

RZECZPOSPOLITA  
POLSKA



Urząd Patentowy  
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **240045**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **433315**

(22) Data zgłoszenia: **23.03.2020**

(51) Int.Cl.  
**C12P 1/04 (2006.01)**  
**C12P 19/04 (2006.01)**  
**C05F 11/08 (2006.01)**

(54) **Sposób otrzymywania czynników Nod ze szczepu bakterii Rhizobium leguminosarum  
bv. Viciae GR09 znajdujących zastosowanie jako bionawóz stymulujący  
wzrost roślin bobowatych**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:  
**27.09.2021 BUP 26/21**

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:  
**07.02.2022 WUP 06/22**

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIwersytet Marii  
Curie-Skłodowskiej, Lublin, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**ANNA SROKA-BARTNICKA, Lublin, PL**  
**IWONA KOMANIECKA, Lublin, PL**  
**DOMINIKA KIDAJ, Lublin, PL**  
**JERZY WIELBO, Janów, PL**  
**KATARZYNA SUŚNIAK, Słupsk, PL**  
**MIKOŁAJ KRYSA, Motycz Leśny, PL**

**PL 240045 B1**

## Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania czynników Nod ze szczepu bakterii *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae* GR09 chronionego patentem PL 213953, znajdujących zastosowanie jako bionawóz stymulujący wzrost roślin bobowatych.

Symbioza roślin bobowatych np. lucerny, wyki, grochu, soi czy soczewicy z bakteriami z rodzaju *Rhizobium*, zapewnia roślinom łatwo przyswajalne źródło azotu. Rizobia infekują korzenie roślin bobowatych, indukują powstawanie brodawek korzeniowych, wewnątrz których redukują azot atmosferyczny do amoniaku i przekazują go na potrzeby roślinnych gospodarzy, tak więc liczba brodawek korzeniowych ma bezpośredni wpływ na efektywność wiązania azotu atmosferycznego przez bakteroidy zasiedlające brodawki, co z kolei przekłada się na plonowanie roślin. W sytuacji gdy autochtoniczne rizobia, specyficzne dla uprawianego gatunku roślin bobowatych nie występują w glebie w ilości wystarczającej dla nawiązania efektywnej symbiozy czy też gdy ich efektywność symbiotyczna nie jest zadowalająca w przełożeniu na plonowanie roślin bobowatych lub roślin następczych, stosuje się szczepionki lub nawozy zawierające wysoko aktywne szczepy z rodzaju *Rhizobium*, co znane jest powszechnie, m.in. z publikacji autorstwa Toro, World J. Microbiol. Biotech. Nr 12, 1996 czy też Martyniuk i wsp., Bot. Lithuanica, 1999, Suppl. 3.

Znane ze stanu techniki metody produkcji szczepionek czy preparatów stymulujących symbiozę rizobiów roślin bobowatych, spośród których część zawiera żywe komórki rizobiów produkujące czynniki Nod, bezpośrednio w środowisku glebowym, zostały ujawnione między innymi w publikacji Zhang i Smith, Advances in Agronomy, 2002, 76, z której wynika, że *Bradyrhizobium japonicum* wykorzystuje się przy uprawie soi, a także w opisach patentowych, takich jak, PL185545 i CN106987541 gdzie *Rhizobium meliloti* i *Sinorhizobium meliloti* XGL026, stosowane w uprawie lucerny. Z kolei w uprawie wyki wykorzystuje się preparaty z udziałem kilku szczepów *Rhizobium leguminosarum*, jak wskazują opisy patentowe ES2099679, SU1629295, CN107955799, CN108034606, CN108034603, czy też *Rhizobium anhuiense* przy uprawie wyki w płodozmianie z tytoniem, jak wynika z opisu patentowego CN108034604. Liczne preparaty z udziałem szczepów *Rhizobium leguminosarum* znajdują zastosowanie w uprawie grochu, jak wynika z opisów patentowych SU698968, US2006/0258534, SU979307, UA81577, SU1789523. Metody stosowania w hodowli roślin bobowatych, preparatów i szczepionek z żywymi bakteriami wskazanych w powyższym stanie techniki, oparte są na hodowlach bakteryjnych prowadzonych w dużych objętościach podłoża i wymagają stosowania żywych, aktywnych komórek niezależnie od warunków aktualnie panujących w środowisku. Niestety szczepionki takie mogą przegrywać konkurencję z populacjami autochtonów lepiej przystosowanymi do warunków glebowych mimo niższej aktywności w wiązaniu azotu atmosferycznego.

W opisach patentowych PL 212250, PL 213953 i PL 230565, ujawniono metody produkcji preparatów stymulujących symbiozę pomiędzy roślinami bobowatymi, a rizobiami naturalnie występującymi w glebie, których czynnikiem aktywnym są izolowane czynniki Nod różnych, wysoko aktywnych symbiotycznie szczepów rizobiów: *Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolii* KO17, przeznaczonego do stosowania w uprawie koniczyny i *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae* GR09, przeznaczonego do stosowania w uprawie wyki i grochu.

W przypadku opatentowanych preparatów *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae* GR09 oraz *Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolii* KO17, syntezę czynników Nod indukowano poprzez dodanie do hodowli bakteryjnej mieszaniny flawonoidów wydzielanych przez kiełkujące nasiona odpowiednio grochu i koniczyny. Otrzymane według tych sposobów czynniki Nod są mieszaniną różnych substancji będących metabolitami bakteryjnymi lub składnikami podłoża hodowlanego, które współekstrahują się z płynu pohodowlanego wraz z czynnikami Nod i są obecne w preparacie nie poddawanym później procedurze oczyszczania. Otrzymane ze szczepu bakterii *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae* GR09 sposobem według wynalazku, oczyszczone lipochitooligosacharydy – czynniki Nod, zastosowane w uprawie szklarniowej grochu spowodowały, w porównaniu z użytymi w identycznych dawkach i stężeniach, nieoczyszczonymi czynnikami Nod, zwiększenie liczby brodawek na korzeniach tych, roślin, co w konsekwencji przełożyło się na wydajny wzrost zielonej masy roślin.

Istotą wynalazku jest nowy sposób otrzymywania ze szczepu bakterii *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae* GR09 oczyszczonych lipochitooligosacharydów – czynników Nod, polegający na indukowaniu komórek bakteryjnych flawonoidem – rozpuszczoną w alkoholu etylowym naringeniną substancją specyficznie indukującą syntezę czynników Nod przez bakterie z gatunku *Rhizobium leguminosarum*. Następująca po indukcji liofilizacja płynu pohodowlanego, umożliwi maksymalne zagęszczenie metaboli-

tów, a w dalszej kolejności wydajne, wielostopniowe ekstrakcyjne oczyszczanie rozpuszczonego w wodzie dejonizowanej liofilizatu z użyciem *n*-butanolu i kolejno stosowanych selektywnych ekstrahentów, dedykowanych fosfo- i glikolipidom błonowym oraz składnikom autolizatu drożdżowego pochodzącego z pożywki hodowlanej, a także fosfo- i glikolipidom bakteryjnym oraz egzo- i polisacharydom ze szczepu GR09 – związkom towarzyszącym lipochitoooligosacharydom – czynnikiem Nod.

Sposób otrzymywania czynników Nod ze szczepu bakterii *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae* GR09 znajdujących zastosowanie jako bionawóz stymulujący wzrost roślin bobowatych charakteryzuje się tym, że do szczepu bakterii *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae* GR09, wyhodowanego do miana w granicach od  $5 \times 10^8$  do  $5 \times 10^{10}$  cfu na 1 ml płynnego podłoża, korzystnie w pożywce TY z wytrząsaniem, dodaje się naringeninę rozpuszczoną w alkoholu etylowym, aż do uzyskania stężenia końcowego w danej objętości hodowli w granicach od 5 do 15  $\mu\text{M}$ , po czym hodowlę kontynuuje się przez 48 do 72 godzin, a uzyskane metabolity odwirowuje się przy 8 do 12 tys. obr./min. Tak uzyskany płyn pohodowlany poddaje się liofilizacji, po czym liofilizat rozpuszcza się w wodzie dejonizowanej w proporcji jak 1:4 (m/v), przenosi do rozdzielacza i poddaje ekstrakcji za pomocą *n*-butanolu, dodając alkohol w proporcji objętościowej do roztworu liofilizatu jak 1:5 (v/v). Po wytrząsaniu, oddzieloną fazę alkoholową zawierającą oprócz lipochitoooligosacharydów – czynników Nod, inne fosfo- i glikolipidy błonowe pochodzące ze szczepu bakterii *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae* GR09, a także fosfo- i glikolipidy drożdżowe pochodzące z autolizatu drożdżowego, będącego składnikiem pożywki TY, zagęszcza się na wyparce próżniowej, ogrzewa w temperaturze 25–40°C, aż do odparowania rozpuszczalnika i resztek wody, a tak uzyskaną suchą masę rozpuszcza się do konsystencji półpłynnej 50% roztworem wodnym acetonitrylu, potem oziębia w temperaturze od -18 do -20°C, a następnie poddaje frakcjonowaniu techniką SPE, na kolumnie, korzystnie ze zwilżonym ddH<sub>2</sub>O złożem LC-18. Dla wymycia związków hydrofilnych, kolumnę z osadem metabolitów płucze się zdejonizowaną wodą, a następnie 50% wodnym roztworem metanolu dla wyekstrahowania fosfolipidów błonowych, po czym końcową frakcję pozostałą na kolumnie ponownie wymywa się 60% wodnym roztworem acetonitrylu, dla całkowitego wyekstrahowania lipidów bakteryjnych. W tak otrzymanym ekstrakcie, znanymi metodami oznacza się stężenie czynników Nod wykonując analizę techniką GC-MS, oraz wykonuje się analizę jakościową techniką LC-MS, przy użyciu spektrometru masowego o wysokiej rozdzielczości (HDMS) z przyłączonym chromatografem cieczowym (UPLC).

Wynalazek i jego skuteczność na wzrost roślin przedstawiono w poniższych przykładach wykonania.

#### Przykład 1

Sposób otrzymywania oczyszczonych czynników Nod, według wynalazku.

Do szczepu bakterii *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* GR09, wyhodowanego do miana  $5 \times 10^{10}$  cfu na 1 ml płynnego podłoża, na pożywce TY z wytrząsaniem, dodawano 5 mM roztwór naringeniny rozpuszczonej w alkoholu etylowym, aż do uzyskania stężenia końcowego w danej objętości hodowli 15  $\mu\text{M}$ , po czym hodowlę kontynuowano się przez 72 godziny, a uzyskane metabolity odwirowano się przy 12 tys. obr./min. Tak uzyskany płyn pohodowlany poddano liofilizacji, po czym liofilizat rozpuszczono w wodzie dejonizowanej w proporcji 50 g liofilizatu na 200 ml wody, przeniesiono do rozdzielacza i poddano ekstrakcji za pomocą *n*-butanolu, dodając alkohol w proporcji objętościowej do roztworu liofilizatu jak 1:5 (v/v). Po wytrząsaniu, oddzieloną fazę alkoholową, zagęszczono na wyparce próżniowej, ogrzewając w gradiencie temperatury od 25°C do 40°C, aż do odparowania rozpuszczalnika i pozostałości wody. Tak uzyskaną suchą masę rozpuszczono do konsystencji półpłynnej 50% roztworem wodnym acetonitrylu, oziębiono w temperaturze -20°C, a następnie poddano frakcjonowaniu techniką SPE, na kolumnie o obj. 20 ml, zawierającej 10 ml złoża LC-18 (Supelclean) zwilżonego ddH<sub>2</sub>O i płukanej solwentami, każdorazowo w ilości 40 ml. Początkowo, dla wymycia związków hydrofilnych, kolumnę z osadem metabolitów płukano zdejonizowaną wodą, a następnie 50% wodnym roztworem metanolu, po czym końcową frakcję pozostałą na kolumnie ponownie wymywano 60% wodnym roztworem acetonitrylu. W tak otrzymanym ekstrakcie, znanymi metodami oznaczano stężenie czynników Nod wykonując analizę techniką GC-MS, oraz wykonano analizę jakościową techniką LC-MS, przy użyciu spektrometru masowego o wysokiej rozdzielczości (HDMS) z przyłączonym chromatografem cieczowym (UPLC).

Widmo masowe końcowej frakcji metabolitów ze szczepu bakterii *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae* GR09, uzyskane z zastosowaniem analizy LC-MS przedstawiono na rysunku jako fig. 1. Identyfikację składników frakcji wykonano w oparciu o czasy retencji poszczególnych składników i analizę ich widm masowych. Przyjęto, na podstawie analiz wykonanych techniką wysokorozdzielczej,

spektrometrii mas, że charakterystyczne dla czynników Nod cząsteczki lipochitooligosacharydu zawierają od 3 do 5 reszt N-acetyloglukozaminy – G1cNAc, jedną cząsteczkę kwasu tłuszczowego i od 1 do 3 grup acetylowych – Ac.

Interpretacja widma przedstawionego jako fig. 1, gdzie A, B, C i D to struktury chemiczne cząsteczek Nod, zróżnicowane ze względu na masę cząsteczki i przedstawione odpowiednio jako: wzór 1, 2, 3 i 4, jednoznacznie wskazuje, iż występujące tam intensywne piki świadczą o dominującej obecności cząsteczek identyfikowanych jako czynniki Nod, a sygnały o niskiej intensywności pochodzące od zanieczyszczeń, świadczą o wysokiej czystości analizowanego materiału.

Dla potwierdzenia opisanej wyżej identyfikacji czynników Nod i wysokiej czystości frakcji otrzymanej sposobem według wynalazku, wykonano kolejny eksperyment płucząc końcową frakcję pozostałą na kolumnie 100% acetonitrylem (cz.d.a., LC-MS), dla całkowitego wyekstrahowania lipochitooligosacharydu, po czym wykonano analizę jakościową frakcji metodą LC-MS, z użyciem jak poprzednio spektrometru masowego o wysokiej rozdzielczości (HDMS) z przyłączonym chromatografem cieczowym (UPLC).

Widmo masowe przedstawione na rysunku jako fig. 2. Nie zawiera intensywnych pików charakterystycznych dla czynników Nod, co potwierdza wysoki stopień selektywności sposobu według wynalazku dla otrzymywania oczyszczonych czynników Nod.

#### Przykład 2

Sposób otrzymywania oczyszczonych czynników Nod, według wynalazku.

Do szczepu bakterii *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* GR09, wyhodowanego do miana  $5 \times 10^8$  cfu na 1 ml płynnego podłoża w pożywce TY z wytrząsaniem, dodawano 5 mM roztwór naringeniny rozpuszczonej w alkoholu etylowym, aż do uzyskania stężenia końcowego, w danej objętości hodowli w granicach  $5 \mu\text{M}$ , po czym hodowlę kontynuowano przez 48 godzin, a uzyskane metabolity odwirowano przy 8 tys. obr./min. Tak uzyskany płyn pochodzący z hodowli poddano liofilizacji, po czym liofilizat rozpuszczono w wodzie dejonizowanej w proporcji 25 g liofilizatu na 100 ml wody, przeniesiono do rozdzielacza i poddano ekstrakcji za pomocą *n*-butanolu, dodając alkohol w proporcji do roztworu liofilizatu jak 1:5 (v/v). Po wytrząsaniu, oddzieloną fazę alkoholową zagęszczono na wyparce próżniowej, ogrzewając w gradiencie temperatury od  $25^\circ\text{C}$  do  $40^\circ\text{C}$ , aż do odparowania rozpuszczalnika i pozostałości wody, a tak uzyskaną suchą masę rozpuszczono do konsystencji półpłynnej, 50% roztworem wodnym acetonitrylu, oziębiono do  $-18^\circ\text{C}$ , a następnie poddano frakcjonowaniu techniką SPE, na kolumnie o objętości 10 ml zawierającej 5 ml złoża LC-18 (Supelclean) zwilżonego  $\text{ddH}_2\text{O}$  i płukanej solwentami, każdorazowo po 20 ml. Kolumnę z osadem metabolitów przepłukano zdejonizowaną wodą, a następnie 50% wodnym roztworem metanolu, po czym końcową frakcję pozostałą na kolumnie ponownie wymywano 60% wodnym roztworem acetonitrylu. W tak otrzymanym ekstrakcie, znanymi metodami oznaczano stężenie czynników Nod wykonując analizę techniką GC-MS, oraz wykonano analizę jakościową techniką LC-MS, przy użyciu spektrometru masowego o wysokiej rozdzielczości (HDMS) i przyłączonego do niego chromatografu cieczowego (UPLC).

Widmo masowe końcowej frakcji metabolitów ze szczepu bakterii *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae* GR09, uzyskane z zastosowaniem analizy LC-MS przedstawiono na rysunku jako fig. 3. Identyfikację składników frakcji wykonano w oparciu o czasy retencji poszczególnych składników i analizę ich widm masowych. Ilość czynników Nod szacowano przeliczając na jednostki N-acetyloglukozaminy w oparciu o wzorzec wewnętrzny w postaci Ga1NAc, który dodawano w znanej ilości do wyjściowego, preparatu. Przyjęto, na podstawie analiz wykonanych techniką wysokorozdzielczej spektrometrii mas, że charakterystyczne dla czynników Nod cząsteczki lipochitooligosacharydu zawierają od 3 do 5 reszt N-acetyloglukozaminy – G1cNAc, jedną cząsteczkę kwasu tłuszczowego i od 1 do 3 grup acetylowych – Ac.

Interpretacja widma przedstawionego jako fig. 3, gdzie A, B, C i D to struktury chemiczne cząsteczek Nod, zróżnicowane ze względu na masę cząsteczki i przedstawione odpowiednio jako: wzór 1, 2, 3 i 4, jednoznacznie wskazuje, iż występujące tam intensywne piki świadczą o dominującej obecności cząsteczek identyfikowanych jako czynniki Nod, a sygnały o niskiej intensywności, pochodzące od zanieczyszczeń świadczą o wysokiej czystości analizowanego materiału. Dla potwierdzenia opisanej wyżej identyfikacji czynników Nod i wysokiej czystości frakcji otrzymanej sposobem według wynalazku, wykonano kolejny eksperyment płucząc kolumnę 100% acetonitrylem (cz.d.a., LC-MS), dla całkowitego wyekstrahowania lipochitooligosacharydu, po czym wykonano analizę jakościową frakcji metodą LC-MS, z użyciem jak poprzednio spektrometru masowego o wysokiej rozdzielczości (HDMS) z przyłączonym chromatografem cieczowym (UPLC). Widmo masowe przedstawione na rysunku jako

fig. 4. nie zawiera intensywnych pików charakterystycznych dla czynników Nod, co potwierdza wysoki stopień selektywności sposobu według wynalazku dla otrzymywania oczyszczonych czynników Nod.

#### Przykład 3

Wpływ oczyszczenia czynników Nod według wynalazku w uprawie grochu w warunkach niesterylne doświadczenia szklarniowego.

Sporządzono roztwory czynników Nod w wodzie zdejonizowanej o stężeniu docelowym  $10^{-11}$ – $10^{-14}$  M preparatu, gotowe do zastosowania w uprawie grochu. Eksperyment rozpoczęto od nasion moczenia nasion grochu przez 30 min. dla 3 grup doświadczalnych:

- kontrola – nasiona moczone w wodzie (1 ml na 1 nasiono),
- nasiona moczone (1 ml na 1 nasiono), w wodnych roztworach nieoczyszczonych czynników Nod o stężeniach: od  $10^{-11}$  M do  $10^{-14}$  M,
- nasiona moczone (1 ml na 1 nasiono), w wodnych roztworach oczyszczonych według wynalazku czynników Nod, o stężeniach: od  $10^{-11}$  M do  $10^{-14}$  M.

Tak przygotowane nasiona grochu pikowano do doniczek wypełnionych mieszaniną piasku, gleby ogrodniczej i perlitu (1:1:1, v/v/v). Doniczki podlewano tak, aby utrzymać wilgotność gleby na poziomie ok 60% pojemności wodnej. Po 42 dniach hodowli, z każdej grupy doświadczalnej, pobierano rośliny i liczono brodawki korzeniowe, ważono świeżą masę pędu, a następnie materiał ususzono w celu zważenia suchej masy pędu.

Dla każdej grupy doświadczalnej wykonano 2 powtórzenia.

Wyniki przedstawione w tabeli, pozwalają stwierdzić, iż dla tych samych warunków hodowli, tej samej objętości używanych roztworów o tych samych stężeniach czynników Nod, użyte do sporządzania roztworów czyste czynniki Nod powodują większy przyrost masy brodawek korzeni rośliny co konsekwentnie przedkłada się na większy przyrost masy części zielonych.

## Zastrzeżenie patentowe

1. Sposób otrzymywania czynników Nod ze szczepu bakterii *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae* GR09 znajdujących zastosowanie jako bionawóz stymulujący wzrost roślin bobowatych, **znamienny tym**, że do szczepu bakterii, wyhodowanego do miana w granicach od  $5 \times 10^8$  do  $5 \times 10^{10}$  cfu na 1 ml płynnego podłoża, dodaje się naringeninę rozpuszczoną w alkoholu etylowym, aż do uzyskania stężenia końcowego w danej objętości hodowli w granicach od 5 do 15  $\mu$ M, po czym hodowlę kontynuuje się przez 48 do 72 godzin, a uzyskane metabolity odwirowuje się przy 8 do 12 tys. obr./min i tak uzyskany płyn hodowlany poddaje się liofilizacji, po czym liofilizat rozpuszcza się w wodzie dejonizowanej w proporcji jak 1:4 (m/v), przenosi do rozdzielacza i poddaje ekstrakcji z wytrząsaniem za pomocą *n*-butanolu, dodawanego w proporcji do roztworu liofilizatu jak 1:5 (v/v), a tak oddzieloną fazę alkoholową zagęszcza się na wyparce próżniowej, ogrzewając w temperaturze 25–40°C, aż do odparowania rozpuszczalnika i resztek wody, po czym suchą masę rozpuszcza się do konsystencji półpłynnej 50% roztworem wodnym acetonitrylu, oziębia w temperaturze od -18 do -20°C i poddaje frakcjonowaniu techniką SPE, płuczając kolumnę z osadem metabolitów najpierw zdejonizowaną wodą dla wymycia związków hydrofilnych, a następnie 50% wodnym roztworem metanolu dla wyekstrahowania fosfolipidów błonowych zaś końcową frakcję pozostałą na kolumnie ponownie wymywa się 60% wodnym roztworem acetonitrylu, dla całkowitego wyekstrahowania glikolipidów bakteryjnych.

## Rysunki

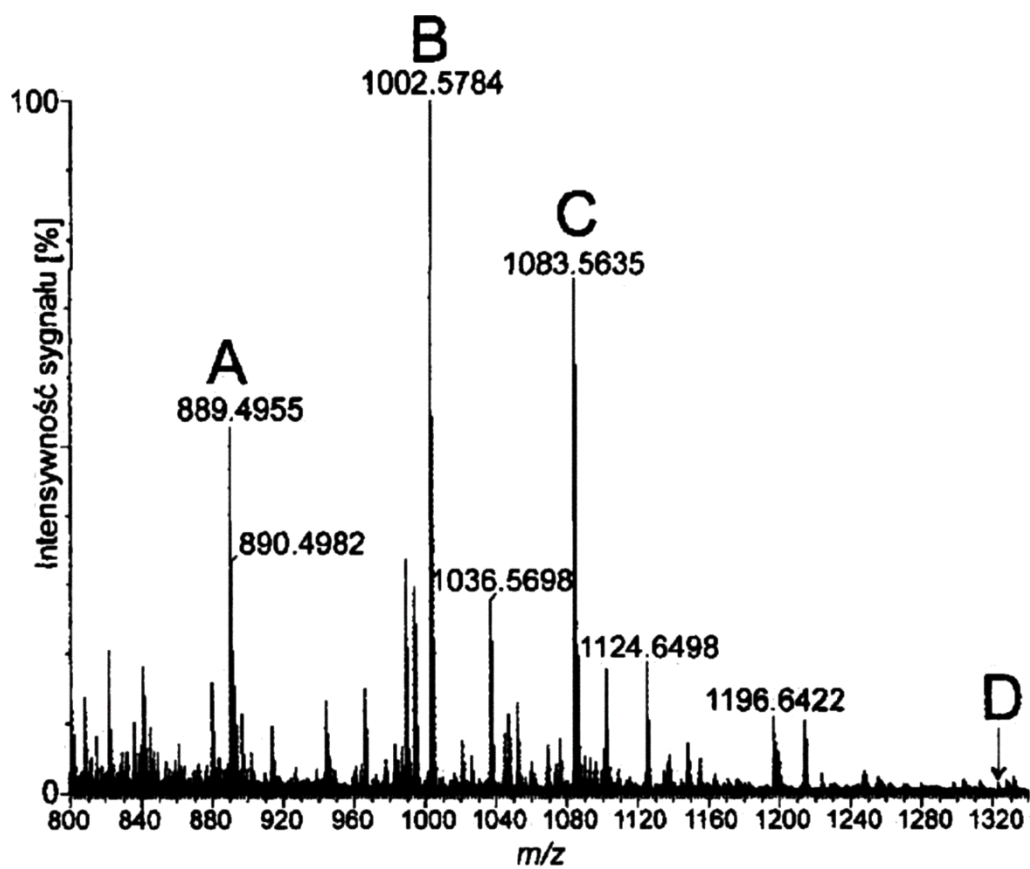


Fig. 1

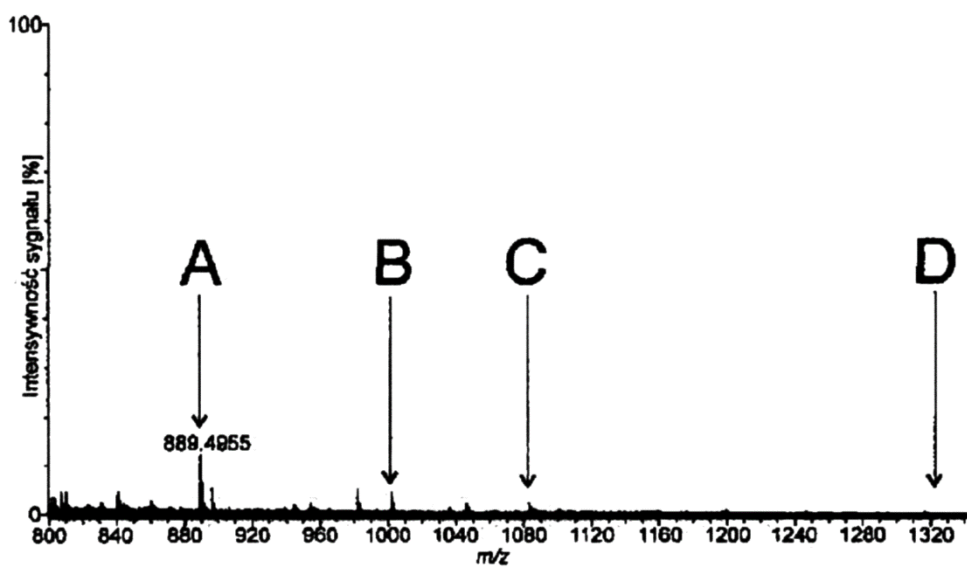


Fig. 2

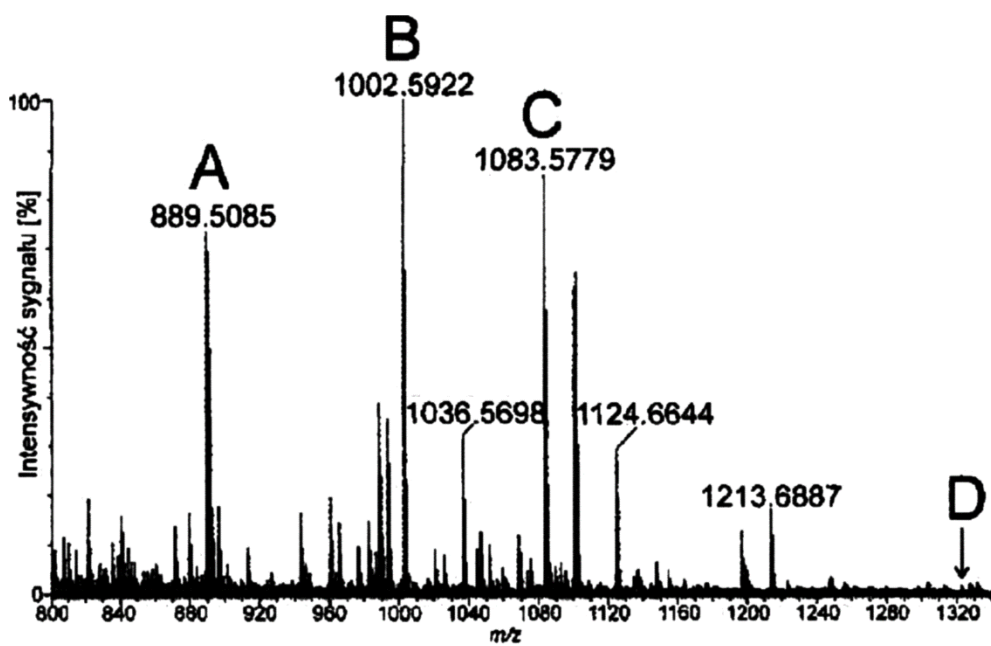


Fig. 3.

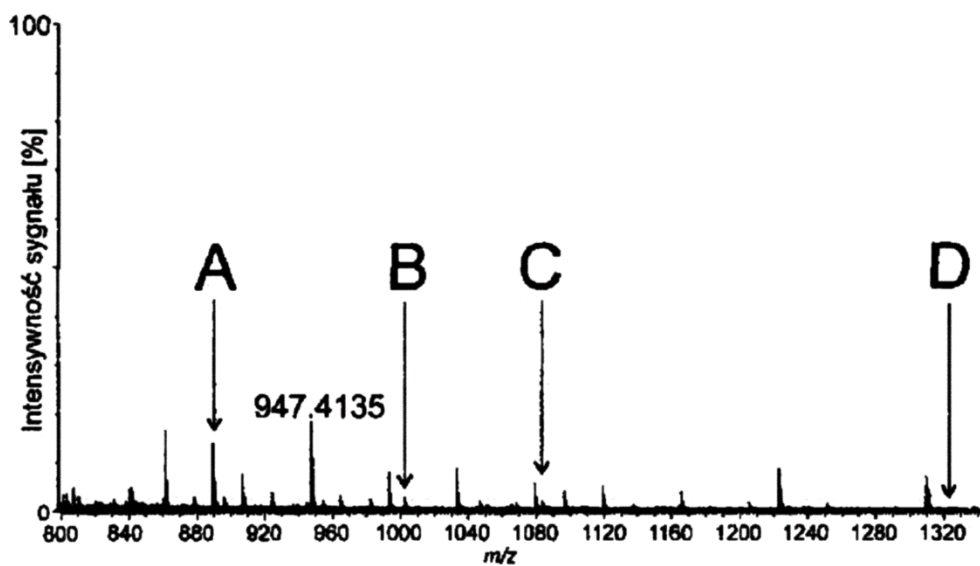
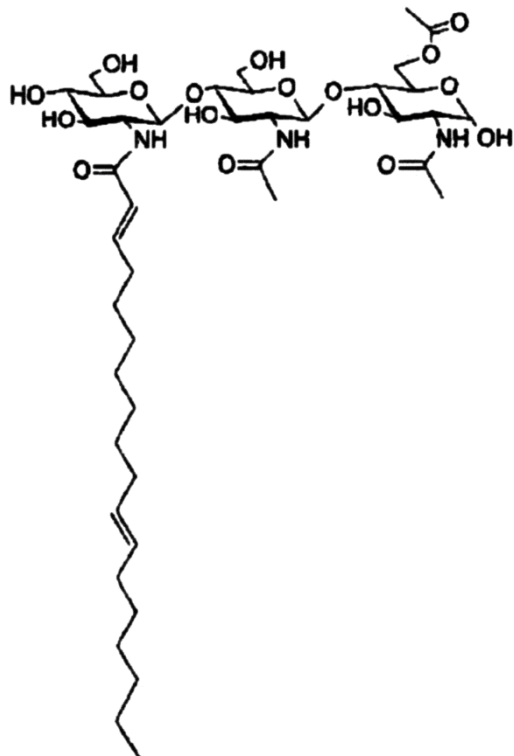


Fig. 4.

**A**

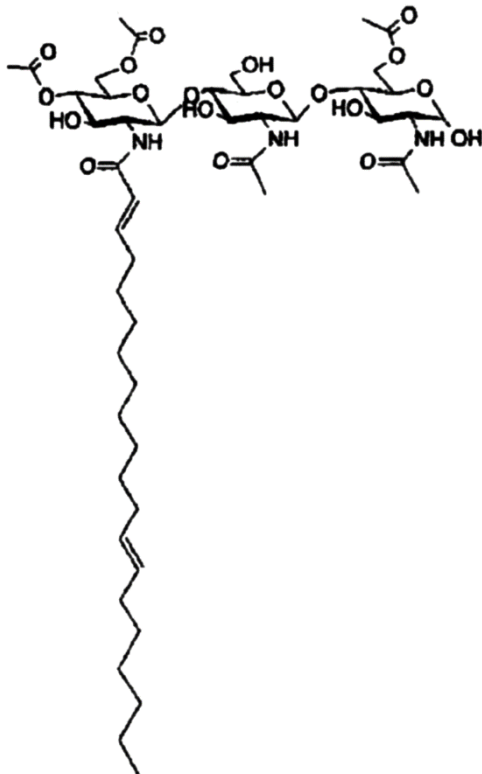
$$[M]^+ = 890,4856 \text{ u}$$



Wzór 1

**B**

$$[M]^+ = 1002.5380 \text{ u}$$

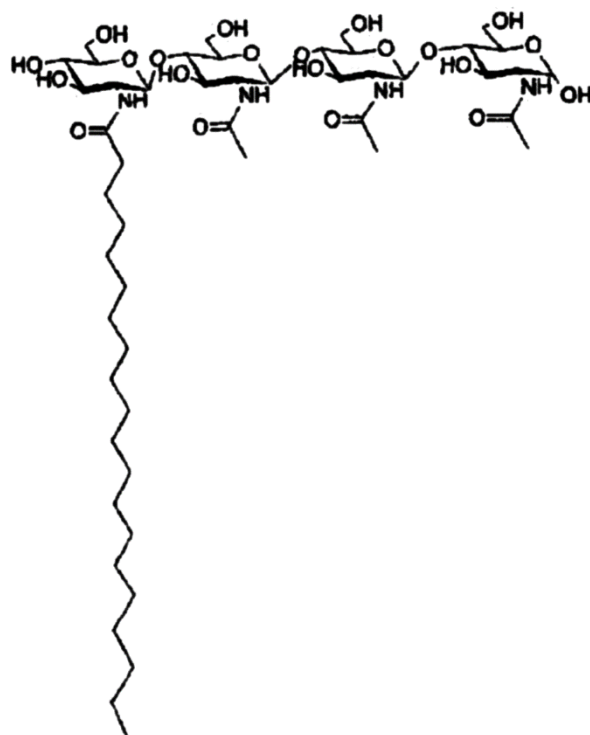


Wzór 2



**C**

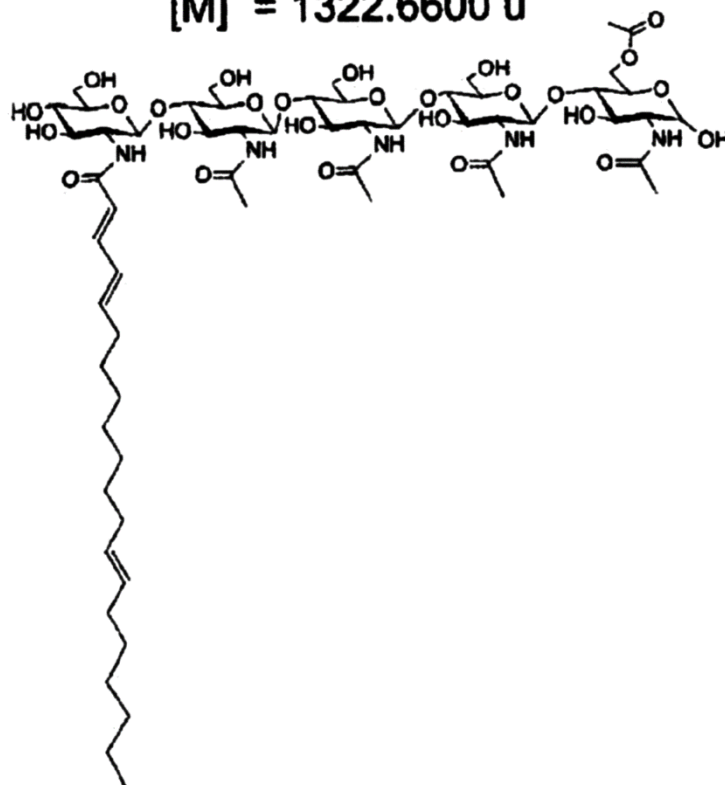
$$[M]^+ = 1083.6170 \text{ u}$$



Wzór 3

**D**

$$[M]^+ = 1322.6600 \text{ u}$$



Wzór 4

Tabela 1.

Rodzaj preparatu	Liczba brodawek (1 roślina)	Świeża masa pędu (g/1 roślina)	Sucha masa pędu (g/1 roślina)
<i>Kontrola - nasiona moczone w wodzie</i>	88,8 ± 19,2 <sup>c</sup>	2,34 ± 0,61 <sup>c</sup>	0,12 ± 0,09 <sup>c</sup>
Preparat oczyszczony, z czynnikami Nod o stężeniu 10 <sup>-11</sup> M	141,3 ± 10,3 <sup>a</sup> (wzrost o 29,6%)*	5,9 ± 0,45 <sup>a</sup> (wzrost o 22,4%)*	0,28 ± 0,12 <sup>a</sup> (wzrost o 33,3%)*
Preparat nieoczyszczony o stężeniu 10 <sup>-11</sup> M	109 ± 18,2 <sup>b</sup>	4,82 ± 1,02 <sup>b</sup>	0,21 ± 0,15 <sup>b</sup>
Preparat oczyszczony, z czynnikami Nod o stężeniu 10 <sup>-12</sup> M	139,2 ± 12,7 <sup>a</sup> (wzrost o 35,4 %)*	6,47 ± 0,84 <sup>a</sup> (wzrost o 29,1%)*	0,39 ± 0,18 <sup>a</sup> (wzrost o 50,0%)*
Preparat nieoczyszczony o stężeniu 10 <sup>-12</sup> M	102,8 ± 21,3 <sup>b</sup>	5,01 ± 1,12 <sup>b</sup>	0,26 ± 0,17 <sup>b</sup>
Preparat oczyszczony, z czynnikami Nod o stężeniu 10 <sup>-13</sup> M	152,75 ± 26,9 <sup>a</sup> (wzrost o 60,3%)*	6,52 ± 1,62 <sup>a</sup> (wzrost o 49,5%)*	0,4 ± 0,26 <sup>a</sup> (wzrost o 60,0%)*
Preparat nieoczyszczony o stężeniu 10 <sup>-13</sup> M	95,3 ± 22,3 <sup>b</sup>	4,36 ± 0,74 <sup>b</sup>	0,25 ± 0,9 <sup>b</sup>
Preparat oczyszczony, z czynnikami Nod o stężeniu 10 <sup>-14</sup> M	128 ± 18,3 <sup>a</sup> (wzrost o 77,5%)*	6,15 ± 1,34 <sup>a</sup> (wzrost o 66,7%)*	0,32 ± 0,16 <sup>a</sup> (wzrost o 77,8%)*
Preparat nieoczyszczony o stężeniu 10 <sup>-14</sup> M	72,1 ± 26,3 <sup>b</sup>	3,69 ± 1,1 <sup>b</sup>	0,18 ± 0,62 <sup>b</sup>

Wartości są średnią ± SD z 30 roślin w każdej grupie. Wartości w tej samej kolumnie oznaczone różnymi literami różnią się w sposób statystycznie istotny (P<0,05) w teście Tukeya (ANOVA).