



(11) **RO 131177 B1**

(51) **Int.Cl.**
A01N 63/00 ^(2006.01);
C12N 1/14 ^(2006.01);
C12R 1/885 ^(2006.01)

(12) **BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. cerere: **a 2014 00936**

(22) Data de depozit: **02/12/2014**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **29/11/2018** BOPI nr. **11/2018**

(41) Data publicării cererii:
30/06/2016 BOPI nr. **6/2016**

(73) Titular:
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
CHIMIE ȘI PETROCHIMIE - ICECHIM,
SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR.202,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:
• **RĂUT IULIANA,
ALEEA BARAJUL BISTRIȚA NR. 12, BL.4,
ET.4, AP.54, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,
RO;**
• **OANCEA FLORIN, STR.PAȘCANI NR.5,
BL.D 7, SC.E, ET.2, AP.45, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;**

• **SESAN TATIANA EUGENIA,
BD.IULIU MANIU NR.55, BL.17, SC.E, ET.9,
AP.208, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **DONI MIHAELA, BD. CAMIL RESSU
NR. 4, BL. 5, SC. C, AP. 115, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **ARSENE MELANIA LILIANA, STR. COZLA
NR.8, BL.A7, SC.4, AP.49, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **JECU MARIA-LUIZA,
STR.PICTOR OCTAV BĂNCILĂ NR.8,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
**CN 103013838 A1; EP 1990404 B1;
US 8716001 B2**

(54) **TULPINĂ BIOSTIMULANTĂ DE *TRICHODERMA
ASPERELLUM* ȘI COMPOZIȚIE PE BAZĂ DE ACEASTA,
PENTRU UTILIZARE ÎN SISTEMELE DE AGRICULTURĂ
CONSERVATIVĂ**



RO 131177 B1

1 Prezenta invenție se referă la o tulpină de *Trichoderma asperellum* și la o compoziție
2 cu eliberare controlată realizată pe baza acestei tulpini, destinată utilizării în sistemele de
3 agricultură conservativă.

4 Sunt cunoscute diferite tulpini de *Trichoderma* care au acțiune de biostimulare a
5 plantelor de cultură. Astfel de tulpini de microorganisme reprezintă ingredientul activ pentru
6 o categorie emergentă de (bio)produse, utilizate ca inputuri în tehnologiile de cultură a
7 plantelor, biostimulanții pentru plante (a se vedea de exemplu review-ul Calvo et al. 2014,
8 Plant Soil, 383, 3-41). Biostimulanții pentru plante modulează procesele naturale „pentru a
9 spori absorbția și eficiența utilizării nutrienților, toleranța la stresurile abiotice și calitatea
10 recoltei” (www.biostimulants.eu). Biostimulanții pentru plante nu interacționează semnificativ
11 în mod direct cu agenții de dăunare ai culturilor agricole, dar cresc toleranța plantelor la
12 stresurile biotice induse de acești agenți, prin modularea răspunsului de apărare din plante.
13 Microorganismele biostimulante pentru plante reprezintă una din modalitățile de intensificare
14 durabilă a producției agricole în această perioadă de schimbări climatice (Sofo et al. 2014,
15 în Improvement of Crops in the Era of Climatic Changes, Ahmad et al. eds, Springer,
16 New York, pp 107-117).

17 Documentul **CN 103013838 A1** descrie o tulpină de *Trichoderma asperellum* GY20
18 și un produs ce conține ca ingrediente active micelii și clamidospori ai tulpinii. Acesta este
19 utilizat în biocontrolul ciupercii *Verticillium dahliae*, dăunătoare plantelor de căpșun, și nu
20 produce efecte negative asupra mediului, are o stabilitate la depozitare de 18 luni în condiții
21 de păstrare la temperatura camerei și de 3 ani în condiții de refrigerare. Produsul sub formă
22 de pastă conține: micelii și clamidospori ai tulpinii 94,999%, inhibitor ai ionilor de cupru
23 MDA-5 0,001% și amidon de cartof 5%.

24 Brevetul **EP 1990404 B1** protejează o tulpină de *Trichoderma atroviride* AGR2,
25 depusă la Colecția Națională de Culturi de Microorganisme (CNCM) a Institutului Pasteur sub
26 numărul 1-2738, și descrie o metodă de izolare a acesteia, o metodă de obținere a unui
27 produs pe baza acestei tulpini și utilizarea lui în scopul stimulării germinației plantelor. În
28 combinație cu alte fungicide chimice, produsul pe bază de *Trichoderma atroviride* AGR2 este
29 folosit și pentru combaterea unor ciuperci patogene plantelor de cultură.

30 Brevetul **US 8716001 B2** descrie utilizarea unor tulpini de *Trichoderma*, *Trichoderma*
31 *atroviride* WW10TC4 (număr de depozit ATCC PTA 9707), *Trichoderma harzianum* RR17Bc
32 (număr de depozit ATCC PTA 9708), *Trichoderma harzianum* F11 Bab (număr de depozit
33 ATCC PTA 9709), aplicate separat sau în combinații ale acestora, pentru: inducerea
34 rezistenței plantelor la stresuri biotice și abiotice; reducerea impactului negativ al azotului
35 în exces (emisii de protoxid de azot din sol, levigarea ionilor azotat în acvifer și ape de
36 suprafață) datorită creșterii eficienței de utilizare a azotului de către plante; mărirea cantității
37 de carbon sechestrat din atmosferă datorită intensificării proceselor de fotosinteză în plantele
38 a căror rizosferă este colonizată de respectivele tulpini.

39 Cererea de brevet **US 2012/0178624 A1** se referă la tulpina de *Trichoderma*
40 *harzianum* TSTh20-1, depozitată cu numărul PTA-10317 la American Type Culture
41 Collection (ATCC), care are capacitatea de a stimula creșterea plantelor, în condiții de stres
42 abiotic determinate de prezența hidrocarburilor aromatice policiclice, a acizilor naftenici și a
43 pH-ului ridicat, specifice sterilului rămas după extragerea țigăii greu din nisipurile
44 bituminoase.

45 Brevetul **FR 2903419 B1** protejează tulpina depozitată sub numărul MUCL 45632 la
46 Belgian Co-ordinated Collections of Micro-organisms (BCCM), care aparține speciei
47 *Trichoderma atroviride*, și care are acțiune de stimulare a germinației și creșterii plantelor.

RO 131177 B1

O recentă trecere în revistă a diferitelor tulpini de *Trichoderma* care stimulează creșterea plantelor a fost realizată de (Stewart și Hill în „*Biotechnology and Biology of Trichoderma*”, Gupta et al. eds, Elsevier, Amsterdam, 2014, pp. 415-428).

Nu au fost încă descrise tulpini de *Trichoderma* la care capacitatea de a produce compuși (i) care biodisponibilizează nutrienții și/sau stimulează creșterea și dezvoltarea plantelor, sau (ii) care modulează căile metabolice implicate în răspunsul plantelor la factorii de stres biotici și abiotici, să fie amplificată de: (a) compușii pe care plantele îi secretă ca exo-semnale de rizosferă, pentru a stimula formarea asociațiilor mutualiste, sau (b) compușii pe care rădăcinile plantelor îi secretă în condiții de deficit de nutrienți sau sub acțiunea factorilor de stres biotici și abiotici.

Tulpinile de *Trichoderma* la care activitatea de biostimulare a creșterii și dezvoltării plantelor este amplificată de prezența exo-semnalelor secretate de plante în rizosferă sunt foarte utile în sistemele de agricultură conservativă (CA). Aceste sisteme CA conservă resursele de mediu și reduc inputurile în tehnologiile agricole prin eliminarea/reducerea lucrărilor solului. În sistemele CA, afânarea și structurarea solului necesară germinării și dezvoltării culturilor agricole este realizată printr-o intensificare a activității biotei solului, favorizată de menținerea resturilor vegetale la suprafața solului. Acoperirea permanentă a solului este un principiu important al sistemelor de agricultură conservativă (CA) (a se vedea de exemplu site-ul FAO CA: <http://www.fao.org/ag/ca/1a.html>). Resturile vegetale care acoperă solul limitează evaporarea apei și facilitează infiltrarea acesteia, reduc eroziunea, ameliorează structura solului, cresc conținutul de materie organică și de carbon, și moderează temperatura solului în zonele calde (Fabrizzi et al. 2005, Soil Till. Res. 81: 57-69).

În pofida numeroaselor avantaje, sunt și o serie de efecte negative, cauzate de resturile vegetale care acoperă solul. Resturile de plante favorizează dezvoltarea agenților fitopatogeni din sol (Bockus și Shroyer 1998, Ann. Rev. Phytopath. 36: 485-500), inclusiv a celor devastanți, cum sunt de exemplu cei care produc fuzarioza spicului de grâu (Leplat et al. 2013, Agron. Sust. Develop., 33: 97-111). Deoarece reduc temperatura solului, resturile vegetale determină și întârzieri ale primelor fenofaze din ciclul de dezvoltare specific culturilor înființate în astfel de sisteme CA (Page et al. 2013, Austr. Plant Path., 42: 363-377).

Tulpinile de *Trichoderma*, cu activitate de stimulare a creșterii plantelor, ar compensa întârzierile primelor fenofaze din ciclul de dezvoltare al plantelor de cultură. O serie din compușii care stimulează creșterea plantelor, cum este de exemplu 6-n-pentil-6H-piran-2-ona (6-PP) (Vinale et al. 2008, Physiol. Mol. Plant Pathol. 72, 80-86), au și activitate de inhibarea a fungilor fitopatogeni din genul *Fusarium* (El-Hasan et al. 2007, J. Plant Diseases. Prot., 114, 62-68), deci tulpinile cu activitate biostimulantă aplicate pe resturile vegetale ar limita și dezvoltarea agenților fitopatogeni.

Majoritatea tulpinilor de *Trichoderma* produc cantități semnificative de enzime hidrolitice implicate în descompunerea și mineralizarea materialului vegetal. Acțiunea acestor enzime asupra materialului vegetal determină producerea de tipare moleculare asociate patogenilor/deteriorărilor (produse de respectivii patogeni), iar astfel de tipare moleculare, care sunt în general oligozaharide eliberate prin hidroliza lignocelulozei/peretelui celulelor vegetale (denumite și oligozaharine), induc răspunsul de apărare din plante (Boller și Felix, Ann. Rev. Plant Biol. 60, 379-406). Așadar, aplicarea pe resturile vegetale a tulpinilor de *Trichoderma* biostimulante, care au capacitatea de a produce compuși similari tiparelor moleculare asociate patogenilor/deteriorărilor, ar determina astfel și activarea răspunsului de apărare din plantele cultivate în resturile vegetale astfel tratate. Amplificarea acestor caracteristici benefice, sub acțiunea exo-semnalelor care indică disponibilitatea plantelor

RO 131177 B1

1 pentru realizarea unor asociații mutualiste cu microorganismele, inclusiv pentru
2 contracararea stresurilor biotice și abiotice, ar asigura o reglare fină a interacției dintre
3 tulpina biostimulantă de *Trichoderma* și plantele de cultură, favorizând formarea asociațiilor
4 mutualiste dintre respectiva tulpină și plantele tratate/sistemul radicular al acestora, în
5 condiții de beneficiu ridicat pentru plante.

6 Este cunoscută o tulpină de *Trichoderma pseudokoningii*, depozitată la Deutsche
7 Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) cu numărul de depozit DSM
8 23661, care este destinată sistemelor de agricultură conservativă. Tulpina, descrisă în
9 cererea de brevet **RO 127471 A2**, prezintă concomitent antagonism față de agenții
10 fitopatogeni din sol, capacitate ridicată de mineralizare a materialului vegetal și rezistență la
11 compușii biofumiganți eliberați din biomasă de crucifere, și este destinată în special
12 sistemelor CA care utilizează proprietățile de biofumigare ale culturilor de crucifere. Nu a fost
13 însă descrisă, pentru această tulpină, o amplificare a producerii de compuși, biostimulanți
14 și/sau cu activitate antagonistă, sub acțiunea exo-semnalelor secretate de plantele
15 cultivate/sistemul radicular al acestora.

16 Un exemplu de exo-semnale cu rol în formarea asociațiilor mutualiste sunt
17 strigolactonele, compuși secretați de plantele confruntate cu un deficit de fosfor, ca un
18 „strigăt de ajutor” în rizosferă (López-Ráez et al. 2011, Botany, 89: 513-522), pentru a
19 determina germinarea și dezvoltarea sporilor ciupercilor de micorize și pentru a forma
20 simbioze care solubilizează fosforul. Steinkellner et al. 2007 (Molecules, 12, 1290-1306) nu
21 au evidențiat ramificări hifale ale unei tulpini de *Trichoderma* sub acțiunea GR24, un analog
22 de strigolactone. Dar, în cazul ciupercilor microscopice asociate/benefice pentru plante, care
23 au și un stadiu saprofit de dezvoltare (cum sunt, de exemplu, tulpinile de *Trichoderma*), nu
24 este obligatoriu ca efectul exo-semnalelor de rizosferă să se reflecte în modificări
25 morfologice. Ciupercile de micoriză sunt obligat biotrofe, deci germinarea și dezvoltarea lor
26 ulterioară (inclusiv prin ramificări hifale) este determinată de prezența rădăcinilor plantelor
27 gazdă și a exo-semnalelor produse de acestea, și mai ales de acele exo-semnale care indică
28 un deficit/o situație pentru a cărei compensare/contracurare plantele sunt pregătite să
29 realizeze asociații mutualiste/simbiotice.

30 La aceste microorganisme obligat biotrofe pe sistemul radicular al plantelor gazdă,
31 exo-semnalele produse de sistemul radicular determină modificări morfologice, dar la
32 microorganismele benefice/asociate plantelor de cultură care au competență saprofită, exo-
33 semnalele au un rol chemo-atrăctant sau de inducere a unor caracteristici biochimice/
34 fiziologice (prin activarea unor gene care codifică caractere implicate în interacția cu
35 plantele).

36 În cazul unui alt microorganism benefic pentru plantele de cultură, *Pseudomonas*
37 *putida* KT2440, s-a demonstrat un efect chemoatrăctant și de favorizare a colonizării
38 rizosferei sub acțiunea benzoxazinoidelor (ca, de exemplu DIMBOA, 2,4-dihidroxi-7-metoxi-
39 2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-onă), compuși produși de graminee ca răspuns la diferitele forme
40 de stres (Neal et al. 2012, PLoS ONE 7, e35498). În cazul aceluiași bacterii benefice
41 plantelor, *P. putida* KT2440, s-a demonstrat o amplificare a expresiei genelor implicate în
42 colonizarea rizosferei și în stimularea plantelor, sub influența exo-semnalelor specifice
43 rizosferei plantelor (Fernández et al. 2013, Microb. Biotech., 6,307-313).

44 Problema tehnică pe care își propune să o rezolve invenția constă în biostimularea
45 creșterii și dezvoltării plantelor cultivate, inhibarea fungilor fitopatogeni și contracararea
stresului biotic și abiotic al acestora.

RO 131177 B1

Prezenta invenție descrie tulpina *Trichoderma asperellum* Td36b, depozitată sub numărul P(F) 001434 la National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms (NCAIM), Budapesta, care răspunde la unii compuși pe care plantele îi secretă ca exo-semnnele de rizosferă sau la analogi biomimetici ai acestora, prin amplificarea biosintezei unor compuși care biodisponibilizează nutrienți și/sau favorizează creșterea și dezvoltarea plantelor și/sau limitează dezvoltarea agenților fitopatogeni fungici, și prin eliberarea unor cantități mai mari de modulatori ai răspunsului plantelor la factorii de stres biotici și abiotici din materialul vegetal în curs de descompunere.

Compușii care biodisponibilizează nutrienți pentru plante, produși de tulpina *Trichoderma asperellum* Td36b, sunt sideroforii, compuși care chelatează fierul, și compușii care solubilizează fosforul anorganic. Producerea de siderofori este amplificată cu 75,6% în prezența GR24, un analog sintetic de strigolactone, în concentrație de 2×10^{-6} M, în mediul de cultivare a tulpinii Td36b. Producerea de compuși care solubilizează fosforul este amplificată cu 83,8% în prezența GR24, un analog sintetic de strigolactone, în concentrație de 5×10^{-6} M, în mediul de cultivare a tulpinii Td36b, și, respectiv, cu 62,3%, de prezența acidului gama-aminobutiric GABA, în concentrație de 2×10^{-6} M, în mediul de cultivare a tulpinii Td36b.

Compușii care au acțiune de stimulare a creșterii plantelor și de limitare a dezvoltării fungilor fitopatogeni, biosintetizați de tulpina *Trichoderma asperellum* Td36b sunt acidul harzianic și 6-n-pentil-6H-piran-2-onă (6-PP). Producerea acidului harzianic este amplificată cu 47,5% în prezența GR24, un analog sintetic de strigolactone, în concentrație de 5×10^{-6} M, în mediul de cultivare a tulpinii Td36b. Producerea de 6-PP este amplificată cu 37,5% în prezența GR24, un analog de strigolactone, în concentrație de 2×10^{-6} M, în mediul de cultivare a tulpinii Td36b, și, respectiv, cu 27,8%, de prezența DIMBOA, 2,4-dihidroxi-7-metoxi-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-onă, în concentrație de 2×10^{-6} M, în mediul de cultivare a tulpinii Td36b.

Compușii cu rol de modulatori ai căilor metabolice implicate în răspunsul plantelor la factorii de stres biotici și abiotici, eliberați de tulpina *T. asperellum* Td36b din materialul vegetal, sunt siliciul solubil și oligozaharinele. Eliberarea de siliciu solubil din paie de grâu, *Triticum aestivum*, este amplificată cu 97,6% în prezența GR24, un analog sintetic de strigolactone, în concentrație de 2×10^{-6} M, în mediul de cultivare a tulpinii Td36b. Eliberarea de oligozaharine din biomasă uscată de măzărache de toamnă, *Vicia villosa*, este amplificată cu 53,6% DIMBOA, 2,4-dihidroxi-7-metoxi-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-onă, în concentrație de 2×10^{-6} M, în mediul de cultivare a tulpinii Td36b, și, respectiv, cu 34,2%, de prezența acidului gama-aminobutiric GABA, în concentrație de 2×10^{-6} M, în mediul de cultivare a tulpinii Td36b.

Un alt scop al acestei invenții este de a prezenta o compoziție cu eliberare controlată care să favorizeze exprimarea acțiunii biostimulante a tulpinii *T. asperellum* Td36b sub influența exo-semnnelelor de rizosferă, și care să fie ușor de aplicat ca tratament al resturilor vegetale în sistemele de agricultură conservativă.

Compoziția cu eliberare controlată pe baza tulpinii *T. asperellum* Td50b rezultată este alcătuită din granule conținând 50 părți substrat epuizat de la cultivarea ciupercilor *Pleurotus*, 32 părți sare de potasiu a co-polimerului grefat amidon - poli (2 propenamidă co-acid 2-propenoic), 8 părți făină, 3,2 părți esteri etilici ai acizilor grași, 2,3 părți lecitină, 0,5 părți săpun de potasiu, 0,3 părți glicerol, 0,4 părți grăsimi nesaponificabile din ulei de rapiță, restul până la 100 părți apă, și minimum 10^6 ufc/g *T. asperellum* Td50b.

RO 131177 B1

1 Compoziția sub formă de granule se aplică ca tratament al resturilor vegetale, în doză
de 20 kg/ha, prin utilizarea echipamentelor de aplicare a produselor granulare, eventual
3 împreună cu 100...120 kg/ha fertilizanți radiculari de tip NPK 19-0-19, pentru a stimula
producerea de exo-semnale de tip strigolactone de către plantele cultivate în sisteme
5 conservative.

Invenția prezintă următoarele avantaje:

7 - permite o reglare fină a interacției dintre tulpina biostimulantă *T. asperellum* Td36b
și plantele de cultură, favorizând formarea asociațiilor mutualiste dintre această tulpină și
9 plantele tratate/sistemul radicular al acestora, în condiții de beneficiu ridicat pentru plante;

11 - reduce riscul fitosanitar determinat de prezența resturilor vegetale menținute la
suprafața solului în sistemele CA, prin aplicarea pe respectivele resturi vegetale a tulpinii
Td36b care produce compuși cu acțiune antifungică;

13 - elimină întârzierile în creșterea și dezvoltarea plantelor, rezultate ca urmare a
reducerii temperaturii solului acoperit de resturi vegetale, datorită acțiunii biostimulante a
15 tulpinii Td36b;

17 - asigură o colonizare uniformă și reproductibilă de către tulpina Td36b cu propagule
eliberate succesiv din compoziția conform prezentei invenții, datorită acumulării
preponderente în componenta hidrofobă a compoziției a 6-pentil-pironei, compus volatil,
19 produs de populația provenită din primul val eliberat, deja dezvoltată în substrat, care este
fungistatic și pentru propagulele aceleași tulpini;

21 - stimulează exprimarea activității chitinolitice a tulpinii Td36b, datorită prezenței
chitinei în substrat epuizat de la cultivarea ciupercilor *Pleurotus*, utilizat în compoziția de
23 formulare a respectivei tulpini;

25 - stabilizează resturile vegetale prin reticulare cu co-polimerul grefat
amidon/poliacrilamidă - poliacrilat, denumit științific sare de potasiu a co-polimerului grefat
amidon - poli (2 propenamidă co-acid 2-propenoic acid), co-polimer cu caracteristici de agent
27 de fixare;

29 - accelerează descompunerea resturilor vegetale datorită creșterii activității apei în
resturile vegetale sub acțiunea co-polimerului super-adsorbant amidon/poliacrilamidă -
poliacrilat.

31 În continuare, se prezintă exemple de realizare a invenției.

Exemplul 1

33 Tulpina *Trichoderma asperellum* Td36b, depozitată sub numărul P(F) 001434 la
National Collection of Agricultural and Industrial Microorganism (NCAIM), Budapesta, a fost
35 izolată din litiera solului, prelevată din zona Păulești, Prahova, România. Pentru izolare s-a
utilizat mediul de cultură apă-agar, iar pentru purificare mediul cartof, glucoză, agar (CGA).

37 Raza coloniilor dezvoltate de tulpina *T. asperellum* Td36b, pe mediu CGA după 72 h,
la 30°C este de (7-)-54(-64) mm; la 35°C este de (0-)-27(-42) mm, iar la 40°C: 0 mm. Coloniile
39 formate pe mediu CGA la 25°C, după 40 h în întuneric, nu prezintă niciun pigment galben
care să difuzeze în mediul agarizat. Coloniile cultivate pentru 72 h pe mediu CGA, la 30°C,
41 în întuneric, formează până la 5 inele concentrice, cu o producție densă de conidii și fără
miceliu aerian. Conidiile sunt înspre centru de culoare verde închisă, iar înspre margini sunt
43 doar în curs de formare. Conidiile formate sunt verde închis, globuloase până la sub-
globuloase sau ovoidale, cu dimensiuni de 4,0-5,0(-6,0) x 2,5-3,0 μm. Conidioforii au un
45 aspect simetric care se termină în două sau mai multe fialide, cu ramificări primare apărute
lângă apex, frecvent împerecheate și proiectate la aproape 90° față de axa principală.
47 Clamidosporii se formează abundent după incubare o săptămână la 20°C în întuneric,
terminal și uneori intercalați, pe hifele imersate, fiind subglobuloși până la ovoidali, netezi,
49 verzi pal. Fialidele sunt tipic produse în vârfurile ramificațiilor primare, secundare și terțiare,
rareori direct pe lungimea ramificațiilor, tipic în verticiliu de 2 până la 4 fialide.

RO 131177 B1

Caracteristicile fiziologice de utilizare a diferitelor substraturi, sunt descrise în cele ce urmează. Monozaharidele determină o creștere mai bună decât dizaharidele, urmate de polizaharide. Glicerina este puțin favorabilă pentru creșterea tulpinii Td36b. Dintre monozaharide, riboza și fructoza s-au dovedit cele mai bune surse de carbon, observându-se o dezvoltare optimă a tulpinii pe mediile care conțin aceste surse de carbon. Urmează glucoza, manita, D-manoza, D-galactoza și arabinoza, care permit o dezvoltare moderată. Dintre dizaharide, cele mai bune rezultate a dat maltoza, urmată de lactoză (dezvoltare moderată) și zaharoză (dezvoltare mai slabă). Dintre polizaharide, cele mai bune rezultate a dat celuloza, cu dezvoltare optimă, urmată de amidon, pe mediile respective înregistrându-se dezvoltare moderată. Sporularea a fost foarte bună în majoritatea variantelor (+++), bună în cazul zaharozii (++) și mai slabă în cazul glicerinei (+).

Peptona, aminoacizii L-asparagină, L-valină, L-serină, L-cisteină și L-izoleucină. $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ și NaNO_2 s-au dovedit cele mai bune surse de azot, determinând o dezvoltare optimă. Urmează în ordine descrescătoare azotații (NH_4NO_3), vitamina B_{12} și aminoacizii L-alanină, L-lizină, L-arginină, L-triptofan care au determinat o dezvoltare moderată. Rezultate mai slabe au avut ureea, NH_4Cl , KNO_3 , KNO_2 . Sporularea a fost foarte bună (+++) în majoritatea variantelor, exceptând L-lizina, L-triptofanul, L-alanina, L-arginina și azotații, la care sporularea a fost doar bună (++)

Temperaturile de creștere a tulpinii *T. asperelum* Td36b sunt: temperatura optimă: 22...25°C; temperatura minimă: 2°C; temperatură maximă: 37°C. Temperaturile între 10 și 18°C determină o creștere slabă, fără sporulare la 48 h și cu sporulare slabă la 144 h (+). Reacția substratului de cultură: pH optim: 4,0...5,5; dezvoltare slabă a ciupercii la valori de pH de la 9,0 la 13,0.

Identificarea realizată pe criterii morfologice a fost confirmată de analiza moleculară a ITS1 (internal transcribed spacers 1) a clusterului pentru gena rRNA (marker universal fungal BarCode, <http://www.isth.info>). S-au folosit primerii specifici ITS1 SR6R f și LR1 r (conform protocol BarCode <http://www.isth.info/methods>). Compararea secvențelor s-a realizat cu programul TrichoBlast (<http://www.isth.info/tools/blast/index.php>).

Tulpina a fost inițial selectată pentru activitatea puternic antagonistă față de numeroși fungi fitopatogeni. S-a procedat inițial la verificarea implicării producerii compușilor volatili din categoria 6-n-pentil-6H-piran-2-one (6-PP) în antagonismul față de fungi fitopatogeni. Tulpina *Trichoderma asperelium* Td36b a fost testată împreună cu tulpina *Trichoderma atroviride* ATCC 74058, la care s-a dovedit producerea de 6-PP (Stoppacher et al. 2010, J. Microb. Meth. 81, 187-193). Antagonismul tulpinilor s-a testat față de următorii agenți fitopatogeni: *Fusarium graminearum*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Verticillium daliae*. Mediul de cultură folosit a fost CGA, cu următoarea compoziție (g/l): decoct de cartof 250 g, glucoză 20 g, agar 18 g. Mediul agarizat a fost distribuit aseptice în plăci Petri Ø 9 cm. Plăcile au fost inoculate central cu un fragment de cultură de 5 mm din cele două tulpini de *Trichoderma* testate. Plăcile au fost acoperite cu folie de plastic sterilă, permeabilă la gaze (Breathe-Easy™ sealing membrane - Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SUA). Plăcile Petri inoculate au fost incubate 3 zile la 28°C. În paralel au fost inoculate plăcile cu fitopatogenii test. Plăcile inoculate cu tulpinile de *Trichoderma* au fost suprapuse peste plăcile inoculate cu fitopatogenii test. Între cele două plăci a fost menținută folia sterilă care permite schimbul de gaze. Plăcile au fost incubate 5 zile la 28°C. Experimente au fost realizate în triplicat. Activitatea de inhibare a izolatelor de *Trichoderma* s-a determinat comparativ o cultură martor din fiecare agent fitopatogen, nesupusă acțiunii compușilor

RO 131177 B1

1 volatili produși de culturile tulpinilor de *Trichoderma*. Activitatea antagonistă a fost
determinată folosind formula:

$$3 \quad \% I \text{ (inhibare)} = M - T/M \times 100 \quad [1]$$

5 în care:

M = diametrul culturii agentului fitopatogen în cultura martor, nesupusă acțiunii
7 compușilor volatili produși de culturile tulpinilor de *Trichoderma*.

T = diametrul culturii agentului fitopatogen în culturile supuse compușilor volatili
9 produși de culturile tulpinilor de *Trichoderma*.

11 Rezultatele privind evaluarea activității antagoniste sunt prezentate în tabelul 1 de
mai jos. Tulpina de *T. asperellum* Td36b prezintă o activitate de inhibare prin compuși volatili
13 similară cu tulpina *T. atroviride* ATCC 74058, la care s-a dovedit producerea de 6-PP,
compus volatil cu activitate antifungică și de stimulare a dezvoltării plantelor.

15 *Tabelul 1*

17 *Inhibare agenților fitopatogeni de compușii volatili produși
de tulpinile de Trichoderma testate*

19 Agent fitopatogen	Tulpina antagonistă	Inhibare (%)	Producere compuși volatili
21 <i>Fusarium graminearum</i>	<i>T. asperellum</i> Td36b	40,0	+
	<i>T. atroviride</i> ATCC 74058	45,0	+
23 <i>Rhizoctonia solani</i>	<i>T. asperellum</i> Td36b	40,0	+
	<i>T. atroviride</i> ATCC 74058	40,0	+
25 <i>Pythium ultimum</i>	<i>T. asperellum</i> Td36b	37,5	+
	<i>T. atroviride</i> ATCC 74058	37,5	+
27 <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	<i>T. asperellum</i> Td36b	0	-
	<i>T. atroviride</i> ATCC 74058	0	-
29 <i>Verticillium daliae</i>	<i>T. asperellum</i> Td36b	73,9	+
	<i>T. atroviride</i> ATCC 74058	73,9	+
31 <i>Botrytis allii</i>	<i>T. asperellum</i> Td36b	85,0	+
	<i>T. atroviride</i> ATCC 74058	87,5	+

33 S-a determinat și capacitatea tulpinii Td36b de a produce și acumula 6-PP. Tulpinile
Td36b și ATCC 74058 au fost cultivate pe mediu lichid cartof-glucoză, în condiții staționare,
35 fără agitare, timp de 5 zile, la 25°C. După 5 zile, miceliul format a fost omogenizat cu mediul
de cultură cu un blender de laborator (Waring®, Laboratory Blender, Fischer Scientific,
37 Waltham, MA, SUA). Cantitatea de biomasă din omogenat a fost determinată gravimetric,
după filtrare pe hârtie Whatman nr. 1 și uscare la 110°C. Omogenatul a fost extras repetat
39 cu clorură de metilen. Fraakțiile inferioare s-au reunit, au fost uscate pe sulfat de sodiu
anhidru, concentrate la sec și reluate în 0,1 ml clorură de metilen. Determinarea 6-PP a fost
41 făcută gaz-cromatografic, cu detector spectrometru de masă. S-a folosit un gaz-cromatograf
Agilent 700, echipat cu spectrometru de masă quadrupol (Agilent, Santa Clara, CA, SUA).
43 6-PP a fost separată pe o coloană DB-5 (diametru interior 0,32 mm, lungime 30 m, grosimea
filmului 0,25 μm). S-a aplicat 1 μl de probă în modul split, cu un raport de spliare de 1:100.
45 Coloana a fost menținută la 40°C pentru 2 min, urmată de o creștere de 20°C/min până la
120°C, care a fost menținută pentru 2 min, și apoi la 210°C cu 10°C/min. Temperatura
47 detectorului și a injectorului a fost de 250°C. S-a folosit heliul ca gaz purtător, cu un debit de
1,2 ml/min. Pentru cuantificare s-a realizat o curbă etalon folosind 6-PP pură (Sigma-Aldrich).

RO 131177 B1

Cantitatea determinată de 6-PP a fost raportată la volumul de mediu de cultură și la cantitatea de biomasă uscată determinată gravimetric din respectivul mediu de cultură. S-a lucrat în triplicat. Rezultatele sunt prezentate în tabelul 2, ca medii ale celor trei repetiții, comparativ cu date raportate pentru alte tulpini de *Trichoderma* cultivate pe medii lichide. Aceste rezultate susțin capacitatea tulpinii Td36b de a sintetiza cantități semnificative de 6-PP.

Tabelul 2

Randamentul de sinteză al 6-pentil- α -pironei de către tulpinile testate, comparativ cu cel raportat pentru alte tulpini cultivate pe medii lichide

Tulpina	Condiții de creștere	Concentrația finală	Referința
<i>T. asperellum</i> Td36b	Mediu cartof-glucoză, 25°C, 5 zile	388 mg/l 84,12 mg/h	Prezentul exemplu
<i>T. atroviride</i> ATCC 74058	Mediu cartof-glucoză, 25°C, 5 zile	242 mg/l 67,55 mg/g	Prezentul exemplu
<i>T. harzianum</i> IMI 206040	Mediu extract de malț-glucoză, 29°C, 5 zile	182 mg/l 60,67 mg/g	Serrano-Carreón et al., 20041
<i>T. harzianum</i> , tulpina Indiană	Mediu cartof-glucoză, 30°C, 5 zile	455 mg/l 98,91 mg/g	Kalyani et al., 20002
<i>T. konigii</i> 7a, IMI 308475	Mediu cartof-glucoză, 20°C, 7 zile	145	Simon et al., 19883

1 - Serrano-Carreón et al., 2004, Biotechnol. Lett., 26:1403-1406

2 - Kalyani et al., 2000, Appl. Microbiol. Biotechnol., 53:610-612

3 - Simon et al., 1988, Soil Biol. Biochem., 20:263-264

Printr-o altă serie de experimente, s-a urmărit biotestarea efectului stimulator a 5 tulpini de *Trichoderma*, inclusiv Td36b, asupra creșterii unor plante test de tomate. Fiecare tulpină a reprezentat o variantă experimentală. S-a realizat pentru comparare și o variantă martor. Fiecare variantă experimentală a fost realizată în 4 repetiții, fiecare repetiție având 5 plante. Tulpinile de *Trichoderma* au fost cultivate pe mediu cu extract de malț lichid, la 25°C, aerat și agitat la 50 rpm timp de 48 h.

Semințele de tomate au fost dezinfectate în două etape. Prima dezinfecție a fost realizată în etanol 70%, timp de 30 s cu agitare la 60 rpm. După înlăturarea etanolului, semințele au fost clătite de trei ori cu apă distilată sterilă. Cea de-a doua dezinfecție s-a făcut cu soluție de hipoclorit de sodiu 4%, timp de 15 min. Ulterior au fost realizate clătiri cu apă distilată, din 25 în 25 de min, timp de 2 h. Semințele au fost inoculate prin imersie în 3 ml suspensie de propagule fungice, în concentrație de 10⁶ ufc/ml în tampon fosfat cu 2% carboxi-metil-celuloză, și apoi au fost depuse în pungă sterile de creștere Cyg (Mega International, Newport, MN, SUA). Pe toată durata experimentului pungile au fost umectate zilnic cu o soluție nutritivă Hoagland 0,25%. Creșterea rădăcinuțelor plantulelor de tomate a fost analizată la 3 săptămâni (tabelul 3).

Tabelul 3

Lungimea totală (mm) a rădăcinuțelor plantulelor de tomate la 3 săptămâni de la semănat

Varianta	Lungimea totală a rădăcinii (mm)	
Martor neinoculat	184,29	b
<i>T. atroviride</i> ATCC 74058	219,05	a

Varianta	Lungimea totală a rădăcinii (mm)	
<i>T. asperellum</i> T47	187,5	b
<i>T. viride</i> T49	200,86	ab
<i>T. harzianum</i> Td50b	214,38	a
<i>T. asperellum</i> Td36b	225,79	a

Rezultatele au evidențiat că tulpina Td36b determină creșteri distinct semnificative ale rădăcinuțelor plantulelor test de tomate, comparativ cu martorul neinoculat. Această capacitate de stimulare poate fi datorată producerii de compuși volatili de tipul 6-PP, dar pot fi implicate și alte mecanisme, ca de exemplu producerea de siderofori, compuși cu masă moleculară mică care au rolul de a crește biodisponibilitatea ionilor fierici (Fe^{3+}) prin complexare (Hider și Kong, 2010, Nat. Prod. Rep. 27, 637-657), sau producerea de compuși care solubilizează/cresc biodisponibilitatea/mobilitatea fosforului.

S-a procedat la detectarea capacității tulpinii Td36b de a produce siderofori. Pentru detectarea producerii de siderofori s-a folosit ca mediu detector un mediu agarizat cu indicatori de complexare (CAS blue agar) preparat din trei soluții: Soluția 1, de 0,06 g Chrome azuroil S (CAS) în 50 ml de apă dublu distilată în instalație de cuarț; Soluția 2, 0,027 g of $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ în 100 ml de HCl 10 mM HCl; Soluția 3, 0,073 g bromură de hexadeciltrimetilamoniu (HDTMA) în 40 ml de apă dublu distilată. S-a amestecat soluția 1 cu 10 ml de soluție 2 și apoi a fost adăugată soluția 3. S-a sterilizat prin autoclavare la 121°C timp de 15 min, obținându-se o soluție de complecși de fier de culoare albastră. 32,24 g acid N-2-etansulfonic-N-2-hidroxietyl-piperazina (PIPES) au fost dizolvați în 850 ml apă dublu distilată a cărei pH a fost adus la o valoare mai mare de 6. S-a amestecat și pH-ul a fost adus la valoarea 6,8 prin adăugare de soluție NaOH 0,1 M. Au fost adăugate și 15 g agar. S-a autoclavat și s-a răcit la 50°C. Cei 100 ml de soluție de complecși de fier, aduși la aceeași temperatură, au fost adăugați, aseptice și cu încetul, prin scurgere pe peretele vasului de sticlă și sub agitare, peste mediul cu PIPES agarizat și sterilizat. Reactivii folosiți pentru prepararea mediului detector CAS blue agar au provenit de la Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, SUA).

În plăci Petri Ø 9 cm a fost distribuit mediul extract de malț-agar (MEA). Jumătate din mediul MEA a fost decupată și înlăturată aseptice. Spațiul astfel eliberat a fost înlocuit cu mediu agarizat detector preparat ca mai sus (CAS blue agar). Jumătatea cu mediul MEA a fost inoculată cu tulpina Td36b. După incubare timp de 6 zile la 25°C, s-a constatat modificarea culorii mediului din albastru în portocaliu, ceea ce reprezintă o dovadă a producerii de siderofori.

Tulpina Td36b a fost cultivată pe mediu lichid pentru a se stabili capacitatea ei de a produce acid harzianic, siderofor care stimulează creșterea și dezvoltarea plantelor și are, de asemenea, și un efect anti-fungic (Vinale et al. 2009, J. Nat. Prod. 72, 2032-2035). A fost preparat un decoct de cartofi, prin fierberea a 200 g de cartofi, spălați bine de resturile de pământ, dar necoșiți, și tăiați în cuburi cu latura de aproximativ 1 cm, în aproximativ 1 l de apă distilată, pentru 30 min. S-a filtrat decoctul prin pânză de tifon dublă și au fost adăugate 20 g de glucoza (Sigma-Aldrich). Mediul a fost adus la 1000 ml cu apă distilată, a fost sterilizat prin autoclavare timp de 20 min la 121°C, și s-a distribuit în flacoane conice de 5 l.

RO 131177 B1

Mediul lichid cartof-glucoză a fost inoculat cu 50 ml conținând 10^8 ufc/ml propagule din tulpina Td36b. Cultura a fost menținută în condiții staționare timp de 21 zile la 25°C . După 21 zile, mediul de cultură s-a filtrat prin hârtie de filtru (Whatman No. 4, Brentford, UK).

Mediul de cultură filtrat a fost acidificat la pH 4 cu o soluție 5 N HCl, și extras repetat cu acetat de etil (Merck Millipore, Billerica, MA, SUA). Frajeciile organice au fost evaporate la vacuum la 35°C și uscate pe sulfat de sodiu anhidru (Sigma Aldrich). Reziduul roșu a fost recuperat în cloroform (Merck Millipore) și extras de trei ori cu o soluție 2 N NaOH. Din extractul alcalin a fost precipitată o fracție acidă care conținea acid harzianic, prin tratare cu HCl 2 N. În fracția acidă a fost determinat conținutul de acid harzianic folosind metoda descrisă de Vinale et al. 2014, *Molecules*, 19, 9760-9772. S-a detectat producerea a 127 mg acid harzianic la 1 l de mediu lichid cartof-glucoză, incubat timp de 21 zile. Această cantitate este la un nivel apropiat de cel determinat în cazul tulpinii *Trichoderma harzianum* M10, tulpină la care a fost pusă în evidență pentru prima oară producerea de acid harzianic (Vinale et al. 2009, *J. Nat. Prod.* 72, 2032-2035).

Pentru detectarea producerii de compuși care solubilizează fosforul, a fost folosit un mediu care conține la 1 l: glucoză 10 g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,5 g; NaCl 0,2 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1 g; KCl 0,2 g; extract de drojdie 0,5 g; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,002 g și $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,002 g (reactivi proveniți de la Merck Millipore). În acest mediu au fost adăugate și 5 g de hidroxiapatită, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (Sigma). Mediul s-a sterilizat prin autoclavare (121°C , timp de 20 min), a fost răcit și distribuit în plăci Petri \varnothing 9 cm. Plăcile au fost inoculate cu tulpina Td36b și incubate timp de 5 zile la 25°C . După 5 zile, s-a constatat apariția unor zone de liză în jurul coloniilor de *T. asperellum* Td36b, ceea ce demonstrează producerea de compuși care solubilizează fosforul.

Pentru evidențierea capacității de degradare a materialului vegetal s-a realizat un experiment prin care s-a urmărit consumul de oxigen și eliberarea diferiților compuși din material vegetal tratat cu tulpina de *T. asperellum* Td36b, comparativ cu tulpina *T. harzianum* Td50b, care are o capacitate ridicată de degradare a materialului vegetal. Materialul vegetal (tulpini de grâu tocate și uscate) a fost măcinat și trecut pe sita de 0,250 mm. S-au ambalat câte 10 g de pulbere care s-au sterilizat prin iradiere gamma (la IRASM, IFN-HH, București, România). Din pulberea sterilizată s-au luat aseptice câte 0,1 g de pulbere de material vegetal, care s-au adus într-un Erlenmayer de 50 ml, steril. Peste pulberea fin măcinată s-au adăugat aseptice 19 ml tampon fosfat steril. S-a omogenizat prin agitare și s-a inoculat apoi cu 1 ml suspensie microbiană, normalizată la 10^8 ufc/ml propagule. S-a menținut la agitator timp de 24 h, la temperatura de 28°C , după care s-a trecut aseptice într-un vas de respirație Strathox (Strathkelvin Instruments Limited, Glasgow, Marea Britanie). Au fost efectuate determinări de respirație/producere de bioxid de carbon timp de 12 h. După efectuarea determinărilor de respirație, s-au separat prin filtrare supernatantele, în care s-a determinat Carbonul Organic Total (TOC) cu un aparat Formacs HT (Skalar Analytical B.V., Breda Olanda), glucidele reducătoare (cu reactiv DNS) și fosforul solubil total (cu molibdat de amoniu și reactiv clorostanic). S-a lucrat comparativ cu un martor ne-inoculat.

Rezultatele sunt prezentate în tabelul 4. Aceste rezultate demonstrează o activitate de mineralizare a materialului vegetal foarte ridicată pentru tulpina Td36b.

Activitatea de degradare a materialului vegetal de către tulpinile de microorganisme testate*

Tulpina	Respirație (mg/l O ₂ consumați, medie orară)	Conținut de carbon organic total în supernatant (mcg/l)	Glucide solubile (mcg/l)	Fosfor solubil (mcg/l)
Martor neinoculat	0,02 ± 0,01c	0,24 ± 0,02c	1,67 ± 0,06c	0,02 ± 0,01c
<i>T. asperellum</i> Td36b	2,44 ± 0,14a	7,84 ± 1,25a	29,64 ± 4,81a	35,14 ± 5,72a
<i>T. harzianum</i> Td50b	1,72 ± 0,16b	4,84 ± 1,85b	16,72 ± 0,74b	15,42 ± 2,23b

Exemplul 2

A fost testată influența unor compuși secretați de rădăcinile plantelor, în condiții de deficit de nutrienți sau sub acțiunea factorilor de stres biotici și abiotici și/sau cu rol de exo-semnale pentru a stimula formarea asociațiilor mutualiste asupra caracteristicilor tulpinii Td36b referitoare la producerea compușilor care biodisponibilizează nutrienți pentru plante, respectiv sideroforii și compușii care solubilizează fosforul anorganic.

Tulpina Td36 a fost cultivată pe mediu lichid cartof-glucoză preparat ca în exemplul 1, în prezența și în absența GR24 - (3aR*,8bS*,E)-3-(((R*)-4-metil-5-oxo-2,5-dihidrofura-2-iloxi)metilen)-3,3a,4,8b-tetrahidro-2H-indeno [1,2-b]furan-2-onă (Chiralix, Nijmegen, Olanda), un analog de strigolactone. Strigolactonele sunt compuși secretați de plantele confruntate cu un deficit de fosfor, ca un „strigăt de ajutor” în rizosferă (López-Ráez et al. 2011, Botany, 89, 513-522), pentru a favoriza formarea asociațiilor mutualiste cu microorganismele care solubilizează fosforul. GR24 a fost introdus într-o concentrație finală de 2×10^{-6} M, în mediul de cultivare a tulpinii Td36b. Producerea de siderofori de către tulpina Td36b, în prezență și în absența GR24, în mediu cartof-glucoză incubat timp de 6 zile la temperatura de 25°C a fost determinată cu reactiv CAS (Schwyn și Neilands, 1987, Anal. Biochem., 160, 47-56). Producerea de siderofori este amplificată cu 75,6% în prezența GR24, un analog sintetic de strigolactone, în concentrație de 2×10^{-6} M, în mediul de cultivare a tulpinii Td36b.

Pentru determinarea influenței prezenței unor compuși cu rol de exo-semnale de rizosferă asupra capacității de solubilizare a fosforului s-a utilizat un mediu care conține: glucoză 10 g; (NH₄)₂SO₄ 0,5 g; NaCl 0,2 g; MgSO₄ · 7H₂O, 0,1 g; KCl 0,2 g; extract de drojdie 0,5 g; MnSO₄ · H₂O 0,002 g și FeSO₄ · 7H₂O 0,002 g (reactivi proveniți de la Merck Millipore). Mediul a fost suplimentat cu 5 g de hidroxiapatită, Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂ (Sigma), omogenizat și distribuit câte 100 ml în Erlenmeyere de 500 ml. Erlenmeyerele astupate cu dop de vată au fost sterilizate prin autoclavare la 121°C, timp de 20 min și răcite. În probele în care s-a testat influența compușilor cu rol de semnale de rizosferă s-au introdus GR24 (Chiralix), un analog sintetic de strigolactone, în concentrație de 5×10^{-6} M, și, respectiv, acid gama-aminobutiric (GABA) (Sigma-Aldrich), în concentrație de 2×10^{-6} M. Erlenmeyerele au fost inoculate cu tulpina Td36 și incubate timp de 5 zile la temperatura de 25°C. După terminarea perioadei de incubare, s-au prelevat probe din mediile de cultură, s-au clarificat prin ultrafiltrare, iar în supernatant a fost determinat nivelul fosforului solubil prin utilizarea metodei cu reactiv fosfomolibdenic (Murphy și Riley, 1962, Anal. Chim. Acta 27, 31-36.).

Producerea de compuși care solubilizează fosforul este amplificată cu 83,8% în prezența GR24, un analog sintetic de strigolactone, în concentrație de 5×10^{-6} M, în mediul de cultivare a tulpinii Td36b, și, respectiv, cu 62,3%, de prezența acidului gama-aminobutiric (GABA) în concentrație de 2×10^{-6} M, în mediul de cultivare a tulpinii Td36b.

Exemplul 3

Au fost realizate experimente de testare a influenței unor exo-semnale secretate de rădăcinile plantelor asupra biosintezei de către tulpina *Trichoderma asperelum* Td36b a compușilor cu acțiune de stimulare a creșterii plantelor și de limitare a dezvoltării fungilor fitopatogeni, respectiv a acidului harzianic și a 6-n-pentil-6H-piran-2-onei (6-PP).

Tulpina Td36b a fost cultivată pe mediu lichid cartof-glucoză, timp de 21 zile, la 25°C, în prezența GR24 (Chiralix), un analog sintetic de strigolactone, în concentrație de 5×10^{-6} M. Culturile tratate au fost realizate în paralel cu o variantă de culturi martor, în care în mediul de cultură lichid cartof-glucoză nu au fost adăugați compuși cu rol de exo-semnale în rizosfera plantelor de cultură sau analogi biomimetici ai acestora. Mediile de cultură cu tulpina Td36 au fost menținute în condiții staționare timp de 21 zile. După 21 zile, mediile de cultură s-au filtrat prin hârtie de filtru (Whatman No. 4, Brentford, UK).

Filtratele au fost acidificate la pH 4 cu o soluție 5 N HCl, și extrase repetat cu acetat de etil (Merck Millipore). Frațiile organice au fost evaporate la vacuum la 35°C și uscate pe sulfat de sodiu anhidru (Sigma Aldrich). Reziduul roșu a fost recuperat în cloroform (Merck Millipore) și extras de trei ori cu o soluție 2 N NaOH. Din extractul alcalin a fost precipitată o fracție acidă care conținea acid harzianic, prin tratare cu HCl 2 N. În fracția acidă a fost determinat conținutul de acid harzianic folosind metoda descrisă de Vinale et al. 2014, Molecules, 19, 9760-9772. Producerea acidului harzianic este amplificată cu 47,5% în prezența GR24, un analog sintetic de strigolactone, în concentrație de 5×10^{-6} M, în mediul de cultivare a tulpinii Td36b.

Tulpina Td36b a fost cultivată pe mediu lichid cartof-glucoză, în condiții staționare, fără agitare, timp de 5 zile, la 25°C. Cultivarea s-a realizat în prezența GR24 (Chiralix), un analog de strigolactone, în concentrație de 2×10^{-6} M, și, respectiv, DIMBOA (Fragmenta, Monmouth Junction, NJ, SUA), 2,4-dihidroxi-7-metoxi-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-onă, în concentrație de 2×10^{-6} M. Culturile tratate au fost realizate în paralel cu o variantă de culturi martor, în care în mediul de cultură lichid cartof-glucoză nu au fost adăugați compuși cu rol de exo-semnale în rizosfera plantelor de cultură sau analogi biomimetici ai acestora. După 5 zile, miceliul format a fost omogenizat cu mediul de cultură, cu un blender de laborator (Waring®, Laboratory Blender, Fischer Scientific). Cantitatea de biomasă din omogenat a fost determinată gravimetric, după filtrare pe hârtie Whatman nr. 1 și uscare la 110°C până la masă constantă. S-au luat 25 ml de omogenat biomasă-mediul de cultură, care au fost extrași cu câte 25 ml de clorură de metilen, Frațiile inferioare s-au reunit, au fost uscate pe sulfat de sodiu anhidru, concentrate la sec și reluate în 0,1 ml clorură de metilen. Determinarea 6-PP a fost făcută gaz-cromatografic, cu detector spectrometru de masă, conform metodei descrise în detaliu la exemplul 1.

Producerea de 6-PP este amplificată cu 37,5% în prezența GR24, un analog de strigolactone, în concentrație de 2×10^{-6} M, în mediul de cultivare a tulpinii Td36b, și, respectiv, cu 27,8%, de prezența, DIMBOA, 2,4-dihidroxi-7-metoxi-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-onă, în concentrație de 2×10^{-6} M, în mediul de cultivare a tulpinii Td36b.

Exemplul 4

Au fost realizate experimente prin care s-a determinat influența exo-semnalelor produse de plante în rizosferă asupra eliberării, din materialul vegetal în curs de descompunere, a compușilor cu rol de modulatori ai căilor metabolice implicate în răspunsul plantelor la factorii de stres biotici și abiotici.

Un prim compus luat în considerare a fost siliciul solubil, eliberat din paie de grâu. Siliciul solubil are un rol determinant în exprimarea echilibrată a căilor metabolice implicate în rezistența de spectru larg a plantelor la factorii de stres biotici și abiotici (Van Bockhaven

RO 131177 B1

1 et al. 2013, J. Exp. Bot. 64, 1281-1293). Întrucât rezervorul de siliciu solubil din sol este
limitat, eliberarea rapidă a siliciului din resturile vegetale este necesară pentru a stimula
3 plantele de cultură (Guntzer et al. 2012, Agron. Sustain. Dev. 32, 201-213). Paiele de grâu
reprezintă una din sursele cele mai bogate în bio-siliciu ușor recirculabil în soluția solului
5 (Song et al. 2014, Earth-Sci. Rev. 139, 268-278).

Tulpinile de grâu tocate și uscate au fost măcinate și trecute pe sita de 0,250 mm.
7 S-au ambalat câte 10 g de pulbere, apoi s-au sterilizat prin iradiere gamma (la IRASM,
IFIN-HH). Din pulberea sterilizată s-au luat aseptice câte 0,1 g de pulbere de material vegetal,
9 care s-au adus într-un Erlenmayer de 50 ml, steril. Peste pulberea fin măcinată s-au adăugat
aseptic 19 ml tampon fosfat steril. S-a omogenizat prin agitare.

11 În probele tratate s-a adăugat GR24, un analog sintetic de strigolactone, în
concentrație finală de 2×10^{-6} M. Culturile tratate au fost realizate în paralel cu o variantă de
13 culturi martor, în care nu au fost adăugați în mediul de cultură compuși cu rol de
exo-semnale în rizosfera plantelor de cultură sau analogi biomimetici ai acestora. Toate
15 culturile au fost inoculate cu câte 0,5 ml suspensie de propagule din tulpina Td36b,
normalizată la 10^8 ufc/ml. S-a menținut la agitator timp de 5 zile, la temperatura de 25°C.
17 După 5 zile, s-au separat prin filtrare supernatantele culturilor, în care s-a determinat siliciul
solubil prin spectrometrie de absorbție atomică cu plasmă cuplată inductiv (pe un sistem
19 Optima 2100 DV ICP-OES, Perkin Elmer, Waltham, MA, SUA). Eliberarea de siliciu solubil
din paie de grâu, *Triticum aestivum*, este amplificată cu 97,6% în prezența GR24, un analog
21 sintetic de strigolactone, în concentrație de 2×10^{-6} M, în mediul de cultivare a tulpinii Td36b.

A fost determinată și influența compușilor cu rol de exo-semnale în rizosfera
23 plantelor/analogilor biomimetici ai acestora asupra capacității tulpinii Td36b de a elibera
oligozaharine (oligozaharide eliberate prin hidroliza lignocelulozei/peretelui celulelor vegetale
25 din materialul vegetal, cu un tipar molecular similar celui al deteriorărilor produse de
patogenii plantelor). Biomasa uscată de mazărice de toamnă, *Vicia villosa*, a fost măcinată
27 și trecută pe sita de 0,250 mm. S-au ambalat câte 10 g de pulbere, apoi s-au sterilizat prin
iradiere gamma (la IRASM, IFIN-HH). Din pulberea sterilizată s-au luat aseptice câte 0,1 g de
29 pulbere de material vegetal, care s-au adus într-un Erlenmayer de 50 ml, steril. Peste
pulberea fin măcinată s-au adăugat aseptice 19 ml tampon fosfat steril. S-a omogenizat prin
31 agitare. În variantele tratate cu exo-semnale de rizosferă s-a adăugat DIMBOA, 4-ihidroxi-7-
metoxi-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-onă (Fragmenta), în concentrație de 2×10^{-6} M, și,
33 respectiv, acid gama-aminobutiric, GABA, în concentrație de 2×10^{-6} M, în mediul de
cultivare a tulpinii Td36b. Variantele tratate cu exo-semnale au fost realizate în paralel cu o
35 variantă de culturi martor, în care nu au fost adăugați în mediul de cultură compuși cu rol de
exo-semnale în rizosfera plantelor de cultură sau analogi biomimetici ai acestora. Toate
37 variantele au fost inoculate cu câte 0,5 ml suspensie de propagule din tulpina Td36b,
normalizată la 10^8 ufc/ml. S-a menținut la agitator timp de 5 zile, la temperatura de 25°C.
39 După 5 zile, s-a separat prin filtrare supernatantul de materialul vegetal prelucrat cu fungi și
de biomasa fungică. Supernatantul a fost normalizat la 1% substanță uscată (determinată
41 refractometric) și sterilizat prin ultrafiltrare. Produsul rezultat a fost aplicat prin stropire (5 ml
per plantă), pe plante test de floarea-soarelui (ev. NK Armoni, Syngenta, Basel, Elveția) și
43 tomate (*Solanum lycopersicum* ev. Menhir F1, Bayer Crop Science, Leverkusen, Germania),
provenite din semințe dezinfectate termic (prin menținere timp de 30 min la temperaturi de
45 peste 50°C) și chimic (prin tratare cu clorox neparfumate, diluat 1:1), crescute pe mediu
hidroponic cu perlit steril ca suport de creștere. Aceste plante au fost tratate și cu
47 oligozaharine etalon (heptazaharide similare celor eliberate din peretele celular sub acțiunea
enzimelor degradative ale microorganismelor, provenite din alge marine brune și furnizate

RO 131177 B1

de Goemar, Arysta Life Sciences, Cary, NC). Plantele au fost menținute la cameră de creștere (Weiss-Gallenkamp, Leicestershire, Marea Britanie), termostată și iluminată. S-a lucrat cu un martor netratat și un martor tratat cu apă distilată. La 10 zile de la aplicarea tratamentului, s-a realizat extragerea fluidului extracelular din plante, conform metodei de mai jos, iar în fluidul extracelular s-au determinat proteinele PR luate în studiu (β -glucanaza/PR-2 și o enzimă implicată în detoxifierea RLO_2 , ascorbatperoxidaza).

Pentru obținerea fluidului intracelular a fost utilizată metoda Hogue și Asselin (Hogue și Asselin, 1987, Can. J Bot., 65, 476-481) adaptată condițiilor laboratorului nostru. Frunzele au fost tăiate în fâșii lungi de circa 2 cm, au fost spălate pentru circa 10 min în apă distilată sterilă (pentru eliminarea debriurilor și a contaminanților citoplasmatici), apoi au fost transferate într-o placă Petri \varnothing 10 aflată într-un exsicator cu vid. Placa Petri a fost umplută pe jumătate cu apă distilată (circa 2 ml de apă distilată pentru fiecare gram de substanță proaspătă de frunză), exsicatorul a fost închis și conectat la o trompă de apă. După infiltrare sub vid cu apă distilată timp de aproximativ 10 min, fâșiile de frunze au fost scoase, tamponate cu hârtie de filtru (pentru îndepărtarea excesului de apă) și rulate în tuburi de seringi de plastic de unică folosință de 10 ml. Tuburile seringilor s-au depus în eprubete de centrifugă de 25 ml (cu partea deschisă în jos) și s-a centrifugat la 1000 g pentru 10 min. Fluidul intercelular expulzat de forța centrifugă a fost recoltat în partea de jos a eprubetelor.

Determinarea activității β -glucanazice s-a realizat colorimetric, conform metodei descrise de Boiler (1992), prin utilizarea laminarinei reduse cu $NaBH_4$ ca substrat. Pentru exprimarea activității β -1,3 glucanazice, extincțiile au fost transformate în concentrații cu ajutorul unei curbe etalon realizate cu glucoză, iar o unitate enzimatică (UI) a fost definită ca fiind acea cantitate de enzimă care eliberează 1 μ mol ech. grupări reducătoare per min, la 37°C.

Determinarea activității (ascorbat) peroxidazei s-a făcut prin utilizarea acidului ascorbic ca donor de hidrogen, (Gerbling et al. 1984, J Plant Physiol., 115, 59-67). Pentru exprimarea activității ascorbat peroxidazei diferențele de extincție au fost transformate în concentrații cu ajutorul unei curbe etalon realizate cu glucoza, iar o unitate enzimatică a fost definită ca fiind acea cantitate de enzimă care determină consumul a 1 μ mol H_2O_2 per min, la temperatura camerei. În tabelul 5 sunt prezentate rezultatele obținute pentru variantele experimentale de plante de floarea-soarelui și tomate tratate cu oligozaharine și cu supernatant de material vegetal degradat de tulpina Td36b, în prezența și absența exosemnelor de rizosferă.

Tabelul 5

Activitatea ascorbat-peroxidazei și a β 1-3 glucanazei în frunze ale diferitelor variante experimentale testate

Varianta	Activitatea ascorbat-peroxidazei (UI/mg.sp)		Activitatea β 1-3 glucanazei (UI/mg.sp)	
	Floarea-soarelui	Tomate	Floarea-soarelui	Tomate
Martor netratat	12,2 \pm 4,17c	8,18 \pm 1,35c	9,44 \pm 1,03c	5,87 \pm 1,17c
Martor infiltrat cu apă distilată	13,04 \pm 3,53c	9,51 \pm 1,22c	9,52 \pm 0,84c	5,17 \pm 1,28c
Tratat cu oligozaharine (ech. 10 μ g gluc/ml)	30,61 \pm 6,17a	24,22 \pm 5,54a	25,42 \pm 5,12a	19,04 \pm 2,03a

Tabelul 5 (continuare)

Varianta	Activitatea ascorbat-peroxidazei (UI/mg.sp)		Activitatea β 1-3 glucanazei (UI/mg.sp)	
Tratat cu supernatant cultura Td36b	20,71 \pm 4,48b	15,52 \pm 3,94b	15,61 \pm ,82b	14,4 \pm 3,62a
Tratat cu supernatant cultura Td36b + DIMBOA	31,81 \pm 4,32a	23,84 \pm 3,6a	23,98 \pm 4,72a	22,12 \pm 4,16a
Tratat cu supernatant cultura Td36b + GABA	27,79 \pm 5,84a	20,83 \pm 2,8a	20,95 \pm 5,6ab	19,32 \pm 6,15ab

*valorile urmate de aceeași literă nu diferă semnificativ pentru $P > 0,05$.

Eliberarea de oligozaharine din biomasă uscată de mazărice de toamnă, *Vicia villosa*, este amplificată cu 53,6% DIMBOA, 2,4-dihidroxi-7-metoxi-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-onă, în concentrație de 2×10^{-6} M, în mediul de cultivare a tulpinii Td36b, și, respectiv cu 34,2%, de prezența acidului gama-aminobutiric, GABA, în concentrație de 2×10^{-6} M, în mediul de cultivare a tulpinii Td36b.

Exemplul 5

Tulpina *T. asperellum* Td36b a fost multiplicată și inclusă într-o compoziție care să-i faciliteze colonizarea substratului de compostare. Multiplicarea s-a realizat pe un mediu industrial pe bază de zer. În zerul dulce obținut de la fabricarea cașului s-a determinat substanța uscată refractometric, s-a diluat până la 3% substanță uscată din zer cu apă deionizată și apoi s-au adăugat: 1,5% borhot de porumb de la fabricarea etanolului (masă/volum); 0,5% KH_2PO_4 (masă/volum); 0,5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (masă/volum). S-au distribuit câte 100 ml în fiecare Erlenmeyere de 500 ml închise cu dop de vată, s-au sterilizat la 121°C timp de 25 min, după care s-au inoculat aseptice cu 5 ml de suspensie conținând 10^7 spori/ml și s-a incubat pentru 5 zile la 25°C pe masă rotativă, 150 rpm. Câte 10 ml de suspensie au fost utilizați pentru a inocula pungile de polipropilenă care conțineau câte 100 g substrat epuizat de la cultivarea ciupercilor *Pleurotus*. Pungile de polipropilenă cu substrat epuizat au fost în prealabil sterilizate la 121°C , timp de 25 min.

După inoculare, s-au incubat timp de 7 zile în camera climatică (Model SGC 120 LED, Weiss Gallenkamp, Loughborough, Marea Britanie), unde au fost menținute la $60 \mu\text{mol}$ fotoni/ m^2/s , cu o fotoperioadă de 12 h, la 25°C și 70% umiditate. După 7 zile, pungile au fost iluminate timp de 15 min cu lumină albastră 440...460 nm, $60 \mu\text{mol}$ fotoni/ m^2/s . Ulterior, pungile au fost incubate la întuneric, la temperatura de 25°C , timp de 3 zile.

Biomasa de *T. asperellum* Td36b amestecată cu substrat epuizat parțial degradat s-a malaxat în raport de 1:1 cu o suspensie conținând 12% făină și 10% amestec de esteri etilici ai acizilor grași, lecitină, săpun de potasiu, glicerină, lipide din ulei de rapiță. Pasta rezultată a fost extrudată pe o mașină de făcut paste (Model TR95A, Helco, Craiova, România), iar tăițeii rezultați au fost granulați pe un echipament de sferonizare (model Spheronis R-250m Grabler, Ettlingen, Germania). Granulele rezultate au fost uscate într-un uscător/granulator în pat fluidizat (Model Mini Glatt, Glatt, Binzen, Germania), la o temperatură maximă de 37°C . După uscare, peste granule s-au adăugat 48 g sare de potasiu a co-polimerului grefat amidon - poli (2 propenamidă co-acid 2-propenoic) (Zeba, Absorbent Technologies, Beaverton, OR, SUA), și s-a omogenizat prin fluidizare.

Amestecul de esteri etilici ai acizilor grași, lecitină, săpun de potasiu, glicerină și lipide nesaponificabile din ulei de rapiță s-a obținut conform procedurii descris în continuare: 1000 g de ulei degumat de rapiță, cu caracteristicile prezentate în tabelul 6, a fost adus într-o autoclavă de 2 l din oțel inox, cu sistem de agitare și de încălzire, sub atmosferă protectoare de azot.

Caracteristicile uleiului degumat de rapiță folosit

Apă și compuși volatili	% m/m	0,4
Substanțe nesaponificabile	% m/m	1,4
Acizi grași liberi	% m/m	1,9
Index de saponificare	mg KOH/g	169,5
Compoziția medie în acizi grași (% w/w): C16: 2.4; C18: 1.2 ; C18-1: 16.1; C18-2: 24.5; C18-3: 7.3; C20-1: 7.3; C22-1: 42.4		

S-au dizolvat 25 g de hidroxid de potasiu de puritate 98% în 210 g de etanol cu 0,3% apă, iar soluția rezultată a fost adăugată în autoclav peste uleiul degumat de rapiță. Se pornește agitarea și încălzirea la 40°C. După un timp de reacție de 8 h, masa de reacție s-a răcit la temperatura camerei. S-au colectat 1225 g masă transparentă de reacție (R1). 500 g de produs P1 s-a tratat cu acid oleic tehnic, obținându-se un produs cu următoarea compoziție (% m/m): esteri etilici de acizi grași (FAEE) 74,5; trigliceride 5,9; glicerol 7,1; săpun de potasiu 11,4 și apă 1,1. 140 g din produsul de reacție (P1) a fost tratat prin agitare viguroasă cu 60 g emulsifiant lecitină de soia lichidă, obținându-se un amestec cu următoarea compoziție(% m/m): esteri etilici de acizi grași (FAEE) 48,7; grăsimi nereacționate din ulei de rapiță 4; glicerol 4,5; săpun de potasiu 7,5, lecitină 34,6 și apă 0,7. Acest amestec a fost folosit pentru obținerea compoziției cu eliberare controlată conținând *T. asperellum* Td36b.

Compoziția cu eliberare controlată pe bază de *T. asperellum* Td36b rezultată este alcătuită din 50 părți substrat epuizat de la cultivarea ciupercilor *Pleurotus*, 32 părți sare de potasiu a co-polimerului grefat amidon - poli (2 propenamidă co-acid 2-propenoic), 8 părți făină, 3,2 părți esteri etilici ai acizilor grași, 2,3 părți lecitină, 0,5 părți săpun de potasiu, 0,3 părți glicerol, 0,4 părți grăsimi nesaponificabile din ulei de rapiță, restul până la 100 părți apă, și minimum 10⁶ ufc/g *T. asperellum* Td50b.

Numărul de spori de *T. asperellum* Td36b din compoziția de mai sus a fost determinat prin extragere în tampon fosfat salin, diluții seriale și cultivare pe mediul selectiv propus de William et al., 2003, prezentat în detaliu în exemplul 1.

Compoziția a fost testată din punct de vedere al acțiunii de accelerare a vitezei de degradare a materialului vegetal. Materialul vegetal (măzărache păroasă) a fost măcinat și trecut pe o sită de 0,250 mm. Din pulberea măcinată s-au luat câte 10 g care s-au adus într-un flacon Erlenmayer de 50 ml împreună cu 20 ml apă distilată. S-a omogenizat prin agitare, s-a sterilizat prin autoclavare la 121°C timp de 25 min și s-a tratat apoi cu 1 ml de suspensie de *T. asperellum* Td36b conținând 10⁶ spori/ml, sau, respectiv, cu 1 g de compoziție conform acestui exemplu. Toate variantele s-au lucrat în 5 repetiții, iar flacoanele Erlenmeyer au fost menținute la temperatura camerei timp de 7 zile.

După incubare amestecul a fost trecut într-un vas de respirație Strathox (Strathkelvin Instruments Limited, Glasgow, Marea Britanie). S-au efectuat în paralel determinările de respirație/consum de oxigen timp de 12 h.

După efectuarea determinărilor de respirație, s-au prelevat câte 1 g probe de material, care au fost extrase cu 1 ml clorură de metilen timp de 20 min 0,45 ml din extract au fost trecuți într-un flacon de filtrare într-o singură etapă, cu membrană filtrantă de 0,2 μm din nailon (Thomson Instrument Company, Oceanside, CA, SUA), iar din filtrat s-a determinat 6-PP gaz-cromatografic, conform metodei prezentate deja.

RO 131177 B1

1 Probele au fost analizate comparativ cu un martor fără inocul de *Trichoderma*, care
a fost numai tratat cu apă sterilă și incubat la temperatura camerei, în aceleași condiții
3 experimentale. Datele au fost prelucrate statistic prin analiza variantei (Statistica 10,
StatSoft). Rezultatele sunt prezentate în tabelul 7. Aceste rezultate demonstrează influența
5 semnificativă a includerii tulpini Td36b în compoziția realizată conform acestui exemplu.
Compoziția asigură o colonizare uniformă și reproductibilă cu propagule eliberate succesiv
7 din tulpina Td36b, datorită protejării respectivelor propagule de către componenta hidrofobă
a compoziției, în care se acumulează preponderent 6-PP, compus volatil, produs de
9 populația provenită din primul val eliberat, și care este fungistatic și pentru propagulele
aceleași tulpini.

Tabelul 7

11 *Degradarea materialului vegetal de către tulpina T. asperellum Td36b și acumularea*
13 *de 6-pentil- α -pironă*

Varianta	Respirație (mg/l O ₂ consumați, medie orară)	6-PP (μ g/g material)
<i>T. asperellum</i> Td36b suspensie 10 ⁶ spori/ml	2,21 \pm 0,54b	172 \pm 43b
Compoziție cf. ex 4 cu <i>T. asperellum</i> Td36b 10 ⁶ spori/g	2,88 \pm 0,22a	283 \pm 37a
Martor netratat cu <i>Trichoderma</i>	0,32 \pm 0,11c	ND

21 Valorile urmate de aceeași literă nu diferă semnificativ pentru P > 0,05. ND - nedetectabil

23 Compoziția sub formă de granule rezultată, se aplică ca tratament al resturilor
25 vegetale, în doză de 20 kg/ha, prin utilizarea echipamentelor de aplicare a produselor
granulare, eventual împreună cu 100...120 kg/ha fertilizanți radiculari de tip NPK 19-0-19,
27 pentru a simula producerea de exo-semnale de tip strigolactone de către plantele cultivate
în sisteme conservative.

1. Tulpină de *Trichoderma asperellum* Td36b, depozitată la National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms (NCAIM) Budapesta sub numărul P(F) 001434, utilizată în sistemele de agricultură conservativă. 3 5
2. Tulpină de *Trichoderma asperellum* Td36b, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** producerea de siderofori este amplificată cu 75,6% în prezența, în mediul de cultivare, a GR24, un analog sintetic de strigolactone, în concentrație de 2×10^{-6} M. 7
3. Tulpină de *Trichoderma asperellum* Td36b, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** producerea de compuși care solubilizează fosforul este amplificată cu 83,8% în prezența, în mediul de cultivare, a GR24, un analog sintetic de strigolactone, în concentrație de 5×10^{-6} M, și, respectiv, cu 62,3%, de prezența, în mediul de cultivare, a acidului gama-aminobutiric, GABA, în concentrație de 2×10^{-6} M. 9 11 13
4. Tulpină de *Trichoderma asperellum* Td36b, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** producerea acidului harzianic este amplificată cu 47,5% în prezența, în mediul de cultivare, a GR24, un analog sintetic de strigolactone, în concentrație de 5×10^{-6} M. 15
5. Tulpină de *Trichoderma asperellum* Td36b, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** producerea de 6-n-pentil-6H-piran-2-onă, 6-PP, este amplificată cu 37,5% în prezența, în mediul de cultivare, a GR24, un analog de strigolactone, în concentrație de 2×10^{-6} M, și, respectiv, cu 27,8%, de prezența, în mediul de cultivare, a DIMBOA, 2,4-dihidrox-7-metoxi-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-onă, în concentrație de 2×10^{-6} M. 17 19 21
6. Tulpină de *Trichoderma asperellum* Td36b, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** eliberarea de siliciu solubil din paie de grâu, *Triticum aestivum*, este amplificată cu 97,6% în prezența GR24, un analog sintetic de strigolactone, în concentrație de 2×10^{-6} M. 23 25
7. Tulpină de *Trichoderma asperellum* Td36b, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** eliberarea de oligozaharane din biomasa uscată de mazărice de toamnă, *Vicia villosa*, este amplificată cu 53,6% în prezența DIMBOA, 2,4-dihidrox-7-metoxi-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-onă, în concentrație de 2×10^{-6} M, și, respectiv, cu 34,2%, de prezența acidului gama-aminobutiric, GABA, în concentrație de 2×10^{-6} M. 27 29
8. Compoziție cu eliberare controlată pe baza tulpinii *T. asperellum* Td36b, definită în revendicările 1...7, **caracterizată prin aceea că** este alcătuită din 50 părți substrat epuizat de la cultivarea ciupercilor *Pleurotus*, 32 părți sare de potasiu a co-polimerului grefat amidon - poli (2 propenamidă co-acid 2-propenoic), 8 părți făină, 3,2 părți esteri etilici ai acizilor grași, 2,3 părți lecitină, 0,5 părți săpun de potasiu, 0,3 părți glicerol, 0,4 părți grăsimi nesaponificabile din ulei de rapiță, restul până la 100 părți apă, și minimum 10^6 ufc/g *T. asperellum* Td36b. 31 33 35 37
9. Compoziție cu eliberare controlată pe baza tulpinii *T. asperellum* Td36b conform revendicării 8, **caracterizată prin aceea că** se administrează în doză de 20 kg/ha resturilor vegetale, în sistemele de agricultură conservativă, împreună cu 100...120 kg/ha fertilizanți radiculari de tip NPK 19-0-19, pentru a stimula producerea de exo-semnale de tip strigolactone de către plantele cultivate în sisteme conservative. 39 41 43

