



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2015 00942

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

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

(71) Solicitant:
• 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

(54) PROCEDEU DE BIOTESTARE A ANALOGILOR DE
STRIGOLACTONE

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de biotestare a unor analogi de strigolactone pentru capacitatea de a induce/ stimula producerea de compuși bioactivi volatili în microorganismele asociate plantelor de cultură. Procedeu conform invenției constă în etapele de: distribuie aseptice a unui mediu de cultură hidrogelificat cu un tribloc co-polimer și omogenizarea analogilor de strigolactone într-o placă cu 24 godeuri, inocularea mediului agarizat cu microorganisme benefice plantelor care produc compuși volatili și care răspund pozitiv la strigo-

lactone, acoperirea plăcii și incubarea timp de 48 h la 25°C, depunerea plăcii în care s-au dezvoltat izolatele de testat peste o placă identică cu sistemul biologic față de care se testează compușii volatili biologic activi, incubarea plăcilor reunite, timp de 2...7 zile la 25°C, determinarea efectului asupra sistemului de biotestare și identificarea analogilor de strigolactone care au produs acest efect.

Revendicări: 3



PROCEDEU DE BIOTESTARE A ANALOGILOR DE STRIGOLACTONE

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

Sunt cunoscute diferite procedee prin care au fost selectați diferiți analogi sintetici de strigolactone pentru utilizări în agricultură. 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 biotestarea și utilizarea strigolactonelor naturale, strigol, 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).

Brevetul SUA 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 a 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.

Dor et al. 2011 (Planta, 234: 419-427) au demonstrat o modificare a tiparului de creștere a unor fungi fitopatogeni sub acțiunea unor concentrații ridicate de analog de strigolactone, GR 24. 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 cărei compensare / contracarare 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).

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 distribuirea uniform a strigolactonelor.

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 unui microorganism benefic pentru plantele de cultură, *Pseudomonas putida* KT2440, s-a demonstrat un efect chemoattractant și de favorizare a colonizării rizosferei sub acțiunea benzoxazinoidele (ca de ex. 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, *PLoS ONE* 7, e35498). În cazul aceleiași bacterii benefice plantelor, *P. putida* KT2440, s-a demonstrat o amplificare a expresiei genelor implicate în colonizarea rizosferei și în stimularea plantelor, sub influența exo-semnalele specifice rizosferei plantelor (Fernández *et al.* 2013, *Microbial Biotechnology*, 6, 307–313).

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

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este de a descrie un procedeu de selecție rapidă a analogilor de strigolactone, care stimulează producerea de compuși volatili bioactivi, inclusiv a celor cu rol de biostimulare a plantelor cultivate, de către microorganismele benefice plantelor.

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 degradare.

Procedeu conform invenției este constituit din următoarele etape:

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

- 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 24 de godeuri ale plăcii de titrare;
- Inocularea mediului agarizat cu 3 tulpini de microorganisme, cunoscute pentru acțiunea lor biostimulantă datorită producerii de compuși volatili, distribuite randomizat în trei repetiții, pe medii care conțin strigolactone și pe medii care nu conțin strigolactone, și menținerea unor godeuri martor neinoculate;
- Acoperirea plăcii cu 24 godeuri cu o folie de plastic sterilă care permite schimbul de gaze și incubarea timp de 48 ore la 25°C;
- 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;
- 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 de care se testează compuși volatili biologic activi, separate între ele de folia de plastic care permite schimbul de gaze;
- Determinarea efectului asupra sistemului biologic prin analiza imaginii plăcii de microtitrare cu 24 godeuri, preluate de un sistem de fotodocumentare, și calcularea procentului de efect biologic, de stimulare sau inhibare, cu ajutorul formulei: $(A_1 - A_n) / A_1 \times 100$, unde A_1 este suprafața sistemului biologic în varianta martor neinoculat, iar A_n este suprafața sistemului biologic în varianta în care a fost confruntat cu compușii volatili produși de microorganisme;
- Analiza statistică a rezultatelor prin analiza varianței și identificarea analogilor de strigolactone care au produs modificări ale capacității tulpinilor de a biosintetiza compuși volatili bioactivi.

Soluția de analog de strigolactonă este distribuită în concentrații finale cuprinse între 10^{-7} și 10^{-9} M.

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 *Arabidopsis thaliana* 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.

Procedeul conform invenției prezintă următoarele avantaje:

- ✓ 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;
- ✓ Determină o distribuire 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;
- ✓ Permite randamente înalte de screening, pentru un interval mare de concentrații ale analogilor de strigolactone în mediu de cultură;
- ✓ 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;
- ✓ 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.

În continuare sunt prezentate exemple de realizare a invenției care o ilustrează fără a o limita.

Exemplu 1. Se prepară un decoct de cartofi, prin fierberea a 200 grame de cartofi, spălați bine de resturile de pământ, dar necoșiți, și tăiați în cuburi cu latura de aprox. 1 cm, în aprox. un litru de apă distilată, pentru 30 minute. Se filtrează decoctul prin pânză de tifon dublă și se adaugă 20 grame 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.

Mediul de distribuie aseptice la rece, la temperaturi care sunt menținute sub 10°C, într-o placă cu 24 godeuri (CELLSTAR®, Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria). În fiecare placă se distribuie câte 2,97 ml mediu lichefiat la rece. Se omogenizează în mediu. Se omogenizează la rece câte 30 μl de soluție acetonică de 10⁻⁵ moli de GR24 – (3aR*,8bS*,E)-3-(((R*)-4-metil-5-oxo-2,5-dihidrofuran-2-iloxi)metilen)-3,3a,4,8b-tetrahidro-2H-indeno [1,2-b]furan-2-onă (Chiralix, Nijmegen, Olanda). Se menține la temperaturi sub 10°C, iar soluția acetonică se omogenizează în 12 din cele 24 de godeuri ale plăcii de titrare (un godeu da, un godeu nu). În celelalte godeuri sunt distribuiți câte 30 μl de acetonă, care nu conțin analogi de strigolactone.

Se inoculează mediul agarizat cu câte 30 μl conținând 10⁷ propagule per ml, din următoarele tulpini de microorganisme, cunoscute pentru acțiunea lor biologică datorită producerii de compuși volatili: *Trichoderma asperelum* Td36b, NCAIM (P) F 001434, *Brevibacillus parabrevis* B50, NCAIM (P) B 001413, *Trichoderma harzianum* Td50b, NCAIM (P) F 001412, și la care s-a identificat un răspuns pozitiv la analogii de strigolactone. Orice alte tulpini de microorganisme care au capacitatea de a produce compuși volatili și răspund pozitiv la strigolactone se pot utiliza în cadrul acestui procedeu.

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

În paralel se cultivă 2 zile fitopatogenul test *Rhizoctonia solanii* ATCC 66873 (American Type Culture Collection, Manassas, VA, SUA, aparținând grupului de anastomoză hifală AG-4), pe o altă placă de microtitrare cu 24 godeuri, fiecare conținând 3 ml de mediu cartof – glucoză - agar, inoculat cu 0,03 ml de suspensie de *R. solanii* conținând 10⁷ propagule per ml (suspensie reconstituită din miceliu cultivat pe mediu cartof – glucoză lichid).

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

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

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

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

Exemplu 2. Se lucrează la fel ca în exemplu 1, cu următoarele diferențe: utilizează o concentrație 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.

Exemplu 3. Se lucrează la fel ca în exemplu 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.

Exemplu 4. Se lucrează la fel ca în exemplu 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.

Exemplu 5. Se lucrează la fel ca în exemplu 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.

Exemplu 6. Se lucrează ca în exemplu 1, cu următoarea diferență: se utilizează ca sistem biologic de evidențiere a efectelor compușilor volatili plantule de *Arabidopsis thaliana*, 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.

Exemplu 7. Se lucrează la fel ca în exemplu 6, 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.

Exemplu 8. Se lucrează la fel ca în exemplu 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.

Exemplu 9. Se lucrează ca în exemplu 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.

Exemplu 10. Se lucrează la fel ca în exemplu 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.

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.

REVEDICARI

1. Procedeu de biotestare a analogilor de strigolactone, conform invenției, **caracterizat prin aceea că** este constituit din următoarele etape: distribuirea aseptică la rece, la temperaturi menținute sub 10°C, a unui mediu de cultură pentru microorganisme, care este hidrogelificat tribloc co-polimer, format dintr-un bloc central hidrofob de polioxipropilenă, flancat de două blocuri hidrofile de polioxietilenă, într-o placă cu 24 godeuri; 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 24 de godeuri ale plăcii de titrare; inocularea mediului agarizat cu 3 tulpini de microorganisme, cunoscute pentru acțiunea lor biostimulantă datorită producerii de compuși volatili, distribuite randomizat în trei repetiții, pe medii care conțin strigolactone și pe medii care nu conțin strigolactone, și menținerea unor godeuri martor neinoculate; acoperirea plăcii cu 24 godeuri cu o folie de plastic sterilă care permite schimbul de gaze și incubarea timp de 48 ore la 25°C; 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; incubarea timp de 2-7 zile la 25°C a plăcilor reunite, cu placa cu tulpinile cu mediu hidrogelificat care conține strigolactone deasupra plăcii pe care se află sistemul biologic față de care se testează compuși volatili biologic activi, separate între ele de folia de plastic care permite schimbul de gaze; determinarea efectului asupra sistemului biologic prin analiza imaginii plăcii de microtitrare cu 24 godeuri, preluate de un sistem de fotodocumentare, și cuantificarea răspunsului biologic, de stimulare sau inhibare; analiza statistică a rezultatelor și identificarea analogilor de strigolactone care au produs modificări ale capacității tulpinilor de a biosintetiza compuși volatili bioactivi.

2. Procedeu de biotestare a analogilor de strigolactone, conform revedincării 1, **caracterizat prin aceea că** soluția de analog de strigolactonă este distribuită în concentrații finale cuprinse între 10^{-7} și 10^{-9} M.

3. Procedeu de biotestare a analogilor de strigolactone, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** 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 *Arabidopsis thaliana* 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.