



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2015 00939

(22) Data de depozit: 02/12/2015

(41) Data publicării cererii:
30/06/2017 BOPI nr. 6/2017

(71) Solicitant:
• TESO SPEC S.R.L., STR. MUNCII NR. 53,
PARTER, FUNDULEA, CL, RO

(72) Inventatori:
• GEORGESCU EMILIAN,
STR. INDEPENDENȚEI NR. 5, BL. 6, SC. A,
AP. 7, RÂMNICU-VĂLCEA, VL, RO;
• GEORGESCU FLORENTINA,
STR. INDEPENDENȚEI NR.5, BL.6, SC.A,
AP.7, RÂMNICU-VĂLCEA, VL, RO;

• VLĂDULESCU CONSTANTIN MARIUS,
STR.VORONEȚ NR.3, BL.D4, SC.1, ET.1,
AP.5, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;

• ISTRATE GEORGETA,
STR. THEODOSIE RUDEANU NR. 3,
BL. 1C, SC. 3, ET. 2, AP. 79, SECTOR 1,
BUCUREȘTI, B, RO;

• OANCEA FLORIN, STR.PAȘCANI NR.5,
BL.D 7, SC.E, ET.2, AP.45, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;

• RĂUT IULIA, ALEEA BARAJUL BISTRIȚA
NR. 12, BL. 4, ET. 4, AP. 54, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO

(54) NOI ANALOGI DE STRIGOLACTONE, ȘI UTILIZAREA LOR
PENTRU AMPLIFICAREA RĂSPUNSULUI UTIL AL
MICROORGANISMELOR BENEFICE ASOCIATE RIZOSFEREI
PLANTELOR

(57) Rezumat:

Invenția se referă la compuși sintetici cu structură similară strigolactonelor și la utilizarea acestora pentru amplificarea răspunsului util al microorganismelor benefice asociate rizosferei plantelor. Compușii conform invenției sunt: 3-metil-5-(pirimidin-il-fenoxi)-5H-

furan-2-onă sau 3-metil-5-(4-fenilchinazolin-2-il-oxi)-5H-furan-2-onă. Compușii conform invenției se aplică pe plante în concentrații de $1...25 \times 10^{-8}$ M.

Revendicări: 5



NOI ANALOGI DE STRIGOLACTONE ȘI UTILIZAREA LOR PENTRU AMPLIFICAREA RĂSPUNSULUI UTIL AL MICROORGANISMELOR BENEFICE ASOCIATE RIZOSFEREI PLANTELOR

Prezenta invenție se referă la noi compuși sintetici cu o structură similară strigolactonelor și la utilizarea acestora pentru amplificarea răspunsului util al microorganismelor benefice asociate rizosferei plantelor cultivate, altele decât cele care realizează simbioze micorizale sau fixatoare de azot.

Sunt cunoscuți diferiți compuși sintetici analogi strigolactonelor care au fost revendicați pentru diferite utilizări în practica agricolă. Denumirea generică de strigolactone se referă la o serie de produși de metabolism secundar, derivați caretonoidici sintetizați de rădăcinile plantelor, care au rol de endo- și exo-semnale, respectiv de hormoni care controlează dezvoltarea plantelor, și de semnale în rizosferă pentru alte organisme (Xie et al. 2010, *Annual Review of Phytopathology*, 48: 93-117).

Brevetul US 8101171 B2 prezintă utilizarea strigolactonelor naturale, strigol, alectrol, sorgolactone, orobanchol, sau a analogilor lor sintetici GR7, GR24, Nijmegen1, dimetilsorgolactone, pentru intensificarea interacției simbiotice dintre ciupercile producătoare de endo-micorize (AM) și plantele cultivate. Brevetul revendică aplicarea repetată a strigolactonelor care stimulează / intensifică interacția simbiotică AM - rădăcinile plantelor de cultură, dar nu exemplifică modalitatea concretă prin care se realizează această aplicare repetată.

Amplificarea efectului strigolactonelor / analogilor de strigolactone, de exo-semnal implicat în stabilirea interacțiilor simbiotice benefice din rizosfera plantelor cultivate, a fost realizată prin utilizarea chito-oligozaharidelor – brevet WO 2010125065 A2. Compoziția protejată prin această cerere de brevet WIPO, poate fi suplimentată cu spori de ciuperci de micoriză, rhizobii sau bacterii care stimulează creșterea plantelor, se condiționează sub formă lichidă sau pulverulentă, și se aplică ca tratament la sămânță, tratament foliar sau al tulpinilor, prin irigarea solului (chemirigare) sau prin tratament în brazdă.

Brevetul SUA 8 980 795 B2 se referă la analogi de strigolactone obținuți prin sinteză biochimică *in vitro* și la utilizărilor acestor compuși pentru: a determina germinarea suicidală a semințelor de buruieni parazite (în absența rădăcinilor plantelor gazdă / capcană pentru semințele buruienilor parazite), a regla

ramificarea, înfrățirea și dezvoltarea rădăcinilor plantelor cultivate, ca și consolidarea cambiului la aceste plante, creșterea hifelor ciupercilor de micoriză, precum și în realizarea unor compoziții care includ compuși respectivi, din categoria analogilor de strigolactone, împreună cu insecticide, fungicide și amestec de insecticide și fungicide.

Dezavantajele invenției constau în faptul că prin procedeele de sinteză biochimică descrise se obțin cantități extrem de mici de analogi de strigolactone, ceea ce face dificilă folosirea lor în câmp, dar și în folosirea agenților agrochimici, insecticide și/sau fungicide, în compozițiile folosite pentru tratarea plantelor, ceea ce le face improprie pentru sistemele de tip agricultură organică, în care s-ar putea justifica utilizarea unor compuși obținuți prin sinteze biochimice dificile.

Brevetul FR 2930402 B1 descrie un procedeu de utilizare a analogilor de strigolactone pentru a controla creșterea plantelor. Aplicarea se realizează prin injectarea unei cantități de cel puțin 1 nM, necesară pentru inhibarea a cel puțin unei ramificații, din următorii compuși: strigol; acetat de strigol; orobanchol; acetat de orobanchol; 5-deoxistrigol; sorgolactone; alectrol; 3-[[[(2,5-dihidro-3-metil-2-oxo-5-furanil)oxi]metilen]-3,3a,6,6a-tetrahidrociclopenta[b]furan-2-one (GR7); 3-[[[(2,5-Dihidro-3-metil-2-oxo-5-furanil)oxi]metilen]-3,3a,4,8b-tetrahidroindeno[1,2-b]furan-2-one (GR24); 2-(1-metilen-3-oxo-1,3-dihidroizoindol-2-il)-3-(4-metil-5-oxo-2,5-dihidrofuran-2-iloxi) metil acrilat (Nijmegen 1), dimetilsorgolactone, sau amestecuri ale acestora.

Cererea de brevet EP 2248421 A1 revendică utilizarea strigolactonelor pentru promovarea creșterii secundare a plantelor și, implicit, pentru acumularea de biomasă, creșterea rezistenței la cădere a tulpinilor și a capacității de transport prin vasele conducătoare, lemnoase și liberiene. Procedeu de aplicare revendicat implică stropirea sau irigarea plantelor cu o suspensie sau o soluție care conține strigolactone – dar nu sunt precizate concentrațiile efective. Brevetul FR2990945 B1 dezvăluie un nou analog sintetic de strigolactone, utilizabil pentru controlarea creșterii și arhitecturii plantelor, care este aplicat prin stropirea plantelor cu soluții / suspensii care conțin între 0,1 și 1000 nM de analog strigolactone, de preferință între 1 și 100 nM.

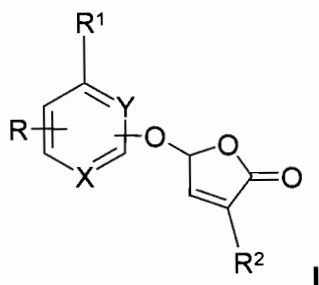
Un dezavantaj al compușilor descriși până în prezent este determinat de dificultatea sintezei lor chimice (Zwanenburg et al. 2015. *Pest Management Science*, DOI: 10.1002/ps.4105), ca și de specificitatea lor redusă pentru

microbiomul benefic non-simbiotic din rizosfera plantelor. Nu s-au descris până în prezent analogi de strigolactone care să determine amplificarea răspunsului util la microorganismele benefice din rizosferă, altele decât cele care realizează simbioze micorizale sau fixatoare de azot (Andreo-Jimenez et al. 2015, *Plant and Soil*, 394: 1-19), deși rolul de exo-semnal al strigolactonelor a fost considerat ca reprezentând un „strigăt de ajutor” al plantelor în rizosferă (López-Ráez et al. 2011, *Botany*, 89: 513-522), în cazul unor deficite nutriționale și a altor tipuri de stres abiotic.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este de a descrie noi compuși sintetici, cu o structură similară strigolactonelor, care să determine amplificarea răspunsului util al microorganismelor benefice asociate rizosferei plantelor cultivate, altele decât cele care realizează simbioze micorizale sau fixatoare de azot.

Este un alt obiect al acestei invenții de a descrie utilizarea acestor compuși ca biostimulanți pentru plante, prin care să se reducă impactul stresurilor biotice sau abiotice asupra plantelor de cultură.

Compușii sintetici cu o structură similară strigolactonelor conform invenției, sunt reprezentați prin formula generală I,



în care:

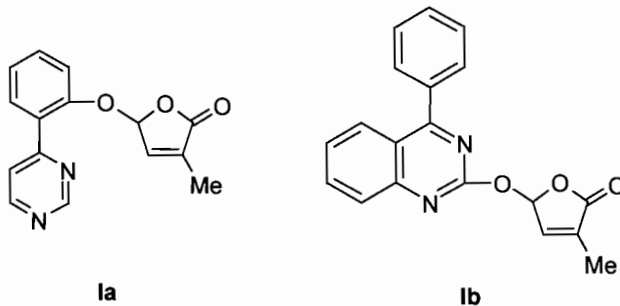
X, Y sunt atomi de carbon, R este un atom de hidrogen, iar R¹ este un radical fenil, piridil, 2-pirimidinil sau 4-pirimidinil

X și Y sunt unul sau ambii atomi de azot, R este o grupă 5,6-benzo sau 5,6-benzo substituită cu un atom de halogen, iar R¹ este un radical fenil

R² este o grupă alchil C1-C4, trifluorometil, hidroxil, nitro, carboxil sau carboxil substituit cu o grupă alchil C1-C4, sau un atom de halogen.

Compușii conform invenției, prezentați în formulele următoare, conțin de preferință un ciclu fenilic de șase atomi de carbon substituit în poziția 2 cu un ciclu

heteroaromatic de pirimidină **1a** sau un ciclu heteroaromatic de chinazolină substituit în poziția 4 cu un ciclu fenilic **1b**.



Utilizarea compușilor de mai sus determină efecte biostimulante asupra plantelor de cultură datorită amplificării unor răspunsuri utile în microorganismele benefice din rizosfera plantelor de cultură: solubilizarea fosforului anorganic și organic; producerea de siderofori; biosinteza de compuși cu efect de stimulare a creșterii plantelor; eliberarea de poliamine cu rol de creștere a rezistenței la stresurile abiotice.

Prezența compușilor de mai sus intensifică producerea de enzime implicate în eliberarea biosiliciului prin descompunerea materialului vegetal.

Compușii conform invenției prezintă următoarele avantaje:

- Sunt relativ ușor de sintetizat, în cantități semnificative și la un preț de cost mai scăzut, datorită unui număr mai redus de etape de sinteză și datorită unor intermediari accesibili;

- Sunt activi față de o categorie largă de microorganisme benefice plantelor, altele decât cele care realizează simbioze micorizale sau fixatoare de azot, determinând amplificarea unor răspunsuri benefice diverse ale respectivelor microorganisme, prin care se reduce impactul stresurilor biotice sau abiotice asupra plantelor de cultură.

În continuare se prezintă exemple de realizare în detaliu, cu referire și la figura 1, care ilustrează invenția fără a o limita.

Figura 1. Compușii sintetici cu o structură similară strigolactonelor care au structură de 3-metil-5-(2-pirimidin-4-il-fenoxi)-5H-furan-2-onă și 3-metil-5-(4-fenilchinazolin-2-il-oxi)-5H-furan-2-onă.

Exemplu 1. Sintezele analogilor de strigolactonă

Exemplu 1a. Sinteza 3-metil-5-(2-pirimidin-4-il-fenoxi)-5H-furan-2-onei 1a

La o soluție care conține 0,86 g (5mmoli) de 4-(2-hidroxifenil)pirimidină, obținută prin metoda generală pentru 4-fenilpirimidină descrisă de Brederek, H.; Gompper, R.; Geiger, B. *Chem. Ber.*, **1960**, 93, 1402-1406, dizolvată în 50 ml acetonă s-au adăugat 1,5 g K₂CO₃ și 1,06 g (6 mmoli) 5-bromo-3-metil-5H-furan-2-onă, obținută prin bromurarea 3-metil-5H-furan-2-onei conform metodei descrise de G. A. MacAlpine, R.A. Raphael, A. Shaw, A. W. Taylor, H.-J. Wild, *J. Chem. Soc. Chem. Perkin Trans. I*, **1976**, 410-416. Amestecul s-a agitat 24 ore la t.c., apoi s-a evaporat parțial solventul și s-a filtrat precipitatul format obținând-se 0,46 g 3-metil-5-(2-pirimidin-4-il-fenoxi)-5H-furan-2-onă (randament: 39 %), produs solid de culoare galben pal, cu p.t. = 214-217 °C. IR (KBr, ν): 3052, 1780, 1582, 1538, 1504, 1479, 1417, 1331, 1313, 1284, 1240, 1157, 1116, 1088, 1047, 995 cm⁻¹. ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃, δ, ppm): 2,10 (3H, s, CH₃), 6,60-7,63 (7H, H aromatici + H alifatic) 8,70 (1H,d, J = 5,5 Hz, H aromatic), 9,10 (1H, d, J = 1,2 Hz, H aromatic). Analiza elementară pentru 3-metil-5-(2-pirimidin-4-il-fenoxi)-5H-furan-2-ona cu formula C₁₅H₁₂N₂O₃ (268,27): calculat: C 67,16 %, H 4,51 %, N 10,44 %; găsit: C 67,20 %, H 4,61%, N 10,40 %.

Exemplul 1b. Sinteza 3-metil-5-(4-fenilchinazolin-2-il-oxi)-5H-furan-2-onă Ib

La o soluție care conține 1,11 g de 2-hidroxi-4-fenilchinazolină, obținută prin condensarea 2-aminobenzofenonei cu uree, dizolvată în 10 ml DMF s-au adăugat 1,5 g K₂CO₃ și 1,06 g 5-bromo-3-metil-5H-furan-2-onă. Amestecul s-a agitat 24 ore la t.c. În balon s-au adăugat 35 ml apă și 30 ml CH₂Cl₂ și amestecul de reacție s-a trecut într-o pâlnie de separare și s-au separat straturile. Stratul apos s-a mai extras cu 2 x 30 ml clorură de metilen, iar după uscarea extractelor organice și evaporarea solventului s-a filtrat produsul solid și s-a spălat pe filtru cu eter etilic. S-au obținut 0,67 g cristale albe de 3-metil-5-(4-fenilchinazolin-2-il-oxi)-5H-furan-2-onă cu p.t. 225-227 °C (randament: 42 %). IR (KBr, ν): 3088, 1762, 1661, 1606, 1542, 1489, 1445, 1357, 1283, 1225, 1177, 1095, 1040, 994 cm⁻¹. ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃, δ, ppm): 2,12 (3H, s, CH₃), 7,28-7,85 (11H, H aromatici + H alifatic). Analiza elementară pentru 3-metil-5-(4-fenilchinazolin-2-il-oxi)-5H-furan-2-ona cu formula C₁₉H₁₄N₂O₃ (318,34): calculat: C 71,69 %, H 4,43 %, N 8,80 %; găsit: C 71,78 %, H 4,49 %, N 8,87 %.

Exemplu 2. S-a determinat efectul analogilor de strigolactone conform Exemplu 1 asupra producerii de către microorganismele benefice a compușilor care solubilizează fosforul anorganic. S-a realizat un mediu care conține la 1 litru:

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, Darmstadt). Mediul s-a hidrogelificat cu 30% Poloxamer 407 (Pluronic® F127, BASF), s-au adăugat 5 grame de hidroxiapatită (Sigma-Aldrich) și s-a sterilizat. În 99,5 ml mediu sterilizat de mai sus, lichefiat prin răcire la 6°C, s-au adăugat 0,5 ml soluție acetonică, sterilizată prin filtrare, care conținea câte 1, 10, și respectiv 25×10^{-7} moli de compus sintetizat conform Exemplu 1a (**Ia**), și respectiv, compus sintetizat conform Exemplu 1b (**Ib**). Concentrația finală de compuși sintetizați conform Exemplu 1 (**Ia**, **Ib**), în mediu hidrogelificat a fost de 1, 10 și respectiv 25×10^{-8} M.

Mediu s-a distribuit în plăci Petri sterile de unică folosință, diametru 55 mm, înălțime 14,2 mm, cu un singur compartiment. După încălzire și solidificare mediul a fost inoculat central cu 10 μl suspensie 10^5 ufc/ml *Pseudoxanthomonas mexicana* P32, NCAIM (P) B 001414, care are caracteristici cunoscute de solubilizarea a fosforului din sol și de biodisponibilizare a acestui element pentru plantele de cultură (brevet EP 2738267). Plăcile inoculate s-au incubat timp de 60 ore, la temperatura de 28°C. În paralel s-au lucrat și plăci martor, în care un mediu cu hidroxiapatită, nesuplimentat cu analogi de strigolactone conform Exemplu 1, este inoculat și incubat în aceleași condiții. Din 6 în 6 ore s-au preluat imaginile: (i) coloniilor de microorganisme dezvoltate pe mediul hidrogelificat și (ii) zonelor clare, de solubilizare a hidroxiapatitei, cu ajutorul unui sistem de fotodocumentare (G-Box Chemi XRQ, Syngene, Cambridge, Marea Britanie).

Imaginile preluate de sistemul de prelevare a imaginii s-au prelucrat cu ajutorul softului specializat, open acces, Colonyzer (Lawless et al. 2010, *BMC Bioinformatics*, 11, 287). S-au obținut date tabelare în fișiere de calcul Excel (Microsoft Office, Microsoft, Redmond, WA, SUA), separat pentru dezvoltarea coloniilor și pentru formarea plăjei de solubilizare a hidroxiapatitei. Suprafața coloniei s-a raportat la suprafața ariei de solubilizare a fosforului, ca măsura a gradului de amplificare a răspunsului util al tulpinii benefice P32, respectiv solubilizarea fosforului anorganic, sub acțiunea analogilor de strigolactonă încorporați în mediul de cultură. Rezultatele sunt prezentate în tabelul 1, pentru compusul sintetizat conform Exemplu 1a, 3-metil-5-(2-pirimidin-4-il-fenoxi)-5H-furan-2-onei (**Ia**) și în tabelul 2, pentru compusul sintetizat conform Exemplu 1b, 3-metil-5-(4-fenilchinazolin-2-il-oxi)-5H-furan-2-onă (**Ib**).

Tab. 1. Influența compușilor sintetizați conform Ex.1a asupra raportului dintre suprafața coloniei de *Pseudoxanthomonas mexicana* P32 și suprafața ariei de solubilizare a fosforului.

Varianta experimentală	Timp (ore)									
	6	12	18	24	30	36	42	48	54	60
Martor, mediu nesuplimentat compus conform Exemplu 1a (Ia)	1,24	1,52	1,78	2,06	2,29	2,58	2,83	2,98	3,02	3,04
Mediu suplimentat 10 ⁻⁹ M compus conform Exemplu 1a (Ia)	1,48	1,82	2,16	2,44	2,76	3,06	3,38	3,56	3,64	3,68
Mediu suplimentat 10x10 ⁻⁹ M compus conform Exemplu 1a (Ia)	2,02	2,43	2,88	3,29	3,68	4,12	4,52	4,78	4,82	4,84
Mediu suplimentat 25x10 ⁻⁹ M compus conform Exemplu 1a (Ia)	2,23	2,73	3,24	3,72	4,14	4,64	5,09	5,36	5,43	5,47

Tab. 2. Influența compușilor sintetizați conform Ex.1b asupra raportului dintre suprafața coloniei de *Pseudoxanthomonas mexicana* P32 și suprafața ariei de solubilizare a fosforului.

Varianta experimentală	Timp (ore)									
	6	12	18	24	30	36	42	48	54	60
Martor, mediu nesuplimentat compus conf. Exemplu 1b (Ib)	1,24	1,52	1,78	2,06	2,29	2,58	2,83	2,98	3,02	3,04
Mediu suplimentat 10 ⁻⁹ M compus conf. Exemplu 1b (Ib)	1,41	1,74	2,04	2,30	2,64	2,89	3,21	3,38	3,46	3,52
Mediu suplimentat 10x10 ⁻⁹ M compus conf. Exemplu 1b (Ib)	1,92	2,30	2,72	3,14	3,48	3,91	4,28	4,54	4,58	4,62
Mediu suplimentat 25x10 ⁻⁹ M compus conf. Exemplu 1b (Ib)	2,12	2,58	3,07	3,51	3,90	4,44	4,82	5,07	5,16	5,21

Rezultatele demonstrează faptul că analogii de strigolactone sintetizați conform exemplu 1 amplifică răspunsul util al tulpinii benefice P32, respectiv solubilizarea fosforului anorganic. Compusul sintetizat conform Exemplu 1a, 3-metil-5-(2-pirimidin-4-il-fenoxi)-5H-furan-2-onei (Ia) are o activitate biologică de amplificare a răspunsului util al tulpinii benefice P32 superior compusului sintetizat conform Exemplu 1b (Ib), 3-metil-5-(4-fenilchinazolin-2-il-oxi)-5H-furan-2-onă (Ib).

Exemplul 3. A fost determinat efectul analogilor de strigolactone cu structura conform Exemplu 1a (**1a**) și Exemplu 1b (**1b**) asupra producerii de compuși care chelatează fierul. S-a realizat un mediu minimal M9, sărăcit în fier, care conține la 1 litru: Na₂HPO₄ (anhidru) 6 g; KH₂PO₄ 3 g; NaCl 0.5 g; NH₄Cl 1 g; glucoză 2 g; și nouă microelemente, în următoarele concentrații finale: MgSO₄ 1 mM; CaCl₂ 0,1 mM; (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O 3x10⁻⁹M; H₃BO₃ 4x10⁻⁷ M; CoCl₂·6 H₂O 3x10⁻⁸ M; CuSO₄·5H₂O 1x10⁻⁸ M; MnCl₂·4H₂O 8x10⁻⁸ M; ZnSO₄·7H₂O 1x10⁻⁸ M; FeSO₄·7H₂O 1x10⁻⁷ M (Reactivi proveniți de la Merck, Darmstadt). S-a realizat mai întâi mediul cu principalele săruri și glucoza și s-a adus pH la 7,4 cu NaOH. Mediul minimal M9 a fost hidrogelifiat cu 30% Poloxamer 407 (Pluronic® F127, BASF), lichefiat prin răcire și s-a sterilizat prin autoclavare, la 121°C, timp de 20 min. Apoi s-au adăugat micro-elementele, prin diluarea unor soluții stoc sterilizate prin ultrafiltrare, la mediu hidrogelifiat cu Poloxamer 407. Apa folosită a fost apă miliQ, produsă prin osmoză inversă și ultrafiltrare (Mili-Q System, Merck Millipore). Din toată sticlăria folosită s-au înlăturat ionii de fier, conform protocolului descris de Cox, 1994, *Method Enzymol.*, 235, 315–329, prin spălări cu acid clorhidric și apă ultrapură.. În 99,5 ml mediu sterilizat de mai sus, lichefiat prin răcire la 6°C, s-au adăugat 0,5 ml soluție acetonică, sterilizată prin filtrare, care conținea câte 1, 10, și respectiv 25x10⁻⁷ moli de compus sintetizat conform Exemplu 1a (**1a**), și respectiv, compus sintetizat conform Exemplu 1b (**1b**). Concentrația finală de compuși sintetizați conform Exemplu 1 (**1a**, **1b**), în mediu hidrogelifiat a fost de 1, 10 și respectiv 25x10⁻⁸ M.

Mediu s-a distribuit în plăci Petri sterile de unică folosință, diametru 55 mm, înălțime 14,2 mm, cu un singur compartiment. După încălzire și solidificare mediul a fost inoculat central cu o rondelă calibrată de miceliu, de 1 mm diametru, prelevată aseptically dintr-un gazon format de tulpina *Rhizopus oligosporus* ATCC 22959, cunoscută ca fiind producătoare de siderofori de tip carboxilat (Milagres et al. 1999. *Journal of Microbiological Methods*, 37, 1-6.). Plăcile inoculate s-au incubat timp de 96 ore, la temperatura de 28°C. În paralel se lucrează și plăci martor, în care un mediu M9 sărăcit în fier, nesuplimentat cu analogi de strigolactone conform Exemplu 1, este inoculat și incubat în aceleași condiții. După 96 ore peste mediul M9 hidrogelifiat s-a depus un mediu detector Chrome azurol S (CAS) conform metodei descrise de Pérez-Miranda et al. 2007 (*Journal of Microbiological Methods*, 70, 127-131). S-au preluat imaginile: (i) coloniilor de

microorganismele dezvoltate pe mediul hidrogelifat și (ii) zonelor clare, de solubilizare a hidroxiapatitei, cu ajutorul unui sistem de fotodocumentare (G-Box Chemi XRQ, Syngene, Cambridge, Marea Britanie). Imaginile preluate de sistemul de prelevare a imaginii s-au prelucrat cu ajutorul softului specializat, open acces, Colonyzer (Lawless et al. 2010, *BMC Bioinformatics*, 11, 287). Compusul conform Exemplu 1a (**Ia**), în concentrații de 1, 10 și, respectiv, 25×10^{-9} M a amplificat sinteza sideroforilor în tulpina *Rhizopus oligosporus* ATCC 22959, cu 12,8%, 28,4% și, respectiv, 52,7%. Compusul conform Exemplu 1b (**Ib**), în concentrații de 1, 10 și, respectiv, 25×10^{-9} M a amplificat sinteza sideroforilor în tulpina *Rhizopus oligosporus* ATCC 22959, cu 10,6%, 23,8% și, respectiv, 41,5%.

Exemplu 4. Au fost realizate experimente de testare a influenței analogilor de strigolactone cu structura conform Exemplu 1 asupra biosintezei de către tulpina *Trichoderma asperelum* Td36b NCAIM P(F) 001434 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 de analogi de strigolactone, cu structură conform Exemplu 1a (**Ia**), respectiv Exemplu 1b (**Ib**), aplicați în concentrații de 5×10^{-8} 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 analogi de strigolactone. Mediile de cultură cu tulpina Td36b 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). În filtrate 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 27,3% în prezența analogului de strigolactone, cu structură conform Ex. 1a (**Ia**), și, respectiv cu 22,6%, conform ex. 1b (**Ib**), aplicați în concentrație de 5×10^{-8} 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 prezență de analogi de strigolactone, cu structură conform Exemplu 1a (**Ia**), respectiv Exemplu 1b (**Ib**), aplicați în concentrații de 5×10^{-8} 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 analogi de strigolactone. 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 – mediu 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.

Producerea de 6-PP este amplificată cu 23,2% în prezența analogului de strigolactone **Ia**, și, respectiv, cu 18,7% în prezența analogului de strigolactone **Ib**, aplicați în concentrație de $5 \times 10^{-8} \text{M}$, în mediul de cultivare a tulpinii Td36b.

Exemplu 5. A fost testată influența analogilor de strigolactone, **Ia**, și, respectiv, **Ib**, asupra eliberării de poliamine cu rol de creștere a rezistenței la stresurile abiotice, de către microorganismele benefice din rizosfera plantelor de cultură. S-a utilizat bacteria *Brevibacillus parabrevis* B50 NCAIM (P) B 001413 (cerere brevet EP2765185 A2). Bacteriile au fost crescut pe mediu minimal cu următoarea compoziție (g/l): glucoză 10 g; L-alanină 890 mg (10 mM); L- acid glutamic, 1470 mg (10 mM); L-asparagină, 1320 mg (10 mM); L-lizină 1460 mg (10 mM); L-arginină 1740 mg (10 mM), amestec de săruri minerale, 100 ml. Amestecul de săruri minerale folosit a fost realizat prin dizolvarea la 1 litru a K_2HPO_4 , 30 g; KH_2PO_4 , 10 g; NH_4Cl , 5 g; NH_4NO_3 , 1 g; Na_2SO_4 , 1 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 100mg; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 10 mg; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 mg; CaCl_2 , 5 mg și ajustarea pH-ului la 6,8-7,0 cu acid fosforic 1 M. S-au preparat separat soluții de: glucoză 25 g/l, amestec de aminoacizi 25 mM într-un litru, amestec de săruri minerale lichid. S-au sterilizat separat fiecare din aceste soluții la 121°C, timp de 20 min și apoi au fost reunite aseptice 400 ml de soluție glucoză 25 g/l, 400 ml de soluție amestec de aminoacizi 25 mM/l, 100 ml amestec de săruri minerale. S-a ajustat pH-ul la 6,8-7,0 cu acid fosforic 1 M și s-a completat la 1 litru. Mediul a fost apoi distribuit în flacoane de 500 ml, câte 100 ml. În probele de testare s-a adăugat analogi de strigolactone, **Ia**, și, respectiv, **Ib**, aplicați în concentrație de $5 \times 10^{-8} \text{M}$, soluție acetonică. În probele martor s-a introdus aceeași cantitate de acetonă. Flacoanele cu mediu lichid, suplimentat cu analog de strigolactone sau martor, au fost incubate circa 24 ore pe agitator orbital, până la atingerea unei densități optice la 600 nm $\text{OD}_{600} = 1,22$, corespunzând la aprox. $1,18 \cdot 10^8$ ufc/ml, ceea ce

reprezintă sfârșitul fazei exponențiale de dezvoltare. La atingerea acestui prag s-a separat cultura bacteriană prin centrifugare la 5000xg pentru 20 min la 4°C. În supernatantul culturii s-au determinat polyaminele, conform metodei descrise de Slocum et al. 1989, *Plant Physiology*, 89, 512-517. Prezența în mediul de cultură a analogilor de strigolactone, **Ia**, și, respectiv, **Ib**, în concentrație de $5 \times 10^{-8} \text{M}$, a determinat creșterea cu 42,8%, și, respectiv cu 35,4%, a producerii de poliamine de către bacteriile *Brevibacillus parabrevis* B50.

Exemplu 6. A fost realizat un experiment pentru a stabili efectul analogilor de strigolactone, cu structură conform Exemplu 1a (**Ia**), respectiv Exemplu 1b (**Ib**), în eliberarea biosiliciului prin descompunerea materialului vegetal. S-a preparat un mediu minimal M9 - pulbere micronizată de tulpini porumb. Mediul M9 a avut următoarea compoziție (la 1 litru): Na_2HPO_4 (anhidru) 6 g; KH_2PO_4 3 g; NaCl 0.5 g; NH_4Cl 1 g, 10 g pulbere micronizată de tulpini de porumb, *Zea mays*, pre-tratate prin expandarea fibrelor cu amoniac, și nouă microelemente, în următoarele concentrații finale: MgSO_4 1 mM; CaCl_2 0,1 mM; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ $3 \times 10^{-9} \text{M}$; H_3BO_3 $4 \times 10^{-7} \text{M}$; $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ $3 \times 10^{-8} \text{M}$; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ $1 \times 10^{-8} \text{M}$; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ $8 \times 10^{-8} \text{M}$; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $1 \times 10^{-8} \text{M}$; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $1 \times 10^{-6} \text{M}$. (Reactivi proveniți de la Merck, Darmstadt). S-a realizat mai întâi mediul cu principalele săruri și pulberea micronizată de tulpini de porumb, și s-a adus apoi la pH 7,4 cu NaOH.

Mediul s-a hidrogelifiat cu Poloxamer 407 / Pluronic® F127 (BASF). S-au introdus 30 g de Poloxamer 407 în 70 ml mediu minimal M9, care conținea numai macronutrienții, și s-a lăsat peste noapte la frigider pentru hidratare și omogenizare. Poloxamerul 407 are proprietăți de gelifiere termoreversibile. Soluțiile de 30% Poloxamer 407 sunt lichide la temperaturi mai mici de 15°C și se solidifică la temperaturi mai mari de 15°C. În mediul minimal gelifiat cu poloxamer, răcit la 4°C, s-au omogenizat 1 g de pulbere micronizată de tulpini de porumb, *Zea mays*, pre-tratate prin expandarea fibrelor cu amoniac. Mediul hidrogelifiat s-a sterilizat prin autoclavare, și apoi s-au adăugat micro-elementele, prin diluarea unor soluții stoc sterilizate prin ultrafiltrare, adăugate în volumele necesare pentru atingerea concentrației finale în mediul de cultură. În 99,5 ml mediu sterilizat de mai sus, lichefiat prin răcire la 6°C, s-au diluat 0,5 ml soluție acetonică, sterilizată prin filtrare, care conținea câte 1, 10, și respectiv $25 \cdot 10^{-7}$ moli cu structură conform Exemplu 1a (**Ia**), respectiv Exemplu 1b (**Ib**). Concentrația finală de compus **Ia**, și, respectiv, **Ib**, în mediu hidrogelifiat, a fost de 1, 10 și respectiv $25 \cdot 10^{-8} \text{M}$. Mediu s-

a distribuit în plăci Petri sterile de unică folosință, diametru 55 mm, înălțime 14,2 mm, cu un singur compartiment. După încălzire și solidificare mediul a fost inoculat central cu o rodea de 1 mm din gazonul tulpinii *Trichoderma harzianum* Td50b, NCAIM (P) F 001412, recunoscută pentru capacitatea sa de a elibera biosiliciu din materialul vegetal.

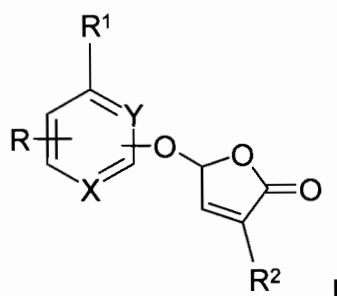
Plăcile inoculate s-au incubat timp de 120 ore, la temperatura de 24°C. În paralel s-au lucrat și plăci martor, în care un mediu M9 - pulbere micronizată de tulpini porumb - poloxamer, nesuplimentat cu analogi de strigolactone este inoculat și incubat în aceleași condiții.

După 120 ore s-au evidențiat speciile moleculare de siliciu solubil eliberate cu acid molibdenic. S-a aplicat câte 5 ml soluție molibdat de amoniu, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, 0,06 M în acid sulfuric 1 M. S-a agitat placa prin mișcare ușoară timp de 20 secunde și s-a incubat la temperatura camerei timp de 10 min. S-au adăugat 10 ml acid tartic 1,33 M. S-a incubat la temperatura camerei alte 10 min, după care s-au adăugat 10 ml soluție acid ascorbic 0,071 M. S-a incubat în final timp de 60 min la temperatura camerei pentru dezvoltarea culorii. În final s-au preluat imaginile: (i) coloniilor de microorganisme dezvoltate pe mediul hidrogelifat și (ii) zonelor colorate, în care acidul ortosilicic eliberat din materialul vegetal a interacționat cu molibdatul de amoniu. S-a utilizat un sistem de fotodocumentare (G-Box Chemi XRQ, Syngene, Cambridge, Marea Britanie). Imaginile preluate de sistemul de prelevare a imaginii s-au prelucrat cu ajutorul softului specializat, open acces, Colonyzer (Lawless et al. 2010, *BMC Bioinformatics*, 11, 287).

Rezultatele demonstrează faptul că analogul de strigolactone **Ia**, aplicat în concentrații de 1, 10, și respectiv 25×10^{-7} M, amplifică cu 16,27; 35,34 și respectiv, 57,8%, răspunsul util al tulpinii *Trichoderma harzianum* Td50b, NCAIM (P) F 001412, respectiv eliberarea biosiliciului din materialul vegetal. Analogul de strigolactone **Ib**, aplicat în concentrații de 1, 10, și respectiv 25×10^{-7} M, amplifică cu 12,73; 28,73 și respectiv, 38,6%, răspunsul util al tulpinii *Trichoderma harzianum* Td50b, NCAIM (P) F 001412, respectiv eliberarea biosiliciului din materialul vegetal.

Revendicări

1. Compuși sintetici cu structură similară strigolactonelor conform invenției **caracterizați prin aceea că** au o structură reprezentată prin formula generală I,



în care:

X, Y sunt atomi de carbon, R este un atom de hidrogen, iar R¹ este un radical fenil, piridil, 2-pirimidinil sau 4-pirimidinil

X și Y sunt unul sau ambii atomi de azot, R este o grupă 5,6-benzo sau 5,6-benzo substituită cu un atom de halogen, iar R¹ este un radical fenil

R² este o grupă alchil C1-C4, trifluorometil, hidroxil, nitro, carboxil sau carboxil substituit cu o grupă alchil C1-C4, sau un atom de halogen.

2. Compuși sintetici cu structură similară strigolactonelor conform revendicării 1, **caracterizați prin aceea că** au de preferință structură de 3-metil-5-(2-pirimidin-4-il-fenoxi)-5H-furan-2-onă și 3-metil-5-(4-fenilchinazolin-2-il-oxi)-5H-furan-2-onă.

3. Compușii sintetici cu o structură similară strigolactonelor conform revendicării 1, **caracterizați prin aceea că** determină efecte biostimulante asupra plantelor de cultură datorită amplificării unor răspunsuri utile în microorganismele benefice din rizosfera plantelor de cultură: solubilizarea fosforului anorganic și organic; producerea de siderofori; biosinteza de compuși cu efect de stimulare a creșterii plantelor; eliberarea de poliamine cu rol de creștere a rezistenței la stresurile abiotice.

4. Compușii sintetici cu o structură similară strigolactonelor conform revendicării 1, **caracterizați prin aceea că** intensifică producerea de enzime implicate în eliberarea biosiliciului prin descompunerea materialului vegetal.

5. Procedeu de utilizarea compușilor sintetici cu o structură similară strigolactonelor, **caracterizat prin aceea că** se aplică în dozele necesare atingerii unor concentrații cuprinse între 1 – 25x10⁻⁸ M, pentru a amplifica răspunsurile utile ale unor tulpini de microorganismele benefice din rizosfera plantelor de cultură.

