



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2015 00942**

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

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/04/2020** BOPI nr. **4/2020**

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

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

(72) Inventatori:
• **OANCEA FLORIN, STR.PAȘCANI NR.5,
BL.D 7, SC.E, ET.2, AP.45, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **RĂUT IULIANA,
ALEEA BARAJUL BISTRIȚA NR.12, BL.4,
SC.1, ET.4, AP.54, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **CĂLIN MARIANA,
STR. CETATEA DE BALTĂ NR. 41, BL. 07A,
SC. 2, ET. 6, AP. 91, 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:
**RO 128889 A1; RO 127470 A2;
EVGENIA DOR, DANIEL M. JOEL,
YORAM KAPULNIK, HINAIT KOLTAI,
JOSEP HERSHENHORN, "THE
SYNTHETIC STRIGOLACTONE GR24
INFLUENCES THE GROWTH PATTERN OF
PHYTOPATHOGENIC FUNGI", PLANTA,
VOL. 234, PP. 419-427, 2011**

(54) **METODĂ DE BIOTESTARE A ANALOGILOR
DE STRIGOLACTONE**



RO 131933 B1

1 Prezenta invenție se referă la o metodă de biotestare a analogilor de strigolactone
în privința capacității acestora de a induce/stimula producerea compușilor volatili bioactivi
3 în microorganismele benefice asociate plantelor de cultură, destinat selectării celor mai
eficienți analogi sintetici, pentru aplicarea ulterioară a acestora în cadrul sistemelor
5 tehnologice agricole pentru o mai bună exploatare a microbiomului benefic plantelor.

Sunt cunoscute diferite procedee prin care au fost selectați diferiți analogi sintetici de
7 strigolactone pentru utilizări în agricultură. Denumirea generică de strigolactone se referă la
o serie de produși de metabolism secundar, derivați caretonoidici sintetizați de rădăcinile
9 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,
11 **Annual Review of Phytopathology, 48: 93-117**).

RO 128889 B1 descrie o tulpină de *Trichoderma harzianum* Td50b care prezintă
13 antagonism față de unii agenți patogeni ai culturilor de plante datorită sintetizării de compuși
volatili cu activitate antifungică, precum și un procedeu de selecție rapidă a acestor tulpini
15 de microorganisme antagoniste față de agenții fitopatogeni, cum ar fi *Rhizoctonia solanii* și
Fusarium graminearum. Procedeu presupune parcurgerea următoarelor etape: distribuția
17 aseptică a unui mediu agarizat, care conține, ca principală sursă de carbon, un derivat de
celuloză, într-o placă cu 24 godeuri; inocularea mediului agarizat cu 5 izolate de testat,
19 distribuite randomizat, și menținerea unor godeuri martor neinoculate; acoperirea cu o folie
de plastic sterilă, care permite schimbul de gaze; incubarea timp de 3 zile la 25°C;
21 depunerea plăcii cu 24 godeuri, în care s-au dezvoltat izolatele de testat, peste o altă placă
cu 24 godeuri cu mediu agarizat, în care a fost crescută timp de 2 zile o ciupercă
23 microscopică, agent fitopatogen, față de care se testează antagonismul izolatelor; incubarea
timp de 5 zile la 25°C a plăcilor reunite, cu placa cu mediu cu izolate de *Trichoderma*
25 deasupra plăcii cu ciuperca fitopatogenă de testat, separate între ele de folia de plastic ce
permite schimbul de gaze; determinarea creșterii ciupercii fitopatogene test prin analiza
27 imaginii plăcii de microtitrare preluate de un sistem de fotodocumentare, și calcularea
procentului de inhibiție cu ajutorul formulei: $(A1-An)/A1 \times 100$, unde A1 este suprafața
29 acoperită de agentul fitopatogen în varianta martor netratat, iar An este suprafața acoperită
de agentul fitopatogen în varianta în care a fost confruntat cu compușii volatili produși de
31 unul dintre izolatele de testat; analiza statistică a rezultatelor prin analiza variantei și
identificarea eventualelor izolate active, datorită producerii de compuși volatili; inundarea
33 mediului agarizat pe care au crescut izolatele de *Trichoderma* cu o soluție de Roșu de Congo
0,1% și, după 5 min, înlăturarea soluției de roșu de Congo și spălarea cu o soluție NaCl 1 M
35 pentru 20 min; evidențierea zonelor clare de celuloză în jurul coloniilor de *Trichoderma*
producătoare de celulaze.

RO 127470 A2 descrie un procedeu cu randament înalt în trierea izolatelor de
37 microorganisme antagoniste fitopatogenilor, prin urmărirea reacției celor din urmă atunci
când sunt expuși la compuși care difuzează, proveniți din culturile mai multor izolate testate.
39 În cadrul procedurii, mediile lichide specifice diferitelor microorganisme antagoniste
fitopatogenilor de testat au fost hidrogelificate cu pelete de poloxamer 407/Pluronic
41 F127(BASF AG), lăsate peste noapte pentru hidratare, omogenizate, sterilizate prin
autoclavare la 121°C timp de 20 min și răcite pentru lichefiere până la 4°C.
43

În lucrarea "**The synthetic strigolactone GR24 influences the growth pattern of
45 phytopathogenic fungus**" - Evgenia Dor, Daniel M. Joel, Yoram Kapulnik, Hinanit Koltai,
Joseph Hershenhorn - *Planta* (2011) 234: 419-427 este demonstrată influența analogilor
47 de strigolactone, cu exemplificare pe soluție acetonică de GR24 de diferite concentrații,
omogenizată pe un mediu de cultură agarizat, asupra dezvoltării microorganismelor
49 fitopatogene (*Fusarium sp.*, *Sclerotinia sp.*).

RO 131933 B1

Steinkellner et al. 2007 (Molecules, 12, 1290-1306) nu au evidențiat ramificări hifale ale unei tulpini de *Trichoderma* sub acțiunea GR24, GR24 fiind presupus a difuza dintr-un disc îmbinat cu soluție acetonică. Dar în cazul ciupercilor microscopice asociate/benefice pentru plante, care au și un stadiu saprofit de dezvoltare (cum sunt, de exemplu, tulpinile de *Trichoderma*), efectul exo-semnalelor de rizosferă nu este obligatoriu să se reflecte în modificări morfologice. Ciupercile de micoriză sunt obligat biotrofe, deci germinarea și dezvoltarea lor ulterioară (inclusiv prin ramificări hifale) este determinată de prezența rădăcinilor plantelor gazdă și a exo-semnalelor produse de acestea, și mai ales de acele exo-semnale care indică un deficit/o situație pentru a cărui compensare/contracurare plantele sunt pregătite să realizeze asociații mutualiste/simbiotice. La aceste microorganisme obligat biotrofe pe sistemul radicular al plantelor gazdă, exo-semnalele produse de sistemul radicular determină modificări morfologice, dar la microorganismele benefice/asociate plantelor de cultură care au competență saprofită, exo-semnalele au un rol chemo-attractant sau de inducere a unor caracteristici biochimice/fiziologice (prin activarea unor gene care codifică caractere implicate în interacția cu plantele).

Documentul **US 8101171 B2** prezintă biotestarea și utilizarea strigolactonelor naturale, strigoi, alectrol, sorgolactone, orobanchol, sau a analogilor lor sintetici, GR7, GR24, Nijmegen1, dimetilsorgolactone, pentru ameliorarea interacției simbiotice dintre ciupercile producătoare de endo-micorize (AM) și plantele cultivate. Biotestul utilizat implică determinarea intensificării respirației sporilor de micoriză sub acțiunea analogilor de strigolactone. O variantă mai simplă de biotestare a acțiunii analogilor de strigolactone asupra sporilor ciupercilor de endomicoriză este cea de determinare a inducerii ramificării hifale (**Akiyama et al. 2005, Nature, 435, 824-827**).

US 8980795 B2 se referă la analogi de strigolactone obținuți prin sinteză biochimică *in vitro* și la utilizările acestor compuși pentru a determina germinarea suicidară a semințelor de buruieni parazite (în absența rădăcinilor plantelor gazdă/capcană pentru semințele buruienilor parazite). Biotestul utilizat implică germinarea semințelor pre-condiționate de *Striga hermonthica*.

Brevetul **FR 2930402 B1** descrie un procedeu de biotestare și 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 cel puțin unei ramificații a ramurilor plantelor, 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-dihidroizo-indol-2-il)-3-(4-metil-5-oxo-2,5-dihidrofuran-2-iloxi) metil acrilat (Nijmegen 1), dimetilsorgolactone, sau amestecuri ale acestora.

Un dezavantaj al biotestelor realizate pentru determinarea efectelor strigolactonelor asupra diferitelor microorganisme este determinat de utilizarea mediilor agarizate, semnificativ hidrofile, pentru a determina efectul biologic determinat de difuzia/încorporarea în mediu a unor compuși puternic hidrofobi. Uniformizarea unui compus hidrofob într-un mediu agarizat implică menținerea o perioadă de timp lungă, la o temperatură de peste 50°C, a unor compuși bioactivi care au, prin definiție, o legătură labilă enol-eter între inelele aromatice C și D, strict necesară pentru activitatea biologică (**Smith și Waters, 2012, Current Biology, 22: R924-R927**). Această modalitate de înglobare a strigolactonelor hidrofobe în medii agarizate este asociată cu un semnificativ risc de distrugere a unor compuși foarte dificil de sintetizat, cu labilitate mare și nu garantează distribuția uniformă a strigolactonelor.

RO 131933 B1

1 Strigolactonele au și rolul de exo-semnale cu rol în formarea asociațiilor mutualiste,
ca un „strigăt de ajutor” în rizosferă (López-Ráez et al. 2011, *Botany*, **89**: 513-522). În cazul
3 unui microorganism benefic pentru plantele de cultură, *Pseudomonas putida* KT2440, s-a
demonstrat un efect chemoatractant și de favorizare a colonizării rizosferei sub acțiunea
5 benzoxazinoidele (de exemplu DIMBOA, 2,4-dihidroxi-7-metoxi-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-
onă), compuși produși de graminee ca răspuns la diferitele forme de stres (Neal et al. 2012,
7 PLoS ONE 7, e35498). În cazul aceleași bacterii benefice plantelor, *P. putida* KT2440, s-a
demonstrat o amplificare a expresiei genelor implicate în colonizarea rizosferei și în
9 stimularea plantelor, sub influența exo-semnalele specifice rizosferei plantelor (Fernández
et al. 2013, *Microbial Biotechnology*, **6**, 307-313).

11 Sunt necesare, deci, bioteste prin care să se evidențieze efectul strigolactonelor/
analogilor de strigolactone asupra exprimării unor caracteristici ale microorganismelor,
13 fiziologice/biochimice, benefice pentru plante. Compuși volatili produși de microorganisme
au fost implicați în: inducerea rezistenței sistemice de către rizobacterii (Farag et al. 2013.
15 *Journal of Chemical Ecology*, **39**: 1007-1018); inhibarea agenților fitopatogeni (Kai et al.
2007, *Archives of Microbiology*, **187**: 351-360); biostimularea plantelor (Lopez-Bucio et
17 al. 2015, *Scientia Horticulturae*, **196**: 109-123).

19 Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este de a utiliza o metodă de selecție
rapidă a analogilor de strigolactone, responsabili de stimularea producerii de compuși volatili
bioactivi, de către microorganismele benefice plantelor.

21 Este un alt obiect al acestei invenții de a descrie un mediu de gelifiere amfifil, care
să permită o distribuire a strigolactonelor în mediul de testare uniformă, rapidă, fără risc de
23 degradare.

Metoda conform invenției presupune parcurgerea următoarelor etape:

25 - distribuirea aseptică la rece, la temperaturi menținute sub 10°C, a unui mediu de
cultură pentru microorganisme, care este hidrogelifiat tribloc co-polimer, format dintr-un bloc
27 central hidrofob de polioxipropilenă, flancat de două blocuri hidrofile de polioxietilenă, într-o
placă cu 24 godeuri;

29 - omogenizarea la rece, la temperaturi menținute sub 10°C, a soluțiilor de analogi de
strigolactone, sterilizate prin ultrafiltrare, în mediul de cultură lichefiat din 12 godeuri, din cele
31 24 godeuri ale plăcii de titrare;

33 - inocularea mediului agarizat cu 3 tulpini de microorganisme, cunoscute pentru
acțiunea lor biostimulantă datorită producerii de compuși volatili, distribuite randomizat în trei
35 repetiții, pe medii care conțin strigolactone și pe medii care nu conțin strigolactone, și
menținerea unor godeuri martor neinoculate;

37 - acoperirea plăcii cu 24 godeuri cu o folie de plastic sterilă care permite schimbul de
gaze și incubarea timp de 48 h la 25°C;

39 - depunerea plăcii cu 24 godeuri în care s-au dezvoltat izolatele de testat peste o altă
placă cu 24 godeuri pe care se află sistemul biologic față de care se testează compuși volatili
biologic activi;

41 - incubarea timp de 2...7 zile la 25°C a plăcilor reunite, cu placa cu tulpinile cu mediu
hidrogelifiat care conține strigolactone deasupra plăcii pe care se află sistemul biologic față
43 de care se testează compuși volatili biologic activi, separate între ele de folia de plastic care
permite schimbul de gaze;

45 - determinarea efectului asupra sistemului biologic prin analiza imaginii plăcii de
microtitrare cu 24 godeuri, preluate de un sistem de fotodocumentare, și calcularea
47 procentului de efect biologic, de stimulare sau inhibare, cu ajutorul formulei: $(A_1 - A_n) / A \times 100$,
unde A_1 este suprafața sistemului biologic în varianta martor neinoculat, iar A_n este suprafața
49 sistemului biologic în varianta în care a fost confruntat cu compușii volatili produși de
microorganisme;

RO 131933 B1

- analiza statistică a rezultatelor prin analiza variantei și identificarea analogilor de strigolactone care au produs modificări ale capacității tulpinilor de a biosintetiza compuși volatili bioactivi.	1
Soluția de analog de strigolactonă este distribuită în concentrații finale cuprinse între 10^{-7} și 10^{-9} M.	3
Sistemul biologic este reprezentat de ciuperci microscopice, agenți fitopatogeni, culturi de 2 zile provenite din inocularea a 10^7 propagule/ml pe mediu agarizat, față de care se testează efectul strigolactonelor în ceea ce privește producerea de volatili cu efect inhibitor de către microorganismele benefice, timp de 2 zile, sau plantule de <i>Arabidopsis thaliana</i> sau grâu, provenite din semințe germinate aseptice timp de 3 zile, față de care se testează efectul biostimulator al compușilor volatili produși de microorganismele benefice sub acțiunea strigolactonelor, pentru o perioadă de timp de 7 zile.	5
Metoda conform invenției prezintă următoarele avantaje:	7
- asigură o stabilitate crescută pentru strigolactonele distribuite la rece, la temperaturi de sub 10°C , într-un mediu hidrogelificat cu tribloc co-polimer, format dintr-un bloc central hidrofob de polioxipropilenă, flancat de două blocuri hidrofile de polioxietilenă, care are proprietăți de gelifiere inversă, fiind lichid la temperaturi scăzute, și sub formă de gel la temperatura camerei;	9
- determină o distribuție uniformă a strigolactonelor hidrofobe în structura amfifilă a agentului de hidrogelifiere, cu o mobilitate superioară la interfața dintre structurile micelare specifice gelurilor de tribloc co-polimer, format dintr-un bloc central hidrofob de polioxipropilenă, flancat de două blocuri hidrofile de polioxietilenă;	11
- permite randamente înalte de screening, pentru un interval mare de concentrații ale analogilor de strigolactone în mediu de cultură;	13
- generează date prin care se selectează cei mai eficienți analogi sintetici de strigolactone, utilizabili în cadrul sistemelor tehnologice agricole pentru o mai bună exploatare a microbiomului benefic plantelor;	15
- detectează influența analogilor de strigolactone asupra producerii de compuși volatili, care au fie acțiune de biostimulare a dezvoltării plantelor, fie acțiune de inhibare a creșterii agenților fitopatogeni.	17
În continuare, sunt prezentate exemple de realizare a invenției, care o ilustrează fără a o limita.	19
Exemplul 1	21
Se prepară un decoct de cartofi, prin fierberea a 200 g de cartofi, spălați bine de resturile de pământ, dar nedecojiți, și tăiați în cuburi cu latura de aproximativ 1 cm, în aproximativ 1 l de apă distilată, pentru 30 min. Se filtrează decoctul prin pânză de tifon dublă și se adaugă 20 g de glucoză (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SUA). Se aduce la 1000 ml cu apă distilată. Mediul se hidrogelifică prin depunerea unor pelete dintr-un tribloc co-polimer, care este format dintr-un bloc central hidrofob de polioxipropilenă, flancat de două blocuri hidrofile de polioxietilenă (Poloxamer 407/Pluronic® F127, BASF AG, Ludwigshafen, Germania). Se introduc 30 g de Poloxamer 407 în 70 ml mediu decoct de cartof-dextroză și se lasă peste noapte la frigider pentru hidratare și omogenizare. Mediul se sterilizează prin autoclavare la 121°C timp de 20 min, după care se răcește pentru lichefiere până la 4°C . 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 .	23
Mediul se distribuie aseptice la rece, la temperaturi care sunt menținute sub 10°C , într-o placă cu 24 godeuri (CELLSTAR®, Greiner Bio-One, Kremsmunster, Austria). În fiecare placă se distribuie câte 2,97 ml mediu lichefiat la rece. Se omogenizează în mediu.	25
	27
	29
	31
	33
	35
	37
	39
	41
	43
	45
	47

RO 131933 B1

1 Se omogenizează la rece câte 30 µl de soluție acetonică de 10^{-5} moli de GR24 -
2 (3aR*,8bS*,E)-3-(((R*)-4-metil-5-oxo-2,5-dihidrofuran-2-iloxi)metilen)-3,3a,4,8b-tetrahidro-2H-
3 indeno [1,2-b]furan-2-onă (Chiralix, Nijmegen, Olanda). Se menține la temperaturi sub
4 10°C , iar soluția acetonică se omogenizează în 12 din cele 24 godeuri ale plăcii de titrare (un
5 godeu da, un godeu nu). În celelalte godeuri sunt distribuiți câte 30 µl de acetonă, care nu
6 conțin analogi de strigolactone.

7 Se inoculează mediul agarizat cu câte 30 µl conținând 10^7 propagule per ml, din
8 următoarele tulpini de microorganisme, cunoscute pentru acțiunea lor biologică datorită
9 producerii de compuși volatili: *Trichoderma asperelum* Td36b, NCAIM (P) F 001434,
10 *Brevibacillus parabrevis* B50, NCAIM (P) B 001413, *Trichoderma harzianum* Td50b, NCAIM
11 (P) F 001412, și la care s-a identificat un răspuns pozitiv la analogii de strigolactone. Orice
12 alte tulpini de microorganisme care au capacitatea de a produce compuși volatili și răspund
13 pozitiv la strigolactone se pot utiliza în cadrul acestui procedeu.

14 Tulpinile se inoculează randomizat în trei repetiții, pe medii care conțin strigolactone
15 și pe medii care nu conțin strigolactone, cu menținerea unor godeuri martor neinoculate. Se
16 acoperă placa cu 24 godeuri cu o folie de plastic sterilă care permite schimbul de gaze
17 (Breathe-Easy™ sealing membrane, Z380059 Sigma, Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, SUA).
18 Se incubează placa cu microorganismele inoculate timp de 48 h la 25°C .

19 În paralel, se cultivă 2 zile fitopatogenul test *Rhizoctonia solanii* ATCC 66873
20 (American Type Culture Collection, Manassas, VA, SUA, aparținând grupului de anastomoză
21 hifală AG-4), pe o altă placă de microtitrare cu 24 godeuri, fiecare conținând 3 ml de mediu
22 cartof - glucoza - agar, inoculat cu 0,03 ml de suspensie de *R. solanii* conținând 10^7
23 propagule per ml (suspensie reconstituită din miceliu cultivat pe mediu cartof - glucoza
24 lichid).

25 Se depune placa cu colonii de tulpini de microorganisme, cunoscute pentru acțiunea
26 lor biologică datorită producerii de compuși volatili, peste placa cu 24 godeuri pe care se află
27 cultura de *R. solanii*, față de care se testează compuși volatili biologic activi, cu menținerea
28 foliei de plastic care permite schimbul de gaze. Se incubă cele două plăci reunite timp de
29 2 zile la 25°C .

30 După 2 zile se preiau imaginile coloniilor de *R. solanii* dezvoltate în fiecare godeu,
31 cu ajutorul unui sistem de fotodocumentare (G-Box Chemi XRQ, Syngene, Cambridge,
32 Marea Britanie). Imaginile preluate de sistemul de prelevare a imaginii se prelucrează cu
33 ajutorul softului specializat, open acces, Colonyzer (**Lawless et al. 2010, BMC**
34 **Bioinformatics, 11, 287**). Se obțin date tabelare în fișiere de calcul Excel (Microsoft Office,
35 Microsoft, Redmond, WA, SUA), care se prelucrează prin analiza variantei.

36 Din valorile medii relevante statistic se calculează procent de efect biologic, de
37 inhibare, cu ajutorul formulei: $(A_1 - A_n)/A_1 \times 100$, unde A_1 este suprafața ocupată de colonia
38 de *R. solanii* în varianta confruntată cu martor neinoculat, iar A_n este suprafața ocupată de
39 colonia de *R. solanii* în varianta în care a fost confruntat cu compușii volatili produși de
40 microorganisme.

41 Se analizează statistic rezultatele și se identifică (eventualele) modificări ale
42 capacității tulpinilor de a biosintetiza compuși volatili bioactivi.

43 Exemplul 2

44 Se lucrează la fel ca în exemplul 1, cu următoarele diferențe: utilizează o concentrație
45 de 10^{-6} M de GR24, rezultând o concentrație finală în mediu de 10^{-8} M, iar sistemul biologic
față de care se face testarea este o cultură de *Fusarium graminearum* DSM4527.

RO 131933 B1

Exemplul 3	1
Se lucrează la fel ca în exemplul 1, cu singura diferență că se utilizează o concentrație de 10^{-7} M de 3-[[[(2,5-dihidro-3-metil-2-oxo-5-furanil)oxi] metilen]-3,3a,6,6a-tetrahidrociclopenta-[b]furan-2-one (GR7), rezultând o concentrație finală în mediu de 10^{-9} M.	3
Exemplul 4	5
Se lucrează la fel ca în exemplul 1, cu singura diferență că se utilizează o concentrație de 10^{-5} M de analog de strigolactonă 3-metil-5-(4-fenilchinazolin-2-il-oxi)-5H-furan-2-onă, rezultând o concentrație finală în mediu de 10^{-7} M.	7
Exemplul 5	9
Se lucrează la fel ca în exemplul 1, cu singura diferență că se utilizează o concentrație de 10^{-7} M de analog de strigolactonă 3-metil-5-(2-pirimidin-4-il-fenoxi)-5H-furan-2-onă, rezultând o concentrație finală în mediu de 10^{-9} M.	11
Exemplul 6	13
Se lucrează ca în exemplul 1, cu următoarea diferență: se utilizează ca sistem biologic de evidențiere a efectelor compușilor volatili plantule de <i>Arabidopsis thaliana</i> , distribuite câte trei în fiecare godeu, provenite din semințe germinate aseptice timp de 3 zile, față de care se testează efectul biostimulator al compușilor volatili produși de microorganismele benefice sub acțiunea strigolactonelor, pentru o perioadă de timp de 7 zile.	15
Exemplul 7	19
Se lucrează la fel ca în exemplul 6, cu singură diferență că se utilizează o concentrație de 10^{-7} M de 3-[[[(2,5-dihidro-3-metil-2-oxo-5-furanil)oxi] metilen]-3,3a,6,6a-tetrahidrociclopenta-[b]furan-2-one (GR7), rezultând o concentrație finală în mediu de 10^{-9} M.	21
Exemplul 8	23
Se lucrează la fel ca în exemplul 6, cu singura diferență că se utilizează o concentrație de 10^{-5} M de analog de strigolactonă 3-metil-5-(4-fenilchinazolin-2-il-oxi)-5H-furan-2-onă, rezultând o concentrație finală în mediu de 10^{-7} M.	25
Exemplul 9	27
Se lucrează ca în exemplul 1, cu următoarea diferență: se utilizează ca sistem biologic de evidențiere a efectelor compușilor volatili plantule de grâu, distribuite câte două în fiecare godeu, provenite din semințe germinate aseptice timp de 3 zile, față de care se testează efectul biostimulator al compușilor volatili produși de microorganismele benefice sub acțiunea strigolactonelor, pentru o perioadă de timp de 7 zile.	29
Exemplul 10	33
Se lucrează la fel ca în exemplul 9, cu singura diferență că se utilizează o concentrație de 10^{-5} M de analog de strigolactonă 3-metil-5-(4-fenilchinazolin-2-il-oxi)-5H-furan-2-onă, rezultând o concentrație finală în mediu de 10^{-7} M.	35
Această lucrare a fost realizată prin programul Parteneriate în domenii prioritare - PN II, derulat cu sprijinul MEN - UEFISCDI, proiect PN-II-PT-PCCA-2013-4-0846, contract 159/2014 CERES.	37
	39

1

Revendicare

3

Metodă de biotestare a analogilor de strigolactone, **caracterizată prin aceea că se hidrogelifiează** mediul de cultură al microorganismelor producătoare de compuși volatili, cu un tribloc co-polimer, format dintr-un bloc central hidrofob de polioxipropilenă, flancat de două blocuri hidrofile de polioxietilenă, peste care se omogenizează la rece, la temperaturi menținute sub 10°C, soluții de analogi de strigolactone în concentrații finale cuprinse între 10⁻⁷ și 10⁻⁹ M, se determină efectul inhibitor al soluțiilor de analogi de strigolactone asupra unor ciuperci microscopice, agenți fitopatogeni, culturi de 2 zile provenite din inocularea a 10⁷ propagule/ml pe mediu agarizat și efectul biostimulator al compușilor volatili produși de microorganismele benefice asupra unor plantule de *Arabidopsis thaliana* sau grâu, provenite din semințe germinate aseptice timp de 3 zile, pentru o perioadă de timp de 7 zile.

5

7

9

11



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
Tipărit la Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
sub comanda nr. 178/2020