



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2010 00529

(22) Data de depozit: 16.06.2010

(41) Data publicării cererii:  
30.04.2012 BOPI nr. 4/2012

(71) Solicitant:  
• INSTITUTUL DE  
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU  
PROTECȚIA PLANTELOR,  
BD. ION IONESCU DE LA BRAD NR. 8,  
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:  
• OANCEA FLORIN, STR. PAȘCANI NR.5,  
BL.D7, SC.E, ET.2, AP.45, SECTOR 6,  
BUCUREȘTI, B, RO;

• OANA SICUIA, STR. VICINA NR.3, BL.33,  
SC.3, AP.153, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B,  
RO;  
• DINU SORINA, BD. ION IONESCU DE LA  
BRAD NR.8, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B,  
RO;  
• ZAMFIROPOL ROXANA, STR.NADEȘ  
NR.42 A, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;  
• CONSTANTINESCU FLORICA,  
STR. EMANOIL PORUMBARU NR. 67,  
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO

(54) **PROCEDEU DE CREȘTERE A NIVELULUI DE POLIAMINE  
DIN PLANTELE CULTIVATE ȘI PROCEDEU DE SELECȚIE A  
BACTERIILOR UTILIZABILE ÎN PROCEDEUL DE CREȘTERE  
A NIVELULUI DE POLIAMINE DIN PLANTE**

(57) Rezumat:

Prezenta invenție se referă la un procedeu de creștere a nivelului de poliamine din plantele cultivate, concomitent cu reducerea riscului fitosanitar asociat agenților fitopatogeni necrofili. Procedeu constă în cultivarea unei leguminoase de protecție pe timpul iernii, și transformarea acestei culturi verzi în mulci bioactiv, prin erbicidarea și tratarea cu bacterii antagoniste față de

agenții fitopatogeni necrofili, rezistente la erbicidele totale utilizate, și cu capacitate de eliberare a poliaminelor și a precursorilor acestora din materialul vegetal, însămânțarea și creșterea plantelor de cultură în mulci bioactiv.

Revendicări: 2

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



//

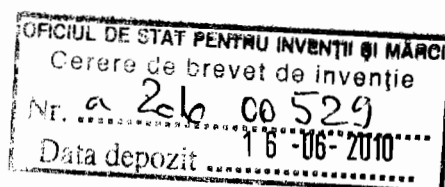
## PROCEDEU DE CREȘTERE A NIVELULUI DE POLIAMINE DIN PLANTELE CULTIVATE ȘI PROCEDEU DE SELECȚIE A BACTERIILOR UTILIZABILE ÎN PROCEDEUL DE CREȘTERE A NIVELULUI DE POLIAMINE DIN PLANTE

Prezenta invenție se referă la un procedeu de creștere a nivelului de poliamine din plantele cultivate și la un procedeu de selecție din izolate naturale a tulpinilor de bacterii sporulante gram pozitive utilizabile într-un astfel de procedeu de creștere a nivelului de poliamine din plante.

Sunt cunoscute mai multe procedee utilizate pentru a crește nivelul de poliamine din plante în scopul valorificării efectelor benefice ale acestor compuși policationici ubicuitari în țesuturile vegetale. Poliaminele (și în special spermidina) sunt esențiale pentru procesele fiziologice din plante implicate în creștere și dezvoltare (germinație, dezvoltarea mugurilor axilari, înflorire și fructificare). Un nivel ridicat de poliamine întârzie senescența și intensifică dezvoltarea pereților celulari vegetali. Poliaminele (și în special putresceina și spermina) se acumulează în țesuturile vegetale și ca o formă de rezistență la stres-uri abiotice (stres oxidativ, ioni de metale grele în exces, îngheț, secetă, stres salin / osmotic) și biotice (agenți fitopatogeni biotrofi și hemibiotrofi).

Unele procedee utilizează tehnici de modificare a genomului plantelor. De exemplu brevetul WO 01/11062 prezintă un procedeu de obținere a unor plante modificate genetic în care nivelul de poliamine este de 1,5 ori mai ridicat decât în plantele nemodificate genetic. Procedeu implică transformarea celulelor plantelor prin integrarea în genomul lor a unor secvențe, care codifică pentru enzime implicate în biosinteza poliaminelor, precum arginindecarboxilaza (ADC) sau ornitindecarboxilaza (ODC), asociate unui promotor puternic, și regenerarea unor plante transgenice din respectivele celulele vegetale. Cererea de brevet US 20080010702 descrie un procedeu de creștere a nivelului de poliamine din plante prin integrarea în genomul celular a unui vector incluzând o secvență care codifică pentru sperminsintaza exogenă.

Pentru că plantele modificate genetic au o acceptanță redusă în Uniunea Europeană au fost dezvoltate procedee alternative de creștere a nivelului poliaminelor din plante pentru îmbunătățirea răspunsului plantelor la cel puțin un tip de stres. Cererea de brevet de invenție FR 2 929 640 se referă la un procedeu de ameliorare a rezistenței plantelor la stres prin aplicarea unei compoziții pe bază de glucide (zaharoză) și poliamine (putresceină, care este precursorul metabolic al spermidinei și sperminei). Plantele astfel tratate prezintă o rezistență crescută la erbicidele triazinice și au deci capacitatea de a crește pe soluri contaminate cu reziduuri de erbicide triazinice. Aplicarea de



poliamine endogene într-o singură doză poate însă să determine reducerea ulterioară a nivelului de poliamine, datorită reducerii exprimării genelor implicate în biosinteza poliaminelor sau activării genelor de catabolizare a poliaminelor, ca urmare a fenomenelor de reglare metabolică prin feed-back din țesuturile vegetale.

Creșterea nivelului de poliamine din plante are o serie de efecte favorabile, dar determină și o creștere a sensibilității plantelor la agenții patogeni necrotrofi. Pentru a crește rezistența plantelor la fitopatogeni necrotrofi (mulți dintre acești fitopatogeni producători de micotoxine) au fost realizate procedee de reducere a nivelului de poliamine din plante. De exemplu brevetul WO 09/112505 revendică un procedeu de modificare a genomului plantelor pentru modularea / reducerea nivelului de poliamine (prin inhibarea sau reducerea exprimării genelor implicate în biosinteza poliaminelor) în vederea creșterii rezistenței la infecția spicului de cereale cu ciuperci din genul *Fusarium* producătoare de trichotecene.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este de a realiza un procedeu de creștere a nivelului de poliamine din plantele cultivate concomitent cu reducerea riscului fitosanitar asociat agenților fitopatogeni necrotrofi.

Procedeu de creștere a nivelului de poliamine din plantele cultivate este alcătuit din următoarele etape: însămânțare direct în miriște, din a doua jumătate a lunii august până în prima jumătate a lunii septembrie a unei culturi de mazăre de toamnă, *Pisum sativus* subsp. *arvense*, la o densitate de 70...75 semințe germinabile de mazăre/m<sup>2</sup> sau de mazărice de toamnă, *Vicia villosa* sau *Vicia panonica*, la o densitate de 120 ...140 boabe germinabile de mazărice/m<sup>2</sup>; întreținerea culturii de mazăre de toamnă sau de mazărice până la sfârșitul lunii martie / începutul lunii aprilie; transformarea culturii de mazăre sau de mazărice în mulci bioactiv prin tăvălugire și tratare cu 600 ... 700 litri/ha de suspensie care include un erbicid total pe bază de glifosat, aplicat în doză de 0,9 ... 1,2 kg s.a./ha sau glufosinat de amoniu, aplicat în doză de 0,5...0,7 kg s.a./ha și o suspensie de 10<sup>5</sup>/ml de bacterii gram pozitive sporulate care prezintă concomitent următoarele caracteristici: antagonism pentru agenții fitopatogeni necrotrofi, rezistență la glifosat sau glufosinat de amoniu, capacitate de eliberare de poliamine, și în special putresceină, din materialul vegetal de mazăre sau mazărice; însămânțarea unei culturi de floarea-soarelui la o densitate de 50 ... 55000 semințe germinabile/ha, direct în mulciul vegetal, la două săptămâni de la convertirea culturii de mazăre sau mazărice în mulci, prin folosirea unei mașini de semănat direct în miriște; întreținerea culturii de floarea-soarelui până la recoltare; alternativ însămânțarea unei culturi de



- utilizează culturi „verzi”, de protecție în timpul iernii, incluse în măsurile de agro-mediu, pentru care se aplică plăți compensatorii;
- asigură menținerea acoperită a cel puțin 30% din suprafața solului cu resturi vegetale, prin folosirea procedeelor tehnologice conservative de prelucrare a solului;
- asigură realizarea unui management durabil al buruienilor prin utilizarea mulciului vegetal.

Procedeul de selecție din izolate naturale a tulpinilor de bacterii utilizabile în procedeul de creștere a nivelului de poliamine din plantele cultivate are următoarele avantaje:

- asigură selecția unor tulpini bacteriene care au capacitate ridicată de colonizare a resturilor vegetale rezultate prin mulcirea culturilor "verzi", de protecție în timpul iernii, sub acțiunea erbicidelor totale, ca urmare a rezistenței față de erbicide și a capacității de a crește pe materialul vegetal la valori mici ale coeficientului de activitate a apei;
- permite selecția unor bacterii care stimulează germinația și dezvoltarea plantelor de cultură, datorită producerii de poliamine din materialul vegetal în curs de descompunere;
- conduce la selecția unor microorganisme care reduc riscul fitosanitar al agenților fitopatogeni necrotrofi datorită capacității ridicate de colonizare a resturilor vegetale și a antagonismului față de respectivii agenți fitopatogeni.

Se dau în continuare exemple de realizare a invenției.

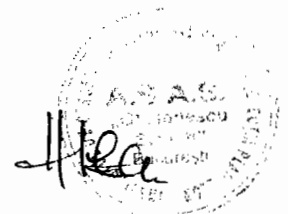
Exemplu 1. Se însămânțează direct în miriște, în a doua jumătate a lunii august, o cultură de mazăre de toamnă, *Pisum sativus* subsp. *arvense*. Se folosește o mașină de semănat direct în miriște și se seamănă la o densitate de 70...75 semințe germinabile de mazăre/m<sup>2</sup>, corespunzând unei cantități de 65...75 kg/ha. În cazul în care solul pe care se cultivă mazărea este un sol cu un nivel redus de rhizobii se procedează la inocularea cu rhizobii specifice, *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, 1 litru de suspensie cu 10<sup>9</sup> ufc/ml pentru 250 kg de sămânță. Cultura de mazăre se întreține conform tehnologiei uzuale până la sfârșitul lunii martie. Se transformă cultura de mazăre în mulci bioactiv prin tăvălugire și tratare cu 600 ... 700 litri/ha de suspensie care include un erbicid total pe bază de glifosat aplicat în doză de 0,7 ... 0,9 kg s.a./ha și o suspensie de 10<sup>5</sup>/ml de bacterii gram pozitive sporulate. Bacteriile pozitive gram sporulate prezintă concomitent următoarele caracteristici: antagonism pentru agenții fitopatogeni, rezistență la glifosat, capacitate de eliberare de poliamine, și în special putresceină, din materialul vegetal de mazăre. Selecția

16-06-2010

respectivelor bacterii se face în conformitate cu procedeul 3 descris mai jos. Se însămânțează o cultură de floarea-soarelui la o densitate de 50 ... 55000 semințe germinabile/ha, corespunzând unei cantități de sământă de 3, 5 ... 5 kg/ha, direct în mulciul vegetal, la două săptămâni de la convertirea culturii de mazăre în mulci bioactiv, prin folosirea unei mașini de semănat direct în miriște. Cultura de floarea-soarelui se întreține conform tehnologiei recomandate pentru zona de favorabilitate până la recoltare.

Exemplul 2. Se însămânțează direct în miriște, în prima jumătate a lunii septembrie, o cultură de mazărice de toamnă, *Vicia villosa* sau *Vicia panonica*. Se folosește o mașină de semănat direct în miriște, la o densitate de 120 ... 140 boabe germinabile de mazărice/m<sup>2</sup>, corespunzând unei cantități de 40...45 kg/ha. În cazul în care solul pe care se cultivă mazărea este un sol cu un nivel redus de rhizobii se procedează la inocularea cu rhizobii specifice, *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, 1 litru de suspensie cu 10<sup>9</sup> ufc/ml pentru 200 kg de sământă. Cultura de mazărice se întreține conform tehnologiei uzuale până la sfârșitul lunii martie. Se transformă cultura de mazăre în mulci bioactiv prin tăvălugire și tratare cu 600 ... 700 litri/ha de suspensie care include un erbicid total glufosinat de amoniu, aplicat în doză de 0,5...0,7 kg s.a./ha și o suspensie de 10<sup>5</sup> spori/ml de bacterii gram pozitive. Bacteriile pozitive gram sporulate prezintă concomitent următoarele caracteristici: antagonism pentru agenții fitopatogeni, rezistență la glufosinat de amoniu, capacitate de eliberare de poliamine, și în special putresceină, din materialul vegetal de mazăre. Selecția respectivelor bacterii se face în conformitate cu procedeul 3 descris mai jos. După 12...14 zile de la mulcire se însămânțează o cultură de porumb, hibrid semitimpuriu, la o densitate de 50 ... 55000 semințe germinabile/ha, prin folosirea unei mașini de semănat direct în miriște. Cultura de porumb se întreține conform tehnologiei recomandate pentru zona de favorabilitate până la recoltare.

Exemplu 3. Se izolează din sol conform procedurile cunoscute, bacterii sporulate gram pozitive. Se testează *in vitro* activitatea antagonistă a izolatelor față de diferiții agenți fitopatogeni necrotrofi cum ar fi: *Fusarium spp.*, *Alternaria spp.*, *Botrytis spp.*, *Sclerotinia sclerotiorum* și *Sclerotium bataticola* prin utilizarea tehnicii culturilor duble. Culturile de agenți fitopatogeni sunt înprospătate pe mediu CGA (cartof, glucoză, agar), iar culturile de bacterii pe mediu Luria-Bertani agarizat. Testarea activității antagoniste *in vitro* a izolatelor se efectuează pe mediul CGA repartizat în plăci Petri cu diametru de 9 cm. Plăcile Petri se însămânțează cu microorganismele test, se incubă la 28°C și se



analizează în ceea ce privește zona de inhibiție (mm) la 24, 48 și 72 ore. Se selectează tulpinile care determină zonă de inhibiție mai mare de 5 mm.

Izolatele de bacterii antagoniste față de fitopatogeni sunt testate apoi în ceea ce privește rezistență față de glifosat sau glufosinat de amoniu, prin determinarea efectului erbicidului asupra ratei respirației unei suspensii de spori. Se obține o suspensie de spori cu  $10^6$  ufc/ml prin tehnicile cunoscute, respectiv aplicarea unui șoc termic unui culturi de 12 ore, numărarea sporilor și apoi normalizarea numărului de ufc prin diluție cu mediu LB steril. Suspensia de spori se inoculează în 22,5 ml de mediu Luria Bertani lichid, care conținând glifosat, în concentrațiile micromolare de 4,4; 8,8; 17,6 sau 35,2 (corespunzând unor doze de 1,25; 2,5, 5, 10 l/ha, pentru produsul condiționat conținând 360 g/l, distribuit în 600 litri apă), sau glufosinat de amoniu în concentrațiile micromolare de 1,25, 2,5, 5 și 10 (corespunzând unor doze de 1; 2, 4, 8 l/ha, pentru produsul condiționat conținând 360 g/l, distribuit în 600 litri apă). Se incubă peste noapte și apoi se determină intensitatea respirației comparativ cu respirația aceleiași suspensii de spori inoculate pe mediul Luria Bertani fără adaos de erbicide. Se determină astfel izolatele care sunt rezistente la concentrațiile de erbicid din soluția aplicată pentru mulcire.

Aceste izolate, care sunt antagoniste și cu rezistență la glifosat, sunt apoi selectate din punct de vedere al capacității de a elibera poliamine din material vegetal de mazăre sau mazărice păroasă, în condiții de disponibilitate redusă a apei. Circa 10 kg de material vegetal proaspăt (de mazăre sau mazărice) se usucă și se macină. Pulberea rezultată se ambalează câte 10 g în pungi de polietilenă și se sterilizează prin iradiere gamma, la o doză de 25 kGy. Se aduc într-un Petri cu diametrul de 9 cm 2,5 g de material vegetal uscat, care se umeștează cu 2,5 ml de apă distilată sterilă. Placa Petri se deschide și se trece aseptice într-un exsicator steril, care are deșus pe fund cristale de azotat de potasiu. Materialul vegetal mărunțit se menține peste noapte în exsicator, pentru a se stabili la o disponibilitate a apei de 0,95  $a_w$ . Acest material vegetal se inoculează cu 1 ml suspensie  $10^5$  ufc/ml de spori și se incubă la temperatura camerei timp de 3 zile. După 3 zile materialul vegetal se trece cantitativ într-un Erlenmayer de 100 ml împreună cu 25 ml de acid percloric 5%. Se extrage timp de 4 ore prin agitare pe un agitator magnetic, după care se separă prin centrifugare. Din supernatant se reiau 0,1 ml, care se derivatizează prin dansilare. Într-o fiolă de reacție se aduc 0,1 ml de supernatant, 0,2 ml soluție saturată de carbonat de sodiu, 0,4 ml de clorură de dansil. Se incubă timp de 1 oră la 60°C, apoi se adaugă 0,1 ml soluție 20% prolină (pentru îndepărtarea excesului de clorură de dansil).



Poliminele dansilate se extrag în 0,5 ml de toluen, care se evaporă la sec și se reia în 0,1 ml metanol. Poliaminele dansilate sunt apoi separate și identificate prin cromatografie în strat subțire, folosind amestecuri cloroform - trietanolamină (9:1) și n-hexan- acetat de etil (2:1) și comparându-se cu valorile compușilor standard dansilați. Plăcile de siliciu sunt observate în lumină UV, iar spoturile selectate sunt trecute cantitativ de pe placă într-o eprubetă. Din silicagel se eluează poliaminele dansilate cu soluție de metanol-toluen (9:1). Fluorescența este măsurată prin spectrofluorimetrie, folosind lumină de excitare de 415 nm și lumină de emisie de 510 nm. Se lucrează față de un martor etalon, în care materialul vegetal este tratat cu apă și nu inoculat cu bacterii.

Tulpinilor de bacterii antagoniste *in vitro* pe medii agarizate, cu rezistență la erbicidele totale pe bază de glifosat și glufosinat amoniu, și cu capacitate de a elibera poliamine din materialul vegetal li se verifică activitatea antagonistă prin co-cultivarea bacteriilor cu agenți fitopatogeni necrotrofi pe substrat solid. Se testează antagonismul față de *Fusarium graminearum* Schw. DSMZ 4527 (teleomorfa *Gibberella zeae* Schw. Petch). Ciuperca toxigenă a fost cultivată pe mediu înclinat cartof – glucoză - agar. După 7 zile de creștere cultura a fost reluată în tampon fosfat salin, pH 7,2, adusă la  $10^6$  ufc/ml și inoculată (0,1 ml / g) peste 2,5 g paie de grâu sterilizate prin autoclavare și menținute la 0,95  $a_w$  prin expunere timp de 24 ore în exsicator față de azotat de potasiu. Anterior, concomitent sau ulterior tratamentului cu ciuperci *F. graminearum* au sunt aplicate și tulpinile bacteriene de testat. Exsicatoarele cu plăcile Petri pe care se află diferitele variante experimentale se incubă într-un ciclu de 12 ore la 30°C și iluminare cu lumină artificială și 12 ore la 18°C, la întuneric.

În final pentru tulpinile care prezintă antagonism față de *F. graminearum* în testul descris mai sus se verifică inocuitatea prin testul pe *Galleria melonella*. Larvele sunt crescute pe substrat de cultură, la 30°C. Substratul de creștere se obține după cum urmează. Se amestecă mălai 400 g, faină 200 g, târâte de grâu 200 g, drojdie uscata măcinată 100 g și lapte praf 200 g. La acest amestec pulverulent se adaugă 700 ml de amestec lichid, compus din 350 ml miere și 350 ml glicerină în care s-a dizolvat ceară de albine (1:1). Compoziția finală se omogenizează la mixer și se păstrează în cutie de plastic, la 4°C.

Larvele de vârstă a treia sunt păstrate la 4°C pe substratul de creștere menționat mai sus. Cu ajutorul unei seringi Hamilton de 5  $\mu$ l se injectează câte 5  $\mu$ l de suspensie bacteriană prin partea stânga a ultimului segment al larvelor. După injectare larvele sunt plasate în incubator, la întuneric, la 30°C, și se monitorizează mortalitatea.

În urma aplicării tehnicii de mai sus din 272 izolate de bacterii inițiale au fost selectate 2 tulpini de bacili gram pozitivi, 56.1s și Usa<sub>2</sub> care prezintă concomitent următoarele caracteristici: antagonism pentru agenții fitopatogeni, rezistență la glifosat și glufosinat de amoniu, capacitate de eliberare de poliamine, și în special putresceină, din materialul vegetal de leguminoase. Tulpinile 56.1s și Usa<sub>2</sub> au fost identificate pe baza unei taxonomii polifazice, respectiv a combinării caracterelor morfologice, cu cele fiziologice și cu cele moleculare. Tipizarea moleculară anterior efectuată a demonstrat faptul că cele două tulpinile de bacterii aparțin la genuri diferite. Coroborând datele morfologice, fiziologice și cu cele moleculare (secvența 16s rADN și profilul acizilor grași membranari) tulpina Usa<sub>2</sub> a fost încadrată ca aparținând speciei *Bacillus subtilis*, iar tulpina 56.1s, care a fost supusă și unei secvențieri totale a 16s rADN, a fost încadrată ca aparținând speciei *Brevibacillus laterosporus*.





**PROCEDEU DE CREȘTERE A NIVELULUI DE POLIAMINE DIN PLANTELE CULTIVATE ȘI PROCEDEU DE SELECȚIE A BACTERIILOR UTILIZABILE ÎN PROCEDEUL DE CREȘTERE A NIVELULUI DE POLIAMINE DIN PLANTE**

Revendicări

1. Procedeu de creștere a nivelului de poliamine din plantele cultivate caracterizat prin aceea că este alcătuit din următoarele etape: însămânțare direct în miriște, din a doua jumătate a lunii august până în prima jumătate a lunii septembrie a unei culturi de mazăre de toamnă, *Pisum sativus* subsp. *arvense*, la o densitate de 70...75 semințe germinabile de mazăre/m<sup>2</sup> sau de mazărice de toamnă, *Vicia villosa* sau *Vicia panonica*, la o densitate de 120 ...140 boabe germinabile de mazărice/m<sup>2</sup>; întreținerea culturii de mazăre de toamnă sau de mazărice până la sfârșitul lunii martie / începutul lunii aprilie; transformarea culturii de mazăre sau de mazărice în mulci bioactiv prin tăvălugire și tratare cu 600 ... 700 litri/ha de suspensie care include un erbicid total pe bază de glifosat, aplicat în doză de 0,9 ... 1,2 kg s.a./ha sau glufosinat de amoniu, aplicat în doză de 0,5...0,7 kg s.a./ha și o suspensie de 10<sup>5</sup>/ml de bacterii gram pozitive sporulate care prezintă concomitent următoarele caracteristici: antagonism pentru agenții fitopatogeni necrotrofi, rezistență la glifosat sau glufosinat de amoniu, capacitate de eliberare de poliamine, și în special putresceină, din materialul vegetal de mazăre sau mazărice; însămânțarea unei culturi de floarea-soarelui la o densitate de 50 ... 55000 semințe germinabile/ha, direct în mulciul vegetal, la două săptămâni de la convertirea culturii de mazăre în mulci, prin folosirea unei mașini de semănat direct în miriște; întreținerea culturii de floarea-soarelui până la recoltare; alternativ însămânțarea unei culturi de porumb, hibrid semi-timpuriu, la o densitate de 50 ... 55000 semințe germinabile/ha, după 12.. 14 zile de la mulcire; întreținerea în continuare a culturii de porumb și recoltarea ei, inclusiv a tulpinilor de porumb, până la mijlocul sau sfârșitul lunii septembrie.

2. Procedeu de selecție din izolate naturale a tulpinilor de bacterii utilizabile în procedeu conform revendicării 1 caracterizat prin aceea că este alcătuit din următoarele etape: selectarea izolatelor de bacterii antagoniste față de agenții fitopatogeni necrotrofi prin determinarea *in vitro* a antagonismului, tehnica culturilor duble pe mediu agarizat; selectarea dintre izolatele care au antagonism a celor care au rezistență față de glifosat sau glufosinat de amoniu, prin determinarea efectului erbicidului asupra ratei respirației unei suspensii de spori, obținută prin inocularea a 2,5 ml suspensie de spori cu 10<sup>6</sup> ufc/ml în 22,5 ml de mediu Luria Bertani lichid, conținând concentrații de glifosat sau glufosinat de amoniu echivalente concentrațiilor de erbicid din soluția aplicată pentru mulcire, și incubată peste noapte; selectarea



dintre izolatele de bacterii antagoniste față de fitopatogeni și cu rezistență la glifosat a celor care au capacitatea de a elibera poliamine din material vegetal de mazăre sau mazărice păroasă, în condiții de disponibilitate redusă a apei, prin determinarea prin cromatografie în strat subțire a poliaminelor produse din 2,5 g de material vegetal uscat și măcinat, menținut la 0,95 a<sub>w</sub>, inoculat cu 1 ml suspensie 10<sup>5</sup> ufc/ml de spori și incubat la temperatura camerei timp de 3 zile; verificarea activității antagoniste a tulpinilor selectate până la această etapă prin co-cultivarea bacteriilor cu agenți fitopatogeni necrotrofi pe substrat solid menținut la 0,95 a<sub>w</sub>, și într-un ciclu de 12 ore la 30°C și iluminare cu lumină artificială și 12 ore la 18°C, la întuneric; verificarea inocuității tulpinilor selectate prin testul pe *Galleria melonella*.