a	2,1 b	335 b	181 b
Pullman Cond. + Q8r1-96	$4,5 \times 10^7$ c	2,5 b	288 b	172 b
Pullman TAD	$1,3 \times 10^6$ b	1,9 b	336 b	184 b
Pullman TAD + Quincy TAD (9:1) ^{y)}	$3,5 \times 10^5$ a	2,3 b	286 b	177 b
Pullman TAD + Q8r1-96	$3,4 \times 10^7$ c	2,3 b	306 b	178 b

^{u)} Quincy ir Pullman Cond. dirvožemiai - abu pralaidūs kviečių "iššutimo" ligai, kai tuo tarpu papildymas TAD dirvožemiu slopina "iššutimą". Mikrofloros suaktyvinimui Quincy plėšininis ir Quincy TAD dirvožemiai buvo kultivuoti kviečiams šešis (kiekvienas po 4 savaites) paeiliui einančius ciklus. Pullman Cond. ir Pullman TAD dirvožemis paimtas tiesiai iš kviečių lauko. Visi dirvožemiai buvo modifikuoti avių grūdine medžiaga (0,5 % masė/masė), turinčia "iššutimo" patogeno. Apdorotos Q8r1-96 bakterijomis kviečių sėklos gavo 10^4 CFU vienai sėklai dozė.

^{v)} Įvesto kamieno Q8r1-96 ar natūraliai susidariusio Phl gaminančio fluorescentinio *Pseudomonas* spp. populiacijos apimtis, ligos aštrumas, šviežio augalo masė ir daigo aukštis buvo nustatyti po keturių augimo savaičių. Lentelėje pateiktos šešių pakartojimų dviejų augalų pavyzdžių vidutinės reikšmės. Phl gaminančių *Pseudomonas* spp. populiacijos tankio, augalų masės (šviežių augalų) ir daigų aukščio skaitinių reikšmių skirtumai tarp apdorotų dirvožemių buvo įvertinti Studentized Range testu. Ligos aštrumo skirtumai buvo analizuoti Wilcoxon Rank Sum testu. Kiekvienam eksperimentui ir kiekvienam parametrai skirtingomis raidėmis pažymėti vidurkiai statistiškai tarpusavyje žymiai skyrėsi ($\alpha = 0,05$).

^{w)} "Iššutimo" ligos aštrumas buvo įvertintas skalėje 0-8 (0 - ligos nėra, 8 - augalas žuvęs).

^{x)} Žemiau negu 10^4 CFU · g⁻¹ šaknų apatinė riba.

^{y)} Tiek Pullman Cond (pralaidus), tiek Pullman TAD dirvožemis maišytas su Quincy TAD dirvožemiu santykiu 9:1 (masė/masė).

3 pavyzdys

Šis pavyzdys aprašo biologinę kovą su lauke augintų kviečių "iššutimu". *Pseudomonas fluorescens* Q8r1-96 buvo išbandomas komerciniame lauke šalia Almato, WA. Praėjusiais metais šiame lauke buvo nuimtas kviečių derlius. Laukas natūraliai užsikrėtęs "iššutimo" liga.

Eksperimentai. Pavasariniai kviečiai (Alpowa rūšis) buvo pasėti nesuaroje dirvoje į žeminių kviečių ražieną. Atskirtas ir kultivuotas *P. fluorescens* Q8r1-96 kamienas (žiūr. 1 pavyzdį) 1,5 % metilceliuliozės suspensijoje buvo panaudotas pavasariinių Alpowa kviečių sėkloms doze apie 1×10^5 ir 1×10^6 CFU vienai sėklai. Kontroliuota lyginant su neapdorotomis kamieniu kviečių sėklomis. Pirmame kontroliniame bandinyje, 2-ojoje lentelėje pažymėtame terminu "dezinfekuota", neapdorotos sėklos buvo pasėtos į metilo bromidu dezinfekuotą dirvą, siekiant patogeną eliminuoti ir sukurti kontrolinį bandinį, pavadintą "sveikuoju". Kitu atveju, pažymėtu "kontrolinis", neapdorotos sėklos pasėtos į natūralią dirvą, siekiant sukurti ligotą kontrolinį bandinį. Tyrimo sklypą sudarė 8 eilės (tarpas tarp eilių - 1 pėda). Kiekvienos eilės ilgis - 25 pėdos. Kviečiai buvo nupjauti, praėjus 135 dienoms nuo sėjos.

Rezultatai. Duomenys pateikti 2-oje lentelėje. Kaip matyti iš duomenų, kamienas Q8r1-96 sumažino infekuotų augalų skaičių 20 %.

2 LENTELE

Apdorojimo pobūdis	Augalai, užkrėsti "iššutimu", % ^{a)}
Kontrolinis	69,3 A
Q8r1-96	48,0 B
Dezinfekuota	13,3 C

^{a)} duomenų vidurkiai, pažymėti ta pačia raide diapazone žymiai nesiskiria; $P = 0,1$; $LSD = 21,1$

4 pavyzdys

Šis pavyzdys demonstruoja išradime pateiktų kamienų kolonizavimo gebos pranašumą.

Išradime pateiktas kamienas *Pseudomonas fluorescens* Q8r1-96 buvo palygintas su *P. fluorescens* kamienais M1-96 ir Q2-87 (nesusietais su išradimu). Visi trys kamienai gamina antibiotiką 2,4-diacetilflorogliucinolį ir pasižymi tipiškais *P. fluorescens* fiziologiniais požymiais ir substrato panaudojimo būdais, aprašytais Bergey žinyne (žiūr. 3 lentelę žemiau). Tačiau išradime pateikti kamienai, atstovaujami pavyzdžio Q8r1-96, turi charakteringą RAPD juostinį modelį, nesusijusį su šio išradimo kamienų spektrais.

3 LENTELE

	Q8r1-96	Q2-87
Dažas pagal Gramą	-	-
Forma	lazdelė	lazdelė
Fluorescuojantis pigmentas	+	+
Oksidazė	+	+
Arginino dihidrolazė	+	+
Gliukozės fermentacija	-	-
β -galaktozidazė	-	-
Želatinos hidrolizė	-	+
Denitrifikavimas	+	+
Panaudojimas:		
D-gliukozės	+	+
L-arabinozės	+	+
sacharozės	+	+
propionato	+	+
butirato	-	-
gliucitolio	+	+
adonitolio	-	-
D-manito	+	+
N-acetil-D-gliukozamino	+	+
maltozės	-	-
D-gliukonato	+	+
kaprato	+	+
adipato	-	-
L-malato	+	+
citrato	+	+
fenilacetato	-	-

Šiais tyrimais nustatant kolonizavimo gebą, kiekvienas kamienas buvo įvestas į Quincy plėšininį, Lind plėšininį ir Moses Lake plėšininį dirvožemį

doze kiekvienam dirvožemiui - 100 CFU (bakterijų ląstelės) dirvožemio bandinio gramui (puodelio matmenys - 8 cm aukščio ir 7,5 cm pločio). Kviečiai (Penawawa) kiekviename dirvožemyje buvo auginti 3 savaites. Po to augalai buvo nupjauti, o bakterijų populiacijos ant šaknų nustatomos išsėjant praskiedimo būdu. Dirvožemis ir su juo susieta šaknų sistema buvo perpilama į plastiko maišelį, kratoma, siekiant sumaišyti ir aeruoti. Praėjus savaitei po nupjovimo, kiekvienas dirvožemis grąžinamas į tą patį puodelį ir iš naujo užsėjama kviečiais. Tuo būdu, kiekvieno ciklo trukmė tarp sėjos - 4 savaitės.

Rezultatai. Fig. 2 rodo trijų kamienų populiacijos Quincy plėšiniame dirvožemyje tankį (CFU vienam šaknų gramui) po 9 ciklų. Nesunku pastebėti, kad net po 9 ciklų kamienas Q8r1-96 rodo didesnę populiacijos tankį, negu 10^5 CFU/šaknų gramui. Priešingai, kamienų (nesusietų su išradimu) M1-96 ir Q2-87 populiacija yra tik 10^2 CFU vienam šaknų gramui. Kaip matyti iš duomenų, išradime pateiktų kamienų kolonizavimo geba viršija kitų biologinės kontrolės kamienų rodiklius; išradime pateikti kamieniai kolonizuoja šaknis žymiai intensyviau ir pasižymi plačiu kolonizavimo aktyvumu.

Biologinės kovos aktyvumo palyginimas Quincy plėšiniame dirvožemyje. 9-ajame cikle į dirvą buvo įvestas Ggt užkratas kolonizuotų avižų grūdų pavidalu. Prieš tai užkratas buvo sumaltas ir išsijotas. Po to jo 0,25-0,50 mm dalelės įmaišomos į dirvožemį, esant koncentracijai 0,5 % (masė/masė). "Iššutimo" liga vertinta skalėje 0-8 (aprašyta žemiau). Bakterijos lygintos su kontroliniu bandiniu, kuriame į dirvožemį bakterijų nebuvo pridėta. Augalai buvo auginami puodeliuose (8 cm aukščio ir 7,5 cm pločio) 4 savaites. Duomenys pateikti 4-ojoje lentelėje, žemiau. Kaip matyti iš lentelės, vien tik Q8r1-96 (išradime pateiktas kamienas) slopino ligą. Apdoroti nesusijusiais su išradimu kamienais augalai rodė tą patį ligos mastą, kaip ir kontroliniai (neapdoroti kamienais augalai). Kamieno Q8r1-96 pranašumą slopinant ligą (9-ajame cikle) galima paaiškinti aukštu šaknų kolonizavimo lygiu ir jo pastovumu. Visa tai rodo šio kamieno, kaip biologinės kovos medžiagos, agresyvumą.

4 LENTELĖ

Kamienas	Ligos aštrumas ¹⁾
Q8r1-96	3,33 a ²⁾
M1-95 ³⁾	6,42 b
Q2-87 ³⁾	6,08 b
Kontrolinis bandinys	6,00 b

¹⁾ "Iššutimas" vertintas skalėje nuo 0 iki 8 (Ownley ir kt., Phytopathology 82: 178-184 (1992)), kur 0 - jokia liga nestebima; 1 - <10 % šaknų plote - juodi pakenkimai; 2-10-25 % šaknų plote juodi pakenkimai; 3->25 % šaknų plote juodi pakenkimai ir viena šaknis su stiebo apačios pakenkimu; 4 - daugiau, negu viena šaknis su stiebo apačios pakenkimu; 5 - visos šaknys su stiebo apačios pakenkimu, ir bent vienas pakenkimas stiebo žemutinėje dalyje, tačiau be lapų chlorozės; 6 - daug stiebo pakenkimų ir pirmojo tikrojo lapo chlorozė; 7 - visi lapai chloroziniai ir augalas sunykęs; 8 - augalas žuvęs ar beveik žuvęs.

²⁾ Reikšmių vidurkiai, žymimi ta pačia raide, tarpusavyje žymiai nesiskiria, $P = 0,05$.

³⁾ Kamienai, nesusiję su išradimu, pateikti tik palyginimui.

Fig. 3-4 rodo trijų kamienų populiacijos tankį (CFU/ vienam šaknų gramui) Lind ir Moses Lake plėšininiuose dirvožemiuose po 7 ciklų, atitinkamai. Akivaizdu, kad net po 7-ų ciklų kamieno Q8r1-96 populiacijos tankis viršija 10^5 CFU vienam šaknų gramui. Priešingai, kamienai (nesusiję su išradimu) M1-96 ir Q2-87 sumažino populiacijos tankį iki 10^2 CFU vienam šaknų gramui. Kaip matyti iš duomenų, išradime pateikto kamieno kolonizavimo geba pranašesnė, negu kitų kamienų; jis kolonizuoja šaknis žymiai aukštesniu lygiu ir platesniu kolonizavimo aktyvumu. Aukštesni kolonizavimo rezultatai aktyvesnėje biologinėje kovoje buvo palyginti su nesusijusiais su išradimu kamienais.

Fig. 5 vaizduoja išradime pateikto kamieno *P. fluorescens* Q8r1-96 kolonizavimo gebą Quincy, Lind ir Moses Lake plėšininiuose dirvožemiuose. Iš pateiktų duomenų matyti, kad išradime pateiktam kamienui dirvos tipas neturi įtakos.

5 pavyzdys

Šis pavyzdys aprašo pavyzdinių transgeninių, fenazina gaminančių fluorescentinių pseudomonadų kamienų konstravimą. Visuose žemiau

išvardintuose eksperimentuose naudoti standartiniai plazmidės DNR išskyrimo, apribojimo fermento įsisavinimo, agarų gelio elektroforezės, ligiravimo ir transformavimo būdai (F.M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, K. Struhl, 1995. Short protocols in Molecular Biology. J. Wiley and Sons, NY). Visi fermentai (įskaitant apribojimo endonukleazes, T4 DNR ligazę, Klenow'o DNR polimerazės I fragmentą) ir reikalingi atlikti žemiau nurodytiems eksperimentams reagentai yra perkami firmoje Life Technologies, Gaithersburg, MD. Gelio ekstrakcijos įranga QIAEX II gali būti įgyta firmoje QIAGEN Inc., Chatworth, CA. Ši įranga panaudota DNR ekstrakcijai iš agarų gelių. *Escherichia coli* kamienas JM109, naudotas visiems DNR klonavimo eksperimentams, gali būti įgytas firmoje Promega Corporation, Madison, WI. Visi bakterijų kamienai dauginami LB terpėje (Bacto tryptone (Difco Laboratories., Detroit, MI), 10 g; Bacto mielių ekstraktas (Difco Laboratories Detroit, MI) - 5 g; NaCl - 5 g; H₂O - 1000 ml).

1 etapas. *phz* genų klonavimas, kontroliuojant *tac* promotoriui.

6,8-kb *Bgl*II-*Xba*I DNR fragmentas, turintis *P. fluorescens* 2-79 genus *phz*-A, -B, -C, -D, -E, -F, -G, buvo įterptas į pALTER-Ex1 klonavimo vektorių *Bam*HI ir *Xba*I klonavimo (dauginimo) vietas. Vektorius turi universalų polilinkerį su stipriu *tac* promotoriumi klonuotų genų *in vivo* bei *in vitro* išreiškimui. pALTER-Ex1 klonavimo vektorių galima įgyti iš firmos Promega Corporation, Madison, WI. Po DNR susiuvimo pavyzdys buvo transformuotas į kompetentingas *E. coli* JM109 ląsteles. Transformantai buvo atrenkami LB agar-agare, modifikuotame 12 µg/ml tetraciklino. LB skystoje terpėje (su tetraciklinu) užaugintos kelios individualios kolonijos buvo panaudotos DNR plazmidės gryninimui. *phz* biosintezės vietų (lokus) įterpimas buvo patvirtintas įsisavinimu su apribojimo endonukleazėmis.

2 etapas. Perkeliamų fenazino biosintezės vietų (lokus) kopijų konstravimas.

pALTER Ex1 DNR, talpinanti *phz* genus, buvo įsisavinta su *Sca*I, *Xba*I, *Hind* III apribojimo endonukleazėmis, kurios generavo 6,8-kb; 4,3-kb ir 1,4-kb DNR fragmentus. 6,8-kb *Hind*III-*Xba*I DNR fragmentas, talpinantis surištus

su *lac* stimulatoriumi *phz* genus (Fig. 6), buvo atskirtas nuo kitų fragmentų preparatine gelio elektroforeze, išgrynintas nuo agarozės/gelio ir defosforilizuojant užbaigtas Klenow DNR polimerazės I fragmentu. Šis fragmentas buvo susiūtas su pUC18Sfi klonavimo vektoriaus DNR (M. Herrero, V. de Lorenzo, K. Timis, Journal of Bacteriology 172:6557-6567 (1990)), kuri buvo iš anksto atkirsta EcoRI apribojimo endonukleaze ir dar apdorota Klenow DNR polimerazės I fragmentu. Susiuvimo mišinys po to buvo transformuotas į *E. coli* JM109, o transformantai su įterptomis *phz* vietomis (lokus) išrūšiuoti, pasinaudojus jų kolonijos balta spalva, ant LB agaro, praturtinto 40-čia µg/ml 5-brom-4-chlor-3-indolil-β-D-galaktopiranozido (X-gal) ir 80-čia µg/ml ampicilino. Plazmidės DNR pavyzdžiai, gauti iš transformantų baltųjų kolonijų, buvo tuo pat būdu toliau rūšiuojami pagal *phz* genus, kaip aprašyta aukščiau.

Hibridinė pUC18Sfi plazmidė, turinti *phz* vietas (lokus), buvo įsavinta su *Sfi*I apribojimo endonukleaze ir susiūta su *Sfi*I atverta pUTKm plazmide (žiūr. Herrero ir kt.). *E. coli* S17-1 (λpir) kompetentingos ląstelės toliau buvo transformuotos susiuvimo mišiniu, o transformantai atrinkti LB terpėje, praturtintoje kanamicinu ir ampicilinu (kiekvieno po 100 µg/ml). Kelių individualių kolonijų DNR plazmidė buvo gryninama ir rūšiuojama pagal *phz* genus, skaldant ląsteles ribojimo endonukleazėmis EcoRI ir HindIII. Gautos plazmidės pUTKm::phz genetinis žemėlapis pateiktas Fig. 6. *E. coli* S17-1 (λpir), talpinanti pUTKm::phz, buvo panaudota donoro vaidmenyje konjuguojant su *Pseudomonas* spp..

3 etapas. *E. coli* S17-1 (λpir) konjugacija su *Pseudomonas* spp. rūšimis.

Plazmidė pUTKm::phz buvo perkelta iš *E. coli* S17-1 (λpir) į *Pseudomonas fluorescens* Q8r1-96, panaudojus kryžminimo techniką, aprašytą Herrero ir kt.. Talpinantis pUTKm::phz donorinis kamienas *E. coli* S17-1 (λpir) buvo augintas per naktį kratant 37 °C temperatūroje 10-tyje ml skystos LB terpės, praturtintos ampicilinu ir kanamicinu (po 100 µg/ml). Rifampicinui atsparus recipientas - Q8r1-96 kamienas atskirai per naktį buvo augintas 10-yje ml skystos LB terpės (buljono) be antibiotikų. Donorinio ir

recipientinio kamienų kultūros buvo atskirai centrifuguotos (5 min., 6000 aps. per min. greičiu) ir ląstelės suspenduotos 1-ame ml šviežios LB terpės. Donorinio *E. coli* S17-1 (λ pir) kamieno ląstelių suspensijos (30 μ l) užlašinta ant 2 x 2 cm plotelio nitroceliuliozės membranos paviršiaus. Pastaroji membrana buvo patalpinta ant LB plokštelės paviršiaus. Po to virš donoro sluoksnio užlašina 20 μ l recipientinio kamieno ląstelių suspensijos. Gryna nitroceliuliozės membrana (0,45 mikronų) gali būti įgyta firmoje Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA. Plokštelės, padengtos membranomis, per naktį brandintos (inkubuotos) 27 °C temperatūroje. Po to ląstelės nuo membranų paviršiaus buvo suspenduotos 1-ame ml sterilaus vandens, nusodintos centrifugavimu (6000 aps./min, 5 min) ir po to suspenduotos 1-ame sterilaus vandens mililitre. Ląstelių suspensija 10-tį kartų praskiesta. Po to 100 μ l praskiestos suspensijos išsėta M9 minimalioje terpėje ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 21 g; KH_2PO_4 - 3 g; NaCl - 0,5 g; NH_4Cl - 1,0 g; 1M CaCl_2 - 0,1 ml; 1 M MgSO_4 - 2 ml; 20% gliukozė - 20 ml; H_2O - iki 1000 ml), praturtintoje 100 μ g/ml kanamicino ir inkubuota 3 dienas 27 °C temperatūroje. Užaugintos M9 kanamicino terpėje kelios recipientinio Q8r1-96 kamieno kolonijos užneštos ant King'o terpės B plokštelių (proteozės peptonas (Difco Laboratories, Detroit, MI) - 20 g; glicerolis - 10 ml; K_2HPO_4 - 1,5 g; MgSO_4 - 1,5 g; Bacto agar-agaras (Difco Laboratories, Detroit, MI) - 15 g, H_2O - iki 1000 ml), praturtintų 100 μ g/ml kanamicino. Tikrinant buvo patvirtintas fluorescuojančio pigmento produkavimas. Po šio išrūšiavimo klonai buvo auginami per naktį skystoje LB terpėje, paskui saugomi 50 % (tūris/tūris) glicerolyje - 80 °C temperatūroje tolesniems tyrimams.

6 pavyzdys.

Šis pavyzdys aprašo grybelių *in vitro* slopinimo bandymus.

Trijų šaknų patogenų (ligos sukėlėjų) augimo slopinimas recipientų Q8r1-96 kamienais(transformuotais), paruoštais pagal 5-ą pavyzdį, buvo vykdomas bulvių dekstrozės agare (PDA) Petri lėkštelėse. Naudotas būdas panašus į būdą, aprašytą Thomashow and Weller, Journal of Bacteriology 170: 3499-3508 (1988), išskyrus kelias, nurodytas žemiau, modifikacijas. Per naktį išlaikytos LB buljone bakterijų kamienų kultūros (3 μ l) paskleidžiamos

dviejų dėmelių (mikrolašelių) pavidalu priešingose PDA lėkštelės pusėse, 1 cm atstumu nuo lėkštelės šoninių kraštų. Lėkštelės centre patalpinamas patogeno kultūros, išaugintos PDA terpėje, 0,5 cm intarpas nuo vedančiojo krašto. Lėkštelės buvo inkubuojamos 28 °C temperatūroje ir po to skaičiuojama matuojant atstumą tarp bakterijų kolonijos ir grybienos (patogeno) sandūrų. Siekiant slopinti *Gaeumannomyces graminis* variantą *tritici*, išlaikytos buljone bakterinės kultūros paskleidžiamos, praėjus 24 valandoms po grybelinio patogeno intarpo patalpinimo. Slopinimas žymėtas 5 dienas po to, kai bakterijos buvo panaudotos.

Slopinant *Rhizoctonia solani* AG8, bakterijų buljono kultūros paskleidžiamos drauge su patogenu tuo pat metu. Slopinimas žymimas sekančias 5 dienas.

Slopinant *Pythium irregulare*, išlaikytos buljono terpėje bakterijų kultūros paskleidžiamos 48 valandas prieš grybelinio patogeno patalpinimą. Slopinimo mastas buvo žymimas 2 dienas (skaičiuojant nuo grybelio įvedimo).

Rezultatai pateikti 5-ojoje lentelėje, žemiau. Matome iš duomenų, kad transgeninių kamienų Z30-97, Z32-97, Z33-97 ir Z 34-97 slopinimo zonos žymiai platesnės, negu Q8r1-96.

5 LENTELE

Gaeumannomyces graminis var. *tritici*, *Rhizoctonia solani* AG8 ir *Pythium irregulare* *in vitro* slopinimas motininio kamieniu *Pseudomonas fluorescens* Q8r1-96 ir transgeniniais dariniais Z30-97, Z32-97, Z33-97 ir Z34-97 (bulvių dekstrozės agaro terpėje)

Slopinimo zonos mastas

Kamienas	Ggt	<i>Rhizoctonia</i>	<i>Pythium</i>
<i>P. fluorescens</i> Q8r1-96	0,50 D	0,17 B	0,47 B
Z30-97	1,55 B	0,55 A	0,80 A
Z32-97	1,13 C	0,53 A	0,70 A
Z33-97	1,66 AB	0,57 A	0,67 A
Z34-97	1,70 A	0,55 A	0,78 A

Ta pačia raide pažymėti vidurkiai menkai tesiskiria tarpusavyje ($P = 0,05$).

7 pavyzdys

Šis pavyzdys aprašo rūšiavimo šiltnamyje biologinius bandymus.

Medžiagos ir būdai.

Sėklų apdorojimas: pavasarinių kviečių (*Penawawa*) sėklos buvo padengtos skirtingomis bakterijų kamienų dozėmis. Kamienai auginti KMB terpėje (*Pseudomonas* sp.), NBY terpėje (*Bacillus* spp.) ir suspenduoti 0,5 % metilceliuliozėje. Bakterijų suspensija tolygiai paskleidžiama virš visos lėkštelės ir auginama 3 dienas 27 °C temperatūroje. Kiekvienam kamienui buvo paruošta po tris lėkšteles. Bakterijų ląstelės nuimamos, nugremžiant jas į centrifugos mėgintuvėlį ir du kartus jas praplaunant 40-čia ml sterilaus distiliuoto vandens. Toliau bakterijų ląstelės resuspenduotos 15-oje ml 0,5 %-tų metilceliuliozės, ir buvo sudarytos 10 kartų praskiestos su 0,5% metilceliulioze serijos. 25 g kviečių sėklų kruopščiai sumaišyta su 9 ml bakterijų suspensijos metilceliuliozės tirpale. Sėklos buvo džiovinamos per naktį. Realios bakterijų ląstelių dozės kiekvienai sėklai buvo įvertinamos suskaičiuojant atskiedus lėkštelėje.

Ligos slopinimo bandymai šiltnamyje

„Iššutimo“ (sukelto *Gaeumannomyces graminis* varianto *tritici* (Ggt), šaknų puvinio (sukelto *Rhizoctonia solani* AG8) ir *Pythium* šaknų puvinio (sukelto *Pythium* spp. komplekso, įskaitant *Pythium irregulare*) slopinantys transgeniniai kamienai buvo tirti, naudojant mėgintuvėlius (Ownley ir kt., *Phytopathology* 82: 178--184 (1992) bei Weller ir kt., *Plant Disease* 69:70-713 (1985)). Kiekvieno minėtų trijų patogenų inokuliatas buvo ruoštas 4 savaites auginant kiekvieną patogeną atskirai, autoklave apdorotuose pilnuose avižų grūduose (JAV patentas Nr. 4456684, nurodytas šiame aprašyme kaip analogas). Inokuliatas, prieš jį panaudojant, buvo laikomas šaldytuve. Analizuojamiems pavyzdžiams naudoti mėgintuvėliai buvo pagaminti iš plastiko, turėjo kūgio formą ir skylėtą dugną. Jų ilgis - 20, diametras - 2,5 cm. Mėgintuvėliai pakabinami, naudojant plastikinius dėklus. Kiekvienas mėgintuvėlis užkemšamas su medvilniniais kamuoliukais, o po to pusė mėgintuvėlio tūrio užpildoma smulkiu vermikulitu ir po to - apie 13 gramų paprasto dirvožemio su grunto avižų inokuliatu ar be jo. Tiriant

"iššutimą" ir *Rhizoctonia* šaknų puvinį, dirvožemis buvo sumaišomas su 1 % (masės/masė) šviežiai kultivuotų avižų grūdų inokuliatu (avižų grūdų dalelės 0,25-0,50 mm apimties). Tiriant *Pythium* sukeliama šaknų puvinį, dirvožemis buvo užkrečiamas avižų grūdais, kolonizuotais *Pythium irregulare*. Po to į kiekvieną *Pythium* užkrėsto dirvožemio mėgintuvėlį pridedama po 10 ml vandens, o į Ggt ir *Rhizoctonia solani* užkrėsto dirvožemio mėgintuvėlius - po 10 ml vandens su metalaksilu (Ridomil 0,075 g/l; Norvatis, Greensboro, NC). Sudrėkinus, mėgintuvėliai, talpinantys *Pythium irregulare* ar *Rhizoctonia solani* apkrėstą dirvožemį, 48 val. prieš sėjimą inkubuojami kambario temperatūroje. Mėgintuvėliai, talpinantys Ggt užkrėstą dirvą, užsėjami tuoj pat po sudrėkinimo. Kiekviename mėgintuvėlyje pasodinama po du kviečio grūdus, kurie užbarstomi plonu smulkaus vermikulito sluoksniu ir sudrėkinami 3 ml vandens (*Pythium* bandymams) ar metalaksilo tirpalu (Ggt, ir *Rhizoctonia* bandymams). Mėgintuvėlių angos padengiamos plastikų, siekiant išsaugoti reikalingą daiginimui drėgmę. Taip paruošti mėgintuvėliai 4-5 savaitėms patalpinami į šiltnamį (pastovi temperatūra - 16 °C, šviesos laikotarpis - kas 12 val.). Pasirodžius kviečių daigams (po 3-4 dienų) mėgintuvėliai pradedami drėkinti du kartus savaitėje 5 ml 1/3 stiprumo Hoagland'o tirpalu. Visi eksperimentai atlikti, naudojant Quincy plėšininį dirvožemį, gautą iš Quincy, WA, kartojant bandymą 5-6 kartus, 5 mėgintuvėliais kiekvienam pakartojimui. Visų trijų šaknų ligų aštrumas vertintas, nuplovus šaknis nuo įsišaknijimo terpės. *Rhizoctonia* šaknies puvinio aštrumas apibūdinamas infekuotų šaknų procentais. *Pythium* infekcijos aštrumas įvertintas daigų išaugimu iš jų aukščiau. "Iššutimo" aštrumas įvertintas naudojant Ownley ir kt. (1992) 0-8 skalę (žiūr. aukščiau).

Statistinė analizė. Rezultatai buvo analizuoti statistine kompiuterine programa SAS (SAS Institute, Cary, NC). Augimo greitis buvo analizuotas, atlikus arksinų duomenų apdorojimą. "Iššutimo" ligos įvertinimo duomenys analizuoti neparametrinės statistikos būdu. Apdorojimo vidurkiai atskirti Fisher'io saugomu mažiausio reikšmių skirtingumo metodu (LSD), esant $P = 0,05$.

Rezultatai pateikti 6-10 lentelėse, žemiau. Iš 6 lentelės matyti, kad transformuotų kamienų Z30-97, Z32-97 ir Z34-97 dozės 10^2 - 10^3 CFU vienai sėklai labiau sumažino *Rhizoctonia solani* AG8 infekuotų kviečio šaknų procentą, lyginant su panašia motininio Q8r1-96 kamieno doze, su *P. fluorescens* Z2-79 (fenazino-1-karboksirūgšties genų šaltiniu) ar dviem neapdorotais kontroliniais bandiniais. Motininis kamienas Q8r1-96 *Rhizoctonia* slopinimo mastu susilygina su Z30-97 ir Z32-97, tik tai kai naudojama didesnė Q8r1-96 dozė. 7-oji lentelė rodo, kad slopinančio *Pythium* kamieno Z34-97 dozė 10^2 CFU vienai sėklai tiek pat efektyvi, kaip ir motininio Q8r1-96 kamieno 10^3 CFU vienai sėklai dozė. Kamienas Z34-97 ypač efektyviai slopina *Gaeumannomyces graminis* variantą *tritici* - Ggt (žiūr. 8 lentelę). Pagal 5-8 lentelių (žemiau) duomenis, Z34-97 sugeba slopinti visas tris šaknų ligas.

6 LENTELE

Kviečio šaknų *Rhizoctonia* puvinio (*Rhizoctonia solani* AG8) slopinimas, apdorojant sėklas gamtiniu būdu ir naudojant transgeninius biologinės kovos agentus

Apdorojimo priemonė	CFU vienai sėklai ¹⁾	Užkrėstos šaknys, % ²⁾
Metilceliuliozė ³⁾	0	60,7 a ⁴⁾
Neapdorota ³⁾	0	55,3 ab
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 2-79 ⁵⁾	10^6	48,9 b
<i>Pseudomonas fluorescens</i> Q8r1-96 ^{5,6)}	10^3	37,3 c
<i>Pseudomonas fluorescens</i> Q2-87 ⁵⁾	10^6	34,8 cd
<i>Pseudomonas fluorescens</i> Q8r1-96 ^{5,6)}	10^4	30,8 cde
<i>Bacillus</i> spp. L324-92 ⁵⁾	10^7	28,1 def
Transgeninis Z32-97	10^2	25,1 efg
Transgeninis Z30-97	10^2	25,1 efg
Transgeninis Z34-97	10^2	21,6 fg
Transgeninis Z34-97	10^3	18,8 g

¹⁾ sėklos buvo apdorotos bakterijomis, suspenduotomis 0,5 % metilceliuliozės tirpale, siekiant suteikti sėklai pažymėtas dozes.

²⁾ *Rhizoctonia* tipiškai pakenktų šaknų dalis, išreikšta procentais (praėjus 4 savaitėms nuo sėjos).

³⁾ Metilceliulioze apdorotos sėklos - apdorotas tik 0,5 % metilceliulioze. "Neapdorotos" - sėklos niekuo nebuvo paveiktos.

⁴⁾ Skaitinių reikšmių vidurkiai, pažymėti viena ir ta pačia raide, tarpusavyje žymiai nesiskiria, $P = 0,05$.

⁵⁾ Nepateikti išradime kamienai, skirti vien palyginimui.

⁶⁾ Motininis kamienas.

7 LENTELĖ

Kviečio šaknų *Pythium* puvinio (*Pythium irregulare*) slopinimas, apdorojant sėklas gamtiniu būdu ir naudojant transgeninius biologinės kovos agentus

Apdorojimo priemonė	CFU vienai sėklai ¹⁾	Sudygimas ²⁾
Metilceliuliozė ³⁾	0	50 d ⁴⁾
Neapdorota ³⁾	0	54 cd
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 2-79 ⁵⁾	10^6	63 cd
<i>Pseudomonas fluorescens</i> Q8r1-96 ^{5,6)}	10^3	92 ab
<i>Pseudomonas fluorescens</i> Q2-87 ⁵⁾	10^6	50 d
<i>Pseudomonas fluorescens</i> Q8r1-96 ^{5,6)}	10^4	71 bcd
<i>Bacillus</i> spp. L324-92 ⁵⁾	10^7	92 ab
Transgeninis Z32-97	10^2	67 cd
Transgeninis Z30-97	10^2	67 cd
Transgeninis Z34-97	10^2	96 a
Transgeninis Z34-97	10^3	79 abc

¹⁾ sėklos buvo apdorotos bakterijų suspensija 0,5 % metilceliuliozės tirpale, siekiant suteikti sėklai pažymėtas dozes.

²⁾ Pasirodžiusių daigų skaičius, praėjus 4 savaitėms po sėjos.

³⁾ Metilceliulioze apdorotos sėklos - apdorotos tik 0,5 % metilceliulioze. "Neapdorotos" - sėklos niekuo nebuvo paveiktos.

⁴⁾ Skaitinių reikšmių vidurkiai, pažymėti viena ir ta pačia raide, tarpusavyje žymiai nesiskiria, $P = 0,05$.

⁵⁾ Nepateikti išradime kamienai, skirti vien palyginimui.

⁶⁾ Motininis kamienas.

8 LENTELE

Kviečio šaknų "iššutimo" puvinio (*Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*) slopinimas, sėklas apdorojant gamtiniu būdu ir naudojant transgeninius biologinės kovos agentus

Apdorojimo priemonė	CFU vienai sėklai ¹⁾	Ligos aštrumo įvertinimas ²⁾
Metilceliuliozė ³⁾	0	4,2 a ⁴⁾
Neapdorota ³⁾	0	4,2 ab
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 2-79 ⁵⁾	10 ⁶	3,9 abc
<i>Pseudomonas fluorescens</i> Q8r1-96 ^{5,6)}	10 ³	2,9 e
<i>Pseudomonas fluorescens</i> Q2-87 ⁵⁾	10 ⁶	3,7 bcd
<i>Pseudomonas fluorescens</i> Q8r1-96 ^{5,6)}	10 ⁴	2,9 e
<i>Bacillus</i> spp. L324-92 ⁵⁾	10 ⁷	3,5 cd
Transgeninis Z32-97	10 ²	3,9 ab
Transgeninis Z30-97	10 ²	3,8 abc
Transgeninis Z34-97	10 ²	3,5 d
Transgeninis Z34-97	10 ³	3,4 d

¹⁾ Sėklos buvo apdorotos bakterijomis, suspenduotomis 0,5 % metilceliuliozės tirpale, siekiant suteikti sėklai nurodytas dozes.

²⁾ "Iššutimas" buvo vertintas skalėje nuo 0 iki 8 (Ownley ir kt., 1992), kurioje: 0 - jokia liga nestebima; 1 - <10 % šaknų srityje - juodi pakenkimai; 2-10-25 % šaknų srityje juosvi pakenkimai; 3->25 % šaknų srityje juosvi pakenkimai ir viena šaknis su stiebo pagrindo pakenkimu; 4 - daugiau negu vienos šaknies stiebo pagrindo pakenkimai; 5 - visos šaknys su stiebo pagrindo pakenkimu, mažiausiai vienas pakenkimas stiebo žemutinėje dalyje, tačiau nėra lapų chlorozės; 6-daug stiebo pakenkimų ir pirmojo tikrojo lapo chlorozė; 7-visi lapai chlorotiniai ir augalas labai sunykęs; 8-augalas žuvęs ar beveik žuvęs.

³⁾ Metilceliulioze apdorotos sėklos - apdorotos tik 0,5 % metilceliulioze. "Neapdorota" - sėklos niekuo nebuvo paveiktos.

⁴⁾ Skaitinių reikšmių vidurkiai, pažymėti viena ir ta pačia raide, tarpusavyje žymiai nesiskiria, P = 0,05.

⁵⁾ Nepateikti išradime kamienai, skirti vien palyginimui.

⁶⁾ Motininis kamienas.

8 pavyzdys

Šis pavyzdys aprašo kviečio šaknų kolonizavimą laukiniais ir transgeniniais kamienais.

Rizosferos kolonizavimas. Rizosferos (šaknies plaukelių) kolonizavimas transgeniniais kamienais charakterizuotas naudojant biologinius bandymus mėgintuvėliuose, kaip ir aukščiau aprašyti ligos

slopinimo bandymai. Kviečių sėklos, padengtos tiriamo kamieno bakterijų ląstelėmis, buvo pasėtos, esant dozei 10^3 CFU vienai sėklai. Skaitinė CFU ant sėklų reikšmė fiksuota po 66 valandų ir po vienos savaitės nuo sėjos. Tai buvo atliekama sėjant KMB terpėje praskiedimo būdu, praturtinus terpę rifampicino ir cikloheksimido priedais (kiekvieno po 100 µg/ml).

Rezultatai pateikti 9-oje lentelėje. Matome, kad išradime pateikti transgeniniai kamienai po 66 valandų ir po vienos savaitės nuo sėjos pasiekė tą patį populiacijos tankį, kaip ir motininis kamienas, praėjus tam pačiam laikui nuo sėjos.

9 LENTELĖ

Dienų skaičius po sėjos

Kamienas ^{a)}	Po 66 val. (CFUx10 ⁷ vienai sėklai)	Po 7 dienų (CFUx10 ⁷ vienam šaknų g)
<i>Pseudomonas fluorescens</i> Q8r1-96	1,4 A ^{b)}	26,8 A
Z32-97	1,1 A	11,7 A
Z33-97	1,1 A	16,2 A
Z34-97	1,1 A	16,0 A
Z30-97	1,5 A	13,2 A

^{a)} kviečių sėklos buvo padengtos 10^3 CFU vienai sėklai doze;

^{b)} skaitinių reikšmių vidurkiai (pagal Fisher'io mažiausio skirtumo testą LSD), pažymėti viena ir ta pačia raide, tarpusavyje skiriasi nežymiai, P = 0,05.

9 pavyzdys

Šis pavyzdys aprašo fiziologinius požymius ir substrato (maitinančios terpės) panaudojimo ypatumus.

Pavyzdinis *Pseudomonas fluorescens* kamienas Q8r1-96 buvo palygintas su *P. fluorescens* kamieniu Q2-87 (kuris taip pat pasižymi vietomis (lokus), koduojančiomis antibiotiko 2,4-diacetilflorogliucinolio susidarymą). Abiem kamienams būdingi tipiniai *P. fluorescens* fiziologiniai požymiai ir substrato panaudojimo ypatumai (žiūr. Bergey žinyną ir 10 lentelę, žemiau).

10 LENTELĖ

	Q8r1-96	Q2-87
Dažas pagal Gramą	-	-
Forma	lazdelė	lazdelė
Fluorescuojantis pigmentas	+	+
Oksidazė	+	+
Arginindihidrolazė	+	+
Gliukozės fermentacija	-	-
β -galaktozidazė	-	-
Želatinos hidrolizė	-	+
Denitrifikacija	+	+
Panaudojimas:		
D-gliukozės	+	+
L-arabinozės	+	+
Sacharozės	+	+
Propionato	+	+
Butirato	-	-
Gliucitolio	+	+
Adonitolio	-	-
D-manito	+	+
N-acetil-D-gliukozamino	+	+
Maltozės	-	-
D-gliukonato	+	+
Kaprato	+	+
Adipato	-	-
L-malato	+	+
Citrato	+	+
Fenilacetato	-	-

10 Pavyzdys

Šis pavyzdys aprašo RAPD analizę, skirtą transformuotų kamienų identifikavimui pagal charakteringą juostinį modelį.

RAPD analizė naudota (dalyvaujant pradmeniui M13) transformuotų kamienų ir motininio kamieno Q8r1-96 palyginimui. DNR amplifikuota 25- μ l reakcijos mišinyje. Mišinio sudėtis: 5 μ l, praskiestos šilumos paveiktų ląstelių suspensijos, 1 x GeneAmp PCR buferio (Perkin Elmer Corp., Norwalk, CT), po 200 μ M dATP, dTTP, dGTP ir dCTP (Perkin Elmer), 80 pM masalo M13 ir 2,0 U AmpliTag DNR polimerazės (Perkin Elmer). Kiekvieno mišinio paviršiuje paskleista po lašą mineralinės alyvos. Amplifikacijos atliktos

termostate (Perkin Elmer Thermal Cycler 480) ciklams realizuoti. PCR programa: pradinis denatūravimas (trunkantis 1 min. 30 sek.) 94 °C temperatūroje, lydimas besikartojančių 2-jų ciklų (režimai: 30 sek., 94 °C; 30 sek., 36 °C; 2 min., 72 °C), po to - besikartojančių 40-ties ciklų (režimai: 20 sek., 94 °C; 15 sek., 36 °C; 15 sek., 45 °C; 1 min.30 sek., 72 °C) ir pabaigoj - 1 ciklo (10 min., 72 °C). PCR produktų bandiniai (9µl.) atskiriami 1 x TBE buferiu (9 mM triborato, 2 mM EDTA; pH 8,3) įsodrintame 2,5 %-iniame agaro gelyje, 5 val., 75 V. Gelis buvo dažomas etido bromidu 60min., o PCR produktai vizualizuojami ultravioletiniu transiliuminatoriumi.

Transformuoti kamienai Z32-97, Z33-97, Z34-97 turi šias bendras su motininiu *P. fluorescens* kamienu Q8r1-96 RAPD juostas: 330±20bp, 600±50bp, 700±50bp, 800±50bp, 900±50bp ir 1100±60bp. Transformotas kamienas Z30-97 turi šias bendras su motininiu kamienu Q8r1-96 juostas: 600±50bp, 700±50bp, 800±50bp ir 900±50bp.

Išradimo apibrėžtis

1. Fluorescentinio *Pseudomonas* spp. bakterijų kamieno biologiškai gryna kultūra, turinti biosintezės vietą (lokus), koduojančią 2,4-diacetilflorogliucinolio susidarymą.
2. Biologiškai gryna kultūra pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad minėtos fluorescentinio *Pseudomonas* spp. bakterijos turi biosintezės vietą (lokus), koduojančią stabiliai įvestos į genomą fenazino-1-karboksirūgšties susidarymą.
3. Biologiškai gryna kultūra pagal 1 arba 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad minėtoms fluorescentinio *Pseudomonas* spp. bakterijoms būdingos juostos ties 600±50 bp, 700±50 bp, 800±50 bp, 900±50 bp, identifikuojamos atsitiktinės amplifikuotos polimorfinės DNR (RAPD) analizės metodu, naudojant M13 pradmenį.
4. Biologiškai gryna kultūra pagal 3 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad ji dar turi juostas ties 330±20 bp ir 1100±60 bp.
5. Biologiškai gryna kultūra pagal bet kurį iš 1-4 punktų, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad minėtas kamienas sugeba slopinti laukuose auginamų smulkiagrūdžių kultūrų ar velėnos žolių ligas, sukeltas grybelio *Gaeumannomyces graminis* (Gg), kai minėtas gebėjimas, pageidautina, yra ekvivalentiškas biologinės kovos lygiui, gautam, kai smulkiagrūdės kultūros auginamos "iššutimo" slopinimo būsenoje esančioje dirvoje.
6. Biologiškai gryna kultūra pagal 1 arba 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad minėtas kamienas sugeba slopinti augalų šaknų ligas, sukeltas *Rhizoctonia* grybelio.
7. Biologiškai gryna kultūra pagal 1 arba 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad minėtas kamienas sugeba slopinti augalų šaknų ligas, sukeltas *Gaeumannomyces graminis* (Gg) ar *Pythium* grybelių.
8. Biologiškai gryna kultūra pagal bet kurį iš 1 - 4 punktų, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad minėtas kamienas dar sugeba kolonizuoti šaknis tokiu populiacijos tankiu, kurio vidurkis yra mažiausiai 10⁵ koloniją formuojančių vienetų (CFU) vienam šaknų gramui, įskaitant susijusį rizosferos dirvožemį, bent 5-is vienas po kito einančius auginimo ciklus.

9. Biologiškai gryna kultūra pagal 8 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad kamieno minėtas šaknų kolonizavimo sugebėjimas nepriklauso nuo dirvos tipo.
10. Biologiškai gryna kultūra pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad minėtas fluorescentinis *Pseudomonas* kamienas turi identifikuojančias *P. fluorescens* charakteristikas NRRL B-21806, NRRL B-21807, NRRL B-21808, NRRL B-21905, NRRL B-21906, NRRL B-21907 ar NRRL B-21908 (deponuota Agricultural Research Culture Collection (NRRL), 1815 Norht University Street, Peoria, Illinois 61604).
11. Biologiškai gryna kultūra pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad joje dar yra agrokultūrinis nešiklis.
12. Bakterijų rūšiavimo būdas, skirtas atrankai kamienų, turinčių savybes pagal 1 ar 3 punktus, , b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jis apima šiuos etapus:
 - (1) smulkiagrūdžių kultūrų ar velėnos žolių kultivavimą vienas po kito einančiais ciklais natūraliai "iššutimą" slopinančiame dirvožemyje, siekiant jį praturtinti Phl gaminančiais fluorescentiniais *Pseudomonas* spp., kuris apima šias stadijas:
 - (a) smulkiagrūdės kultūros ar velėnos žolių sėklų auginimą "iššutimą" slopinančiame (TAD) dirvožemyje mažiausiai 3 savaites šiltnamyje, sąlygomis, užtikrinančiomis minėtų smulkiagrūdžių kultūrų arba velėnos žolių daigų pasirodymą;
 - (b) minėto auginimo dirvožemio bei minėtos smulkiagrūdės kultūros arba velėnos žolių daigų, augintų minėtame dirvožemyje, šaknų surinkimą bei jų sumaišymą;
 - (c) stadijų (a) ir (b) pakartojimą bent 4-is vienas po kito einančius pilnus ciklus, kur (b) mišinį naudoja sėklų daiginimui po to einančiame cikle;
 - (2) potencialiai slopinančių fluorescentinių *Pseudomonas* bakterijų kamienų išskyrimą iš smulkiagrūdės kultūros ar velėnos žolių šaknų bei susijusios rizosferos dirvožemio, paeiliui kultivuotų 1-ajame etape, auginant minėtus kamienus *Pseudomonas* atrankai tinkamoje terpėje tiek laiko ir tokiomis

sąlygomis, kurios yra veiksmingos *Pseudomonadų* auginimui bei kamienų auginamų terpėje, atrankai;

- (3) atskirtų (2)-ame etape kamienų rūšiavimą, siekiant atrinkti kamieną, pasižymintį biosintezės vietomis (lokus), koduojančiomis 2,4-diacetilflorogliucinolio (Phl) susidarymą, kryžminant minėtų kamienų koloniją su 2,4-diacetilflorogliucinoliui specifiniu zonu ir atrenkant kamienus, kurie kryžminasi su minėtu zonu;
 - (4) atsitiktinės amplifikuotos polimorfinės DNR (RAPD) analizės atlikimą naudojant M13 pradmenį ir atrinkimą kamienų, kaip Gg slopinančių kamienų, kurie turi juostas ties 600 ± 50 bp, 700 ± 50 bp, 800 ± 50 bp ir 900 ± 50 bp.
13. Būdas pagal 12 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jame dar yra etapas, įterptas tarp (3) ir (4) etapų, į kurį įeina Phl gaminančių kamienų patvirtinimas naudojant pradmenis, kurie amplifikuoja sekas su Phl biosintezės vietomis (lokus), bei teigiamą PCR reakciją rodančių kamienų atrinkimas.
 14. Kovos su šaknų liga, sukelta *Rhizoctonia*, *Pythium* ar *Gaeumannomyces graminis* (Gg) grybelių jautriuose šiai šaknų ligai augaluose, būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jis apima minėto augalo auginimą, esant veiksmingam biologinei kovai kiekiui fluorescentinio *Pseudomonas* kultūros kamieno pagal bet kurį iš 1-4 punktų.
 15. Būdas pagal 14 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėtą augalą parenka iš smulkiagrūdžių kultūrų, velėnos žolių arba maistinių, pluoštinių bei dekoratyvinių augalų grupės.
 16. Būdas pagal 14 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad dirvą ar vagas, skirtas smulkiagrūdėms kultūroms ar velėnos žolėms auginti, prieš minėtą auginimą apdoroja veiksmingu biologinei kovai su Gg minėto kamieno kiekiu.
 17. Būdas pagal 14 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėtą velėnos žolę apdoroja bakterinio apdorojimo tirpalu, kuris turi veiksmingą biologinei kovai su Gg minėto kamieno kieki ir kamienui tinkamą skystą nešiklį.

18. Būdas pagal 14 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad naudojamas minėtas *Pseudomonas* kamienas yra *P. fluorescens* kamienas, turintis identifikuojančias charakteristikas NRRL B-21806, NRRL B-21807, NRRL B-21808, NRRL B-21905, NRRL B-21906, NRRL B-21907 ar NRRL B-21908 (deponuota Agricultural Research Culture Collection (NRRL), 1815 North University Street, Peoria, Illinois, 61604).
19. Būdas pagal 15 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėtų augalų sėklas apdoroja taip, kad koncentracija būtų apytikriai nuo 10^2 iki 10^6 CFU vienai sėklai.
20. Būdas pagal 17 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėto apdorojimo tirpalo koncentracija yra nuo 10^8 iki 10^{10} CFU vienam tirpalo mililitrui.
21. Būdas pagal 14 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėto augalo šaknis panardina į bakterinę suspensiją, kurios koncentracija yra 10^2 - 10^5 CFU vienam suspensijos mililitrui.
22. Agrokultūrinė kompozicija, skirta kovai su šaknų liga, sukelta *Rhizoctonia*, *Pythium* ar *Gaeumannomyces graminis* grybelio(Gg) jautriuose šiai šaknų ligai augaluose, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad jos sudėtyje yra tinkamas nešiklis ir veiksmingas biologinei kovai kiekis biologiškai grynos fluorescentinio *Pseudomonas* kamieno kultūros pagal vieną iš 1-4 punktų.
23. Agrokultūrinė kompozicija pagal 22 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad, joje nešiklis yra parinktas iš grupės, sudarytos iš vandens, buferio, metilceliuliozės, durpių ir vermikulito.
24. Agrokultūrinė kompozicija pagal 22 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad, joje minėto kamieno koncentracija yra 10^8 - 10^{10} CFU vienam skysto nešiklio mililitrui arba 10^7 - 10^9 CFU vienam kieto nešiklio gramui.
25. Agrokultūrinė kompozicija pagal 22 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad joje minėtas *Pseudomonas* kamienas yra *P. fluorescens* kamienas, turintis identifikuojančias charakteristikas NRRL B-21806, NRRL B-21807, NRRL B-21808, NRRL B-21905, NRRL B-21906, NRRL B-21907 ar NRRL B-21908 (deponuota Agricultural Research Culture Collection (NRRL), 1815 North University Street, Peoria, Illinois, 61604).

26. Smulkiagrūdės kultūros sėkla, **b e s i s k i r i a n t i** tuo, kad jai yra panaudotas veiksmingas biologinei kovai biologiškai grynos kultūros pagal vieną iš 1-3 punktų kiekis.
27. Sėkla pagal 26 punktą, **b e s i s k i r i a n t i** tuo, kad jos koncentracija yra 10^2 - 10^5 CFU vienai sėklai.
28. Transgeninio fluorescentinio *Pseudomonas* bakterijų kamieno, turinčio savybes pagal 1 ir 2 punktus, gavimo būdas, **b e s i s k i r i a n t i s** tuo, kad jis apima:
- (1) genų, turinčių fenazino-1-karboksirūgšties vietas (lokus), koduojančias fenazino-1-karboksirūgšties susidarymą, klonavimą, kontroliuojant promotoriui;
 - (2) kilnojamos klonuotos fenazino-1-karboksirūgšties vietas (lokus) kopijos konstravimą perdavimo sistemoje, gebančioje tarpininkauti minėtos fenazino-1-karboksirūgšties vietas (lokus) stabiliam įterpimui recipientiniame fluorescentiniame *Pseudomonas* kamienne bei minėtos perdavimo sistemos įdėjimą į donorinį bakterinį kamieną; ir
 - (3) bakterijų ląstelėms konjuguojant, perdavimo sistemos stabilų įterpimą iš minėto donorinio bakterinio kamieno į recipientinį motininį *Pseudomonas* kamieną, turintį biosintezės vietą (lokus), koduojantį 2,4-diacetilflorogliucinolio susidarymą ir turintį juostas ties 600 ± 50 bp, 700 ± 50 bp, 800 ± 50 bp ir 900 ± 50 bp, identifikuojamas atsitiktinės amplifikuotos polimorfinės DNR analize (RAPD), naudojant M13 pradmenį, siekiant tokiu būdu gauti transformuotą fluorescentinį *Pseudomonas* spp. bakterijų kamieną, turintį biosintezės vietą (lokus), koduojančią stabiliai įtvirtintos jo genome fenazino-1-karboksirūgšties susidarymą, ir turintį biosintezės vietą (lokus), koduojančią 2,4-diacetilflorogliucinolio susidarymą.

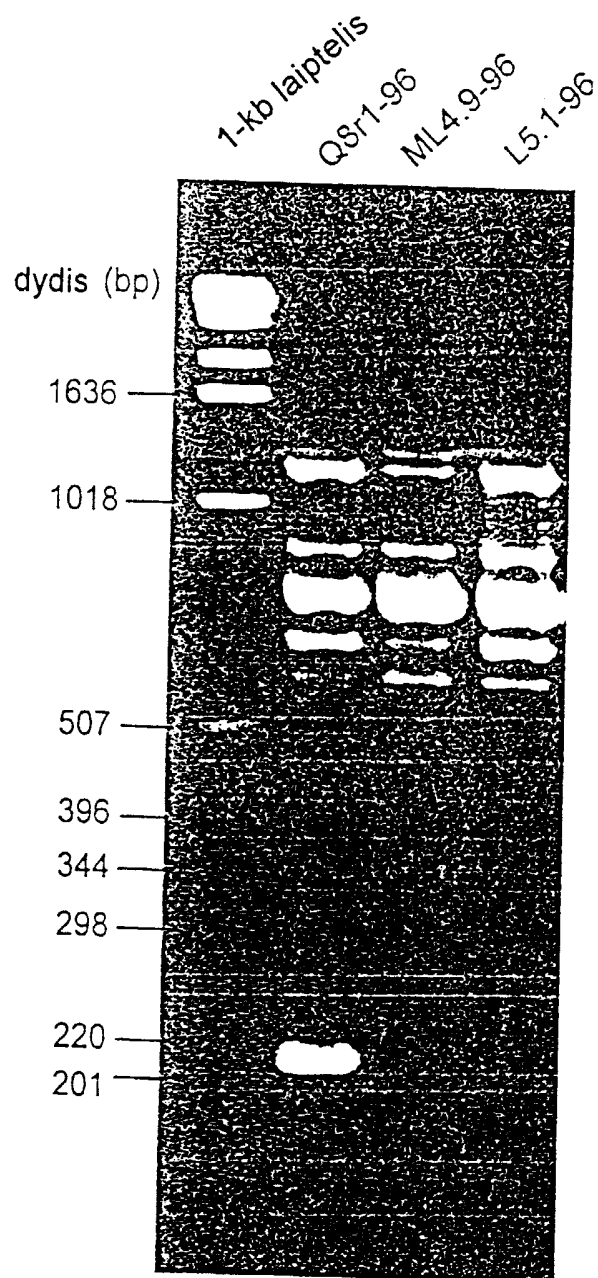


FIG. 1

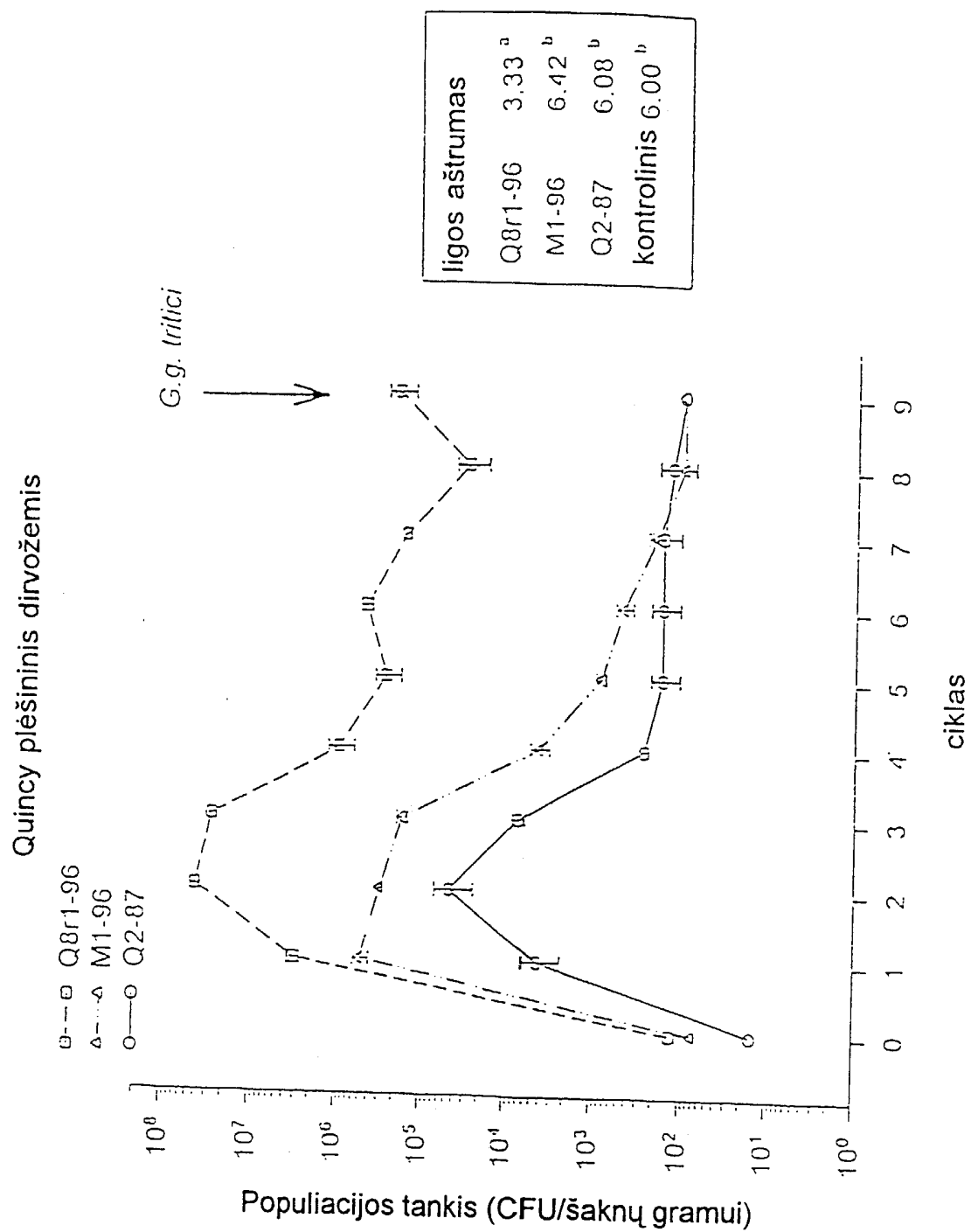


FIG. 2

Lind plėšininis dirvožemis

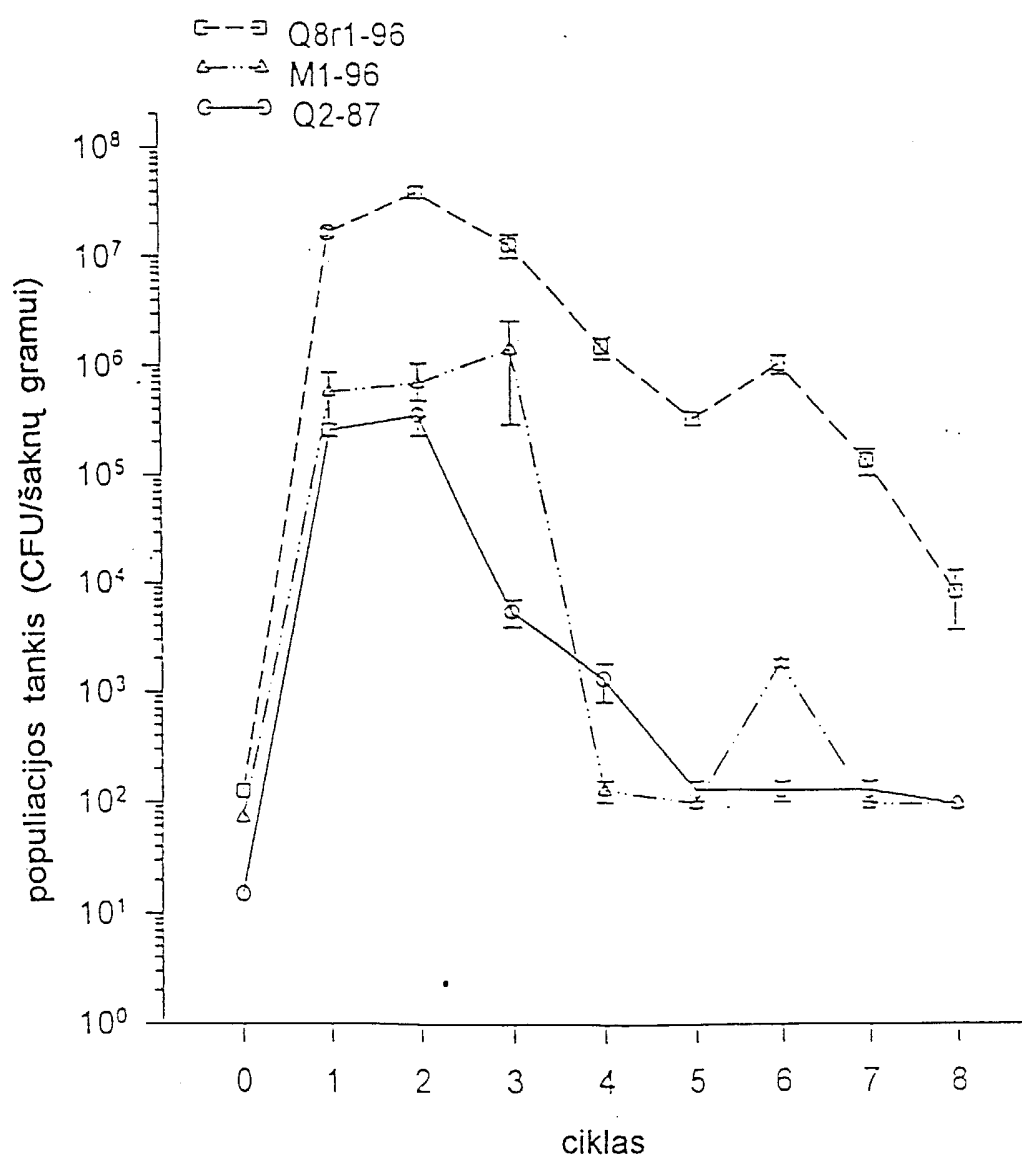


FIG. 3

Moses Lake plėšininis dirvožemis

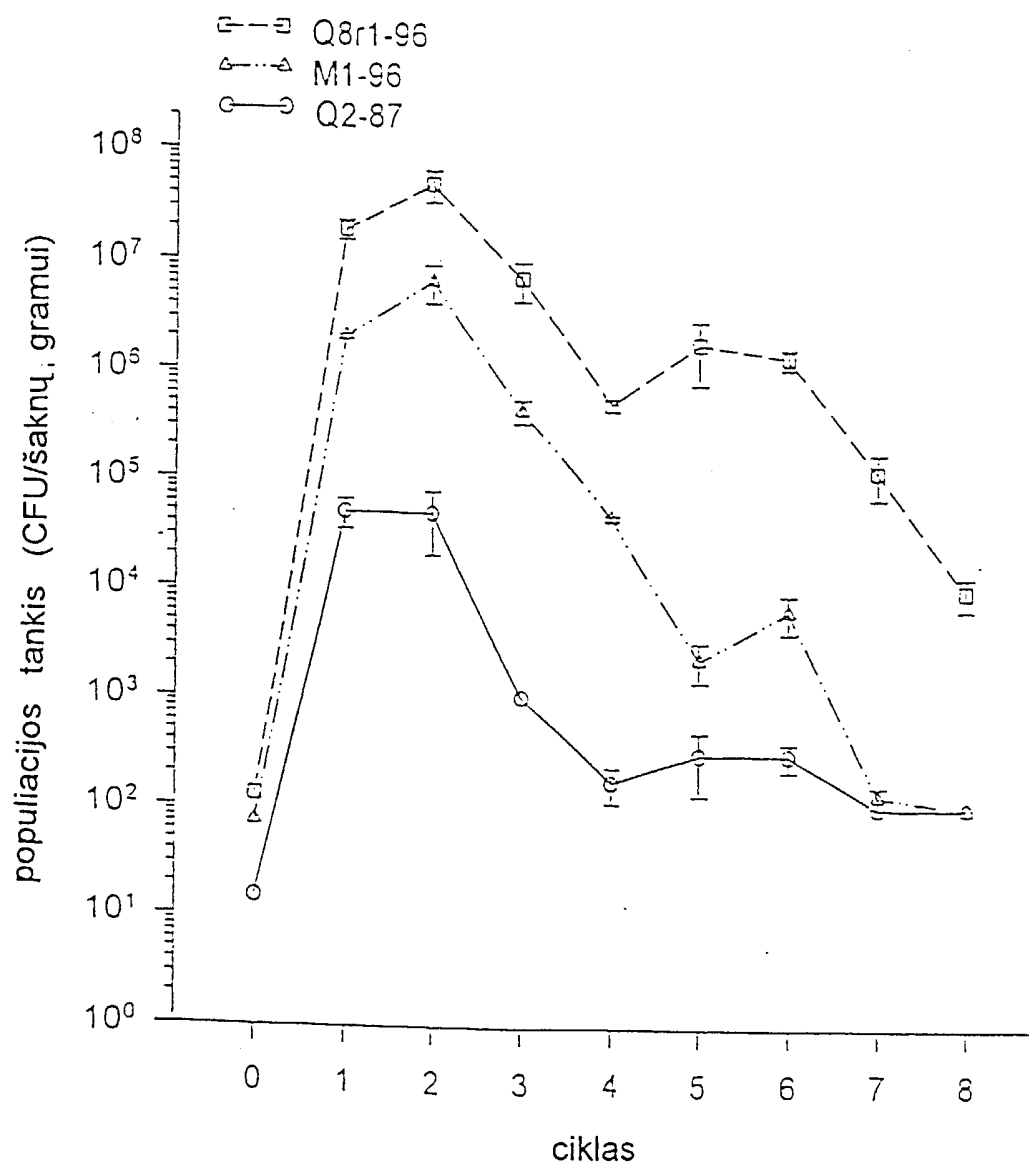


FIG. 4

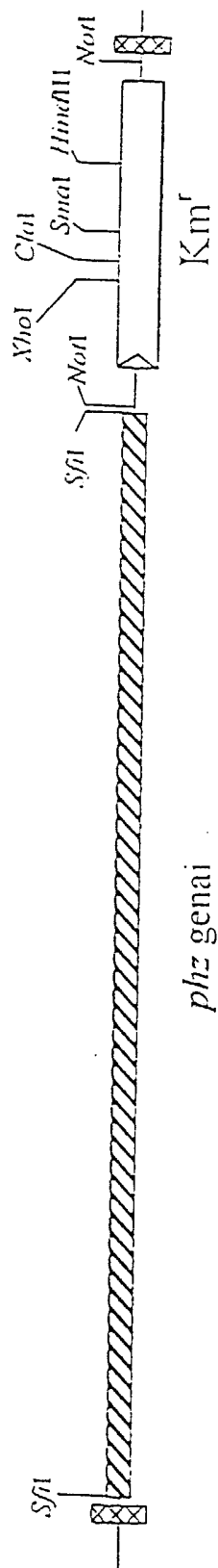


FIG. 7

Sekų sąrašas

(1) BENDROJI INFORMACIJA:

- (i) Pareiškėjai: JAV, atstovaujama žemės ūkio Sekretoriaus ir Vašingtono valstijos universiteto tyrimų fondo
- (ii) IŠRADIMO PAVADINIMAS: Biologinės medžiagos kovai su šaknų ligomis
- (iii) SEKŲ SKAIČIUS: 10
- (iv) ADRESAS KORESPONDENCIJAI:
 - (A) ADRESATAS: Margaret A. Connor, USDA-ARS
 - (B) GATVĖ: 800 Buchanan Street
 - (C) MIESTAS: Albany
 - (D) VALSTIJA: CA
 - (E) ŠALIS: JAV
 - (F) KODAS ZIP: 94710
- (i) KOMPIUTERINIO NUSKAITYMO FORMOS:
 - (A) LAIKMENOS TIPAS: lankstus diskelis
 - (B) KOMPIUTERIS: IBM PC suderinamas
 - (C) OPERACINĖ SISTEMA: PC-DOS/MS-DOS
 - (D) PROGRAMA: Patent In Release #1,0; variantas # 1,30
- (i) ŠIOS PARAIŠKOS DUOMENYS:
 - (A) PARAIŠKOS NUMERIS: US 08/974, 938 ir 08/994, 035
 - (B) PADAVIMO DATA: 1997 11 20 ir 1997 12 18
 - (C) KLASIFIKACIJA:
- (viii) PATIKĖTINIS/AGENTAS:
 - (A) PAVARDĖ, VARDAS: Connor, Margaret A.
 - (B) REGISTRACIJOS NUMERIS: 30043
 - (C) NUORODOS NUMERIS: 0027. 97
- (ix) TELERYŠIAI:
 - (A) TELEFONAS: (510) 559-6067
 - (B) TELEFAKSAS: (510) 559-5736

(1) INFORMACIJA APIE SEKĄ ID No: 1:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:

- (A) ILGIS: 10 bazinių porų
- (B) TIPAS: nukleino rūgštis
- (C) GRANDINĖ: vienguba
- (D) TOPOLOGIJA: linijinė

(i) MOLEKULĖS TIPAS: kita nukleino rūgštis

- (A) APRAŠYMAS: /apr = "M13 pradmuo"

(i) HIPOTETINĖ: ne

(ii) NEJAUTRI: ne

(ix) POŽYMIŠ:

- (A) PAVADINIMAS/RAKTAS: įvair. požymiai
- (B) PADĖTIS: 1 ... 10

(x) INFORMACIJA APIE PUBLIKACIJĄ:

- (A) AUTORIAI: Keel, C

Weller, D M

Natsch, A

DeFago, G

Cook, R J

Tomashow, L S

- (B) PAVADINIMAS: 2,4-diacetilflorogliucinolio biosintezės vietų (lokus) išsaugojimas tarp fluorescentinių *Pseudomonas* kamienų, iš įvairių geografinių vietovių

- (C) ŽURNALAS: Appl. Environ. Microbiol.

- (D) TOMAS: 62

- (E) LEIDINYS: 2

- (F) PUSLAPIAI: 552-563

- (G) DATA: 1996

- (K) SUSIJUSI KITA INFORMACIJA: SEQ ID No: 1: nuo 1 iki 10

- (xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID No: 1: GGTGGTCAAG

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ: SEQ ID No: 2:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:

- (A) ILGIS: 20 bazių porų
- (B) TIPAS: nukleino rūgštis
- (C) GRANDINĖ: vienguba
- (D) TOPOLOGIJA: linijinė

(ii) MOLEKULĖS TIPAS: kita nukleino rūgštis

- (A) APRAŠYMAS: /desc. = "Phl2a"

(iii) HIPOTETINĖ: ne

(iv) NEJAUTRI: ne

(x) INFORMACIJA APIE PUBLIKACIJĄ:

- (A) AUTORIAI: Raajmakers, Jos M

Weller, David M

Tomashow, Linda S

- (B) PAVADINIMAS: Antibiotiką gaminančių *Pseudomonas* spp. pasikartojimas natūralioje aplinkoje

- (C) ŽURNALAS: Appl. Environ. Microbiol.

- (D) TOMAS: 63

- (E) LEIDINYS: 3

- (F) PUSLAPIAI: 881-887

- (G) DATA: 1997 m. kovas

- (K) SUSIJUSI KITA INFORMACIJA SEQ ID No: nuo 1 iki 10

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID No: 2:

GAGGACGTCG AAGACCACCA

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ: SEQ ID No: 3:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:

- (A) ILGIS: 20 bazių porų
- (B) TIPAS: nukleino rūgštis
- (C) GRANDINĖ: vienguba
- (D) TOPOLOGIJA: linijinė

(ii) MOLEKULĖS TIPAS: kita nukleino rūgštis

- (A) APRAŠYMAS: /desc. = "Phl2I"

(iii) HIPOTETINĖ: ne

- (iv) NEJAUTRI: ne
- (x) INFORMACIJA APIE PUBLIKACIJĄ:
 - (A) AUTORIAI: Raajimakers, Jos M
Weller, David M
Tomashow, Linda S
 - (B) PAVADINIMAS: Antibiotiką produkuojančių *Pseudomonas* spp.
pasikartojimas natūralioje aplinkoje
 - (C) ŽURNALAS: Appl. Environ. Microbiol.
 - (D) TOMAS: 63
 - (E) LEIDINYS: 3
 - (F) PUSLAPIAI: 881-887
 - (G) DATA: 1997 m. kovas
- (xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID No: 3:
ACC GCAGCAT CGTGTATGAG

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ: SEQ ID No: 4:

- (i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:
 - (A) ILGIS: 7198 bazių porų
 - (B) TIPAS: nukleino rūgštis
 - (C) GRANDINĖ: vienguba
 - (D) TOPOLOGIJA: linijinė
- (ii) MOLEKULĖS TIPAS: DNR (genominė)
- (iii) HIPOTETINĖ: ne
- (iv) NEJAUTRI: ne
- (vi) KILMĖS ŠALTINIS:
 - (A) ORGANIZMAS: *Pseudomonas fluorescens*
- (ix) POŽYMIŠ:
 - (A) PAVADINIMAS/RAKTAS: CDS
 - (B) PADĖTIS: rinkinys (1810..2859)
 - (D) KITA INFORMACIJA: /produktas = "PhID"

(x) INFORMACIJA APIE PUBLIKACIJĄ:

(A) AUTORIAI: Tomashow, L S

Bangeris, M G

(B) PAVADINIMAS: U41818

(xi) SEKOS APRAŠYMAS SEQ:ID No: 4:

GTGAGCCAG TAAAGGCAGA CAATGCATGG CTCGCTGCTG ATGCTTTGGG CGTGSTAAGG	60
AATCTGCAAC GGGTCCCCGT CAGTCTTGAG CAATCGACCG TTGCCTTTGT AATACCAGGC	120
CTGTTCCGTC TTGGCGGTGC ACASTGTGAT CTCGCTGACC TGAACAGCCA AGTTGTGATC	180
GGGTTTGAGC GSCGGCCTGT ATTTCCGCGC TGTGGGCGAG AGCGGATAGG GCGTCGATGG	240
GAGGCTCCTG AGSTAGGATT CCCAATCCAT GTTCAGGCGA GCGCAGTGGC TCAGGGCTTC	300
ATAAAGGTTT CCCTGCGGTG ATCTACTTTC CAGGCTTTGC CCGGATTTGA AGTCGAATAC	360
ACCCAGCCCG CGCAGCGGCT GCGGCGASTC CAATAGCATT ACCTAATGCG TCATCACTTA	420
TCCTCCAGCG TCAAGCGAGC GGGCAGGGGG CCGTAGTCCG CACGGTCATT GAAPACAGGG	480
CTGGCTTCCT TGAGCCGCAG GGACAGCAAC CCGCCCATCA AACTACCAGC CAGTGCCAGA	540
AACAGAATGG CGGTAAGCCC CCAGTTCACG GCGATGTACC CGGCGACCAC GGGCGCAACG	600
CCACCGCCCA GGATTTCTCC GCAACCCACC ACCAGGCCCG TAGCGGTGGC CAGTAACTG	660
GGTGGCACTG ATTCGCTGGT CAGTGGGCGG ACGGTGATGC AGATCAGGCT GAAATTGATG	720
AAAGATAAAA AGAACAGCTG GAGGAACAGT AGCCACGGTA ACGGCGGGGA AATGATGAGC	780
AAGCCGACCA GTAGTGTGCT GATCAGGAG CAGATGGAAA CGACAGGCTT GCGGCCCCAGT	840
TGGTCAGACA AACCGGGAAT GACGAGCTGG CCGAAAAAAC CACCCAGGCC GATCGCGGAG	900
ATGATCATGG CCATGGAGAA ATTGCTCAGS TGCAAGACGT CTGTCAGGTA GCTGGGGAGC	960
AGGGCGCACA GGACGAATTG GCACGTCAGT ATGCATAGCA TCAAGGCAAT GTTGAGGCGC	1020
ACGTTGCCGC TGGACAGGGC TGTTCCCCAT TGGCTGCCGG AGGGTTCTAC GAGCGGCCTT	1080
GGATGGGGCG CCTGGCTCGG TTGGTAGGTT CGATACAGAT ACCAGGCCAC CAGCAGGCCC	1140
GGCAACGAGA TGATGGCGAA CACGGCGCGC CACGATCCGA ACATTTCAAA CAATACGCCC	1200
GCCAGCAGCG GCCCCAGSCA CAGGCCGATG ATGGGAAACA GTGCCTGCTG GATGCCCAGG	1260
TTGAGCCCGC GTCGGCACGG CTGCGAAACT TCATCGGTGA CAATGATGCT GACCGGGGTG	1320
AAGGCGCCTT CGCAGATCCC CATCAAGGCG CGCAGSAGCA CCAGGCCCAT AAGGCTTGAG	1380
ATCAACGCAG ATGCGCCGGC CAGGAGCGAT ACCAAGGTAA TCGAAAGCAC CAGCAGTTGC	1440

TTGGTGCCCA ATCGCCTGAT AGCAACGCCC ATGAAGAGGG CCGAGCCTCC CCAGGCCAAT	1500
GCCAGGATCG CCGATAACAG GCCCAGGTCC TGATAGTCCA GGGCCAGGTC ATGCATGATC	1560
ACCGGGAACA ACGGCATGAT AATGAATCGA TCAAGTCCTA CCAGCCCGAA GCTCAGCGAC	1520
AAAAGAACGA CCATGCGTCT TTCGTAGCCA CCCCAGGTC GAGTGGCAAG ATACGTACTC	1580
TCCATGTTCT TCCCCTTCTT TCCTTAGCCC TTTCGACGTT TTCTCGAAAC GGGTGAACGC	1740
TTGTGTTTGA TACTCCTGTA GCCAGGGGCG GATCCGCCCC CGGCTTGSTG CGTGCAATGT	1800
GTTGGTCTGT CAGGCCACCC ACTTGCCAC GGCATTTC A GCTGTGAAGC CAGGGCCGAA	1860
GGCTGCCAGC ATGCCGGTCG CTCATTGGC CGGCCCGCTG TCGAACTGCC GCTTGAGGAC	1920
GTCGAAGACC ACCACGCTGG CAATATTGCC GGCTCGCTC AAGCTGTCCG GAGACTGGC	1980
GACCCTGCCA GGTTCAGAT CGAGCTGCAG CACCAGCTCA TCAAGRAATT TTCTGCCACC	2040
GGTGTGGAAG ATGAAAAAGT CATTTTGAGC GCAATGTTGG TTGAAGGTCT CGAAGTTCAA	2100
TTCTCCATC ATCGGGGCCA CGTCTTTAAT GGAGTTCATG ACGGCTTTGT CCAGGGTGAA	2160
GTGAAAGCCG CTGTCTTGA CGTCATATT AATGTAGTGC TCGCTGTCAG GCAGGAATA	2220
AGAGCCGGTT TTGGCGATCT TGAATCCCGG CGCCTTATCG TCGGCGCGCA TTACGCAGGC	2280
CGAGACGGCA TCGCCGAACA GCGCTGCCGA TATGAACGCG TGCAACTTGG TGTCCTGTGG	2340
TTGATAGCAG AGTGACGAGA ACTCCAGCGA GACAATAAGG GCCTGGTTGT CTGGAGACAG	2400
GCTGGCAAAG TCCTTGGCTC GATTATCGC CGCGGCGCCT GCCACGCATC CCAATTGAGC	2460
GATCGGCAAT TGTACGGTCG ACGTTCGCG TCCCAAGTCA TTGATCAGGT GGGCTGTCAG	2520
CGATGGCATC ATGAACCCGG TGCAAGAGGT AACGGCGACC ATCCGGATGT CGTCCGTGGT	2580
CAAGCCCGCG TTTTCAATGG CCGGCGCGC GGCGATTGAA GACATGCGGC GAGCCTCTCG	2640
CTCATACAG ATGCTGCGGT GGGTAAAGCC GGTATGCACC GCAAGTTCAT CGATGGGCAA	2700
GACCAGATAC CGTTCATTGA CTTGGGTGTT TTGAATCATC CGTTTAGCCA ATGCCATGCG	2760
CGGATGATCG TCATGCAACT GTTCCAAGTG ATCGATCATC TGTTGTTGGG TAATTTTGTA	2820
ATGCGGGAAA AGCAAGCTGG GTTTGCAAAG AGTAGACATG ACAAGTCCTC GGCTGAAAGC	2880
CAATAAAGAG TAGAAAACCA CGTTTAAGGC AATGGCAAAG CAGGACTCTG AAAAGCAGAA	2940
TCAAACAACG GGCCGGTTGG CCGGAAATAG CGACTGTTGT TATGGATGGC GCGGTATGCA	3000
GCAGTAACTT GTTTGTTATT TCGCCAATAC GAATTTATAA GCGTATTGCC ACGCCAGGTT	3060

GCTTTCCCGA ACGTGCTTGC GAATAACCAT TCGCACTGGT GCTCCAGTCA CGACTTGCCG	3120
GGGATCGACG ACATCGACGA TTTCGGAGGC GATCACCAG CCATCGTCCA GGCGCACCAT	3180
TGCCATGAAG CGCGGGACGG TTTCGCCATA TCCCATGGCC GCGAGAATGG GGTTCAGC	3240
ATGGGCGCTG ACCTGGATCG TGCCGGTGCG TGCGCAGCGA TACGTTCCA CGTTCAATGA	3300
GTTGCATGCG CCGCAGACGG TGCGCCGTGG GAAGAAGATT TCTTCGCAAT CCTGGCAGCG	3360
GCTGCCTTCG AGACGATATT TTCCGCCATG TTCGCGCCAT TCGCGCAACA TGCTGGCGGT	3420
GGTCATGCGG TGTATTTGTT CTGGGTAAAG GGACATGGTC GGCTCCTTAA TCGTTGGAAA	3480
GCACAATGAC GCTGTTATGC GCGGCGTAAC CGCCCAAGTT CTGGAGACG CCAATGCGAG	3540
CGTCCTTGAC TTGGTTGTTG GACTCGCCGC GAAGTTGTCT GAACAGCTCG GTAATGTGCA	3600
GGATGCCGTC GCAACCAGAG GCGTGGCCGC GGCCAATATT GCGCCATCG GTGTTTAATG	3660
GCAGTTGCCC GTCGAGGGCT ATGCCGCCCTT CCAATACAAA GTCCCTGCC TGGCCTGGAC	3720
CACATACGCC CATGGATTCC ATCTGAATCA ATCCGGCACC CAGCAAGTCG TAGACTTGGG	3780
CCACATCGAT ATCCTTGGCG GTGATGCCCG CTTTTTTGTA GGCGATTTCG GCGCAAGCAA	3840
TGGAGTTGGC GGAAACCGCC ATGCCGACGT CTTTTGGCAG GCCTGGATAT TTCAGGCTCG	3900
GTTTGTGATA GCGCGTCCCG AAATAATGGG ATACGCCGGT ATAGGCACAA CCACGGACGA	3960
ATACCGGTTG GGTGCTGTAG CCGTGCGCCA GGTGTTCCGC GACCAGGATG GCGCAACCGC	4020
TGGCTTCACC CCAGGCCAGC ATCGAGCCAC ATGCTTCGCT GTTCTTGAGG GTTCAAGGG	4080
ATGGCACCAG CACGCCATAG CCGGTTGCCG TGGGCGTGT GTGCGCATAG ATGCGCATTT	4140
GCCGACCAAA CGTTGCCAGG ACATCCGCTT CCGCTCCTGC ATAGCCAAAT TTTTCAAAAT	4200
ATTGCGCGGT TCGAGGGCA AAGGCGTCG TGTGCGAAAT GCCCAGGAAA TAATCGTACT	4260
CACATTCGST ACTGAGCCG ATGTATTCGG CATAGTTGAA GTGGTCGGTC ATTTTTTCAA	4320
AGCCACCACA CAGGACGATG TCGTACTCAC CCGAGGCGAC CATCTGATGG GCCATCTGAA	4380
AGGAACCGA GCTGCTGGTG CAGTTGGCAG TGCTCATGAA CGTCGGGGCA GGGCTGATGC	4440
CCAGGGCATC GGAATAGTC GGGCCGAGG CGCCGTATTC CGAAATACCT TCACCGTAT	4500
ATCCATAAGC GACTGCCTGA AGTTCACGGG GATGCATCTT GATGGCGTTG AGCGCCTGAT	4560
AGGCGGACTC GACGATCATC TCCTTGAAGG TTTGACGGAC TCTGGAGCTG CCGGGTTTGG	4620
AAGTATAGGC AGCCGAACG ATAGCAACGC GTCGTCCGCT CATTGGAAGT GCTCCTTGCT	4680
GSATGGTTGG GAATCAGAGG TAGGCTGTCA GGGCGTAGTC AGGCCGCAAG TATTTGAACT	4740

CGTACTTGAT CGACGTCCCG TAATCCACGT AATACTTGTC TTCCAGCAGC GTGGCCAGCG 4800
CAACGTTGGT CTTTTGGTAG GOTTGATGG CATCGGTCAC TGTCAACGCA ATCGCATCCG 4860
TGCCCCGACC AAACCCGTAC GACACCAAGA GGATTTTTTC ACCCGGACCG GCTCGGTCCA 4920
GTACGCTCAC CAAGCCGAGC AACGGACTCG CGGCCCCCGC ATCACCGACA CTCTGGGCAT 4980
AAATGCCAGG TTCGATCTGC GCTTTGGTGA AGCCCAGGCC TTTGCCAAGA GAGAAGGGGG 5040
TCGAACCAG GTTTTGGTGG AATACGACAT AGTCGAAATC GCTGGCCTGT ACATTCATCT 5100
TGGCCATCAA TCCCGACGCA GCACGATGGG TCTGGTCTTC AAGGCCAATG CTGTTCTTGT 5160
CGGAGCCCGC CCCCATTCCT GAGCGAATGT AGCGGTCTCC CTGGGGGGCG ATGTTGTGAG 5220
CCACATCGGC GCGCAAGAA AAGCTGGCAT CGAAATGCGC GATCACATTT TCAGTACCCA 5280
ACAACAGTGC GCGGGCTCCC GCTCCGCGT AGGACTCGGT CAAGTCGCGC GGGGCGGTGT 5340
TGCGGTTGAT CGTATCGCGC CCTATTGCCA GTGCATTGCC GGCCATGCCC GAGGCTACCA 5400
GGGCATAGGC GATCTGCAGG GCGCTGGTGC CTGATTTGCC GGCAAATGT ACGTCCGGCG 5460
AGAAGGCGTC ATAACCGCAG CCGAGCATTT CCAGAATGAC CGCGGCCGAG GCGCGGGAGT 5520
CATATGGGTT GGTGCACGTA CCCAGGTACA GCGCTTCCAG GTCGCAAGAA GGGGCTTTGT 5580
CCAGCGCAGC TTGAGCGGCC AGGACACTCA AGGTAATGAC GTCCTCATCG GGTGGAGTA 5640
CAGCCCTTTC AACGACGCCC AGTTGGTTGG TGACCAGACT CAAGTCTGTG TTTTCCAGA 5700
CGTGGATCAC GTCTTCCACT TTAAGGCGGC ACACCGGGAT GCCCGCGCCA TAGCTCACA 5760
TTCCTACTTT ATTACGTTT ACTTCCTCCA GATTCTTTT TTCACCTGCC AGCGGATAGC 5820
CGTGACCGAT GCATGAAATA TTTAGAAACT ATCTAACGGT GCCCGCAAAG TGTCGTTGGC 5880
AGTCCTATGC CCGGAAATCG GGCTCCTCAA GGGGGAAAAC TACAGTTCCT TTGAGGGACA 5940
ACGSGTTTAT TATCCTTCTA TTATTATGTA TGATACGAAA CGTGCCGTAT CGTTAAGGTC 6000
TTGTTAAAA TTGATGACTA TTTATCGGCT TTCTTCTAT CTAGTGGCAA GTTCCGCTAT 6060
TGAGGTGTGC AGTTAAGCAG AACTTAGAT CATAAAAACA TACAAAACGA AACGATCCGT 6120
TTCATTGCTT TTCGAGAGAA TCCTATACCT TGCGTCTCTT TTGTCAAGCG CCATATTGGA 6180
GATTTTGAAT TATGGCCCGT AAACCGTCTC GGAGCTCCAT TGGCTCATG AGGAGCCCA 6240
ATACGCACAA AGCGATCATC ATCTCCGCTA TAGAAACACT CAGGAGTGC GGTATTTCAG 6300
GGTTGAGTAT CGAGGCTGTG GCTCGCCGTG CCGGCGCGAG CAAGCCGACC ATCTATCGAT 6360

GGTGGGGTAA CAAGGCGGCT TTGATCGCCG AAGTCTACGA GAGCGAAAGC GAGCAGATTC	6420
GCAAGGAGCC TGATAAAGGA TCCTTCAAGG AGAACCTCAA TTTCTGCTG CTCAATCTGT	6480
GGAAGGTCTG GAGAGAAACG ATTTGCGGGG AGGCGTTTCG GTGTGTCATC GCTGAAGCCC	6540
AGCTCGACCC CAGTACGCTG CCCAAGCTGA AGGATGAATT CATGGAGCGT CGTCGGGAAT	6600
TGCCCGGAAA GCTGCTGGAA AACGCCATCC AGCAAGGTGA GTTGCCCAAG GACACGTCCC	6660
GTGAGTTGTT GTTGGACATG ATCTTCGGAT TTTGCTGGTA CAGGCTGTTG ACTGAGCAAC	6720
TGGAAGTGGA GGGTGACATC AATGAATTCA CGACGCTTCT GTTGAACGGC GTGTTGCGTA	6780
CGACTTCGGC GCGCGAGTAA GGCGCGCGCG AAGCCTGTTC AAGGGTGAGG ATTGGCCTTA	6840
CGCCGCGCGG CTGAACTGTG CATGAAGGCC AGGCAGGATA CTGGCCAGGT GGTGAACTC	6900
ACACAGATCA TGCACAGCAA ATTCATAAGC CAGGGTTTCC AGTTCCGCTT CCCCAAACCC	6960
GTTCCTCTTC AACAACTGCG CGGCGCGTTC GGCACCGGGA AAACGCAGCA TCGCTGGGTG	7020
GCTGCCACCC CAGTAACGGC TGGTCAGGTA CAAGCCTTCG GGGCATTCTT TGAACAAGTG	7080
CACCATGAGC GATATCGGCA CTTGCGGCTG ATCCGCCAGG CTCATCAAGG CGCTGACGCT	7140
GCCGTCTATT TTTGATTGCG GATACAGGTC CGCAGAGAAA CCCAGCTCGC ATGGATCC	7198

(2) INFORMACIJA APIE SEKĄ SEQ ID No: 5:

(i) SEKOS CHARAKTERISTIKA:

(A) ILGIS: 350 aminorūgščių

(B) TIPAS: aminorūgštis

(D) TOPOLOGIJA: linijinė

(ii) MOLEKULĖS TIPAS: baltymas

(xi) SEKOS APRAŠYMAS: SEQ ID No: 5:

Met	Ser	Thr	Leu	Cys	Lys	Pro	Ser	Leu	Leu	Phe	Pro	His	Tyr	Lys	Ile
1				5					10					15	
Thr	Gln	Gln	Gln	Met	Ile	Asp	His	Leu	Glu	Gln	Leu	His	Asp	Asp	His
			20					25					30		
Pro	Arg	Met	Ala	Leu	Ala	Lys	Arg	Met	Ile	Gln	Asn	Thr	Gln	Val	Asn
		35				40						45			
Glu	Arg	Tyr	Leu	Val	Leu	Pro	Ile	Asp	Glu	Leu	Ala	Val	His	Thr	Gly
50						55					60				

Phe Thr His Arg Ser Ile Val Tyr Glu Arg Glu Ala Arg Arg Met Ser
 65 70 75 80
 Ser Ile Ala Ala Arg Gln Ala Ile Glu Asn Ala Gly Leu Thr Thr Asp
 85 90 95
 Asp Ile Arg Met Val Ala Val Thr Ser Cys Thr Gly Phe Met Met Pro
 100 105 110
 Ser Leu Thr Ala His Leu Ile Asn Asp Leu Gly Leu Arg Thr Ser Thr
 115 120 125
 Val Gln Leu Pro Ile Ala Gln Leu Gly Cys Val Ala Gly Ala Ala Ala
 130 135 140
 Ile Asn Arg Ala Asn Asp Phe Ala Ser Leu Ser Pro Asp Asn His Ala
 145 150 155 160
 Leu Ile Val Ser Leu Glu Phe Ser Ser Leu Cys Tyr Gln Pro Gln Asp
 165 170 175
 Thr Lys Leu His Ala Phe Ile Ser Ala Ala Leu Phe Gly Asp Ala Val
 180 185 190
 Ser Ala Cys Val Met Arg Ala Asp Asp Lys Ala Pro Gly Phe Lys Ile
 195 200 205
 Ala Lys Thr Gly Ser Tyr Phe Leu Pro Asp Ser Glu His Tyr Ile Lys
 210 215 220
 Tyr Asp Val Lys Asp Ser Gly Phe His Phe Thr Leu Asp Lys Ala Val
 225 230 235 240
 Met Asn Ser Ile Lys Asp Val Ala Pro Met Met Glu Glu Leu Asn Phe
 245 250 255
 Glu Thr Phe Asn Gln His Cys Ala Gln Asn Asp Phe Phe Ile Phe His
 260 265 270
 Thr Gly Gly Arg Lys Ile Leu Asp Glu Leu Val Leu Gln Leu Asp Leu
 275 280 285
 Glu Pro Gly Arg Val Ala Gln Ser Arg Asp Ser Leu Ser Glu Ala Gly
 290 295 300
 Asn Ile Ala Ser Val Val Val Phe Asp Val Leu Lys Arg Gln Phe Asp
 305 310 315 320
 Ser Gly Pro Ala Asn Gly Ala Thr Gly Met Leu Ala Ala Phe Gly Pro
 325 330 335
 Gly Phe Thr Ala Glu Met Ala Val Gly Lys Trp Val Ala +
 340 345 350