



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2016 00858

(22) Data de depozit: 18/11/2016

(41) Data publicării cererii:  
30/05/2018 BOPI nr. 5/2018

(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;

• VELEA SANDA, STR.ZAMBILELOR NR.6,  
BL.60, ET.2, AP. 5, SECTOR 2,  
BUCUREȘTI, B, RO;  
• GEORGESCU FLORENTINA,  
STR. INDEPENDENȚEI NR.5, BL.6, SC.A,  
AP.7, RĂMNICU-VĂLCEA, VL, RO;  
• GEORGESCU EMILIAN,  
STR. INDEPENDENȚEI NR. 5, BL. 6, SC. A,  
AP. 7, RĂMNICU-VĂLCEA, VL, RO;  
• VLĂDULESCU CONSTANTIN-MARIUS,  
STR. VORONET NR. 3, BL. D4, SC. 1, ET. 1,  
AP. 5, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;  
• GEORGETA ISTRATE,  
STR. TEODOSIE RUDEANU NR. 3, BL. 1C,  
SC. 3, AP. 79, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B,  
RO;  
• VLĂDULESCU LUCIAN-CONSTANTIN,  
STR. ELEFTERIE NR. 31, AP. 1, SECTOR 5,  
BUCUREȘTI, B, RO

(54) PROCEDEU DE FORMULARE A EXO-SEMNALELOR  
HIDROFOBE SPECIFICE RIZOSFEREI

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unor biomolecule hidrofobe exo-semnale pentru reglarea interacțiilor tripartite din rizosfera plantelor de cultură -microorganisme benefice-microorganisme dăunătoare. Procedeu conform invenției constă în tratarea turbei oligotrofe cu umiditate de 25% în câmp de microunde de la 400 până la 500 W, timp de 20 min, la temperatura de maximum 92°C, extracția acizilor humici și fulvici din turba tratată, precipitarea și recuperarea acizilor humici care sunt resuspendați în tampon citrat

de sodiu-acid citric 0,1M, adăugarea de compuși hidrofobi de tip analog sintetic de strigolactone în raport de 0,02...1:100 părți acid humic, după care amestecul este omogenizat prin trecerea printr-un microfluidizator la o rată de 15 ml/min și presiune de 140...150 MPa, produsul rezultat având un indice de hidrofobicitate cu valoarea 23, și o activitate reprezentată de diluția maximă la care se observă efect biologic de 1:1024.

Revendicări: 1



## PROCEDEU DE FORMULARE A EXO-SEMNALELOR HIDROFOBE DIN RIZOSFERĂ

Prezenta invenție se referă la un procedeu de formulare a (bio)moleculelor hidrofobe, care sunt exo-semnale cu rol de comunicare pentru reglarea interacțiilor tripartite din rizosferă, plante de cultură (rădăcini) – (micro)organisme benefice – (micro)organisme dăunătoare.

Sunt cunoscute o serie de bio-molecule hidrofobe, care acționează ca exo-semnale (semio-chimicale), fiind implicate în recunoașterea partenerilor interacțiilor din rizosferă, plante de cultură (rădăcini) – (micro)organisme benefice – (micro)organisme dăunătoare. Aceste exo-semnale hidrofobe sunt secretate în mediul predominant hidrofil al rizosferei, determinând declanșarea unor răspunsuri specifice la partenerul receptor. Simbiozele fixatoare de azot implică un dialog între rădăcinile plantelor și rhizobii, mediat de către flavonoide hidrofobe (produse de rădăcinile plantelor) și de factorul Nod mitogen specific, de natură lipochitooligozaharidică, produs de rhizobii (Cooper, 2007, *Journal of Applied Microbiology*, 103, 1355-1365). Ciupercile de micoriză produc și ele un factor mitogen lipochitooligozaharidic, Myc factor, (Maillet et al. 2011, *Nature*, 469, 58-63). Activitatea biologică a acestor compuși amifili este însă definită de porțiunea hidrofobă, pentru care s-au identificat kinaze specifice cu funcțiune similară receptorilor (Malkov et al. 2016, *Biochemical Journal*, 473, 1369-1378).

Strigolactonele, un grup de derivați caretonoidici / lactone sequisterpenice puternic hidrofobe, produse de rădăcinile plantelor, stimulează germinarea sporilor ciupercilor de micoriză, cu ramificarea hifelor (Akiyama et al. 2005, *Nature*, 435, 824-827), modifică tiparul de dezvoltare și de ramificare al ciupercilor fitopatogene (Dor et al. 2011, *Planta*, 234, 419-427) și favorizează formarea nodulilor fixatori de azot pe rădăcinile leguminoaselor (Soto et al. 2010, *Soil Biology and Biochemistry*, 42, 383-385). În același timp, strigolactonele sunt percepute și de semințele plantelor parazite, ca un indicator al prezenței plantelor gazdă, inducând germinarea semințelor respectivelor plante parazite, la momentul oportun parazitării (Matusova et al. 2005, *Plant Physiology*, 139, 920-934).

Monomerii de cutină, (poli)alcooli grași ramificați, au și ei rol în formarea simbiozelor micorizale (Murray et al. 2013. *Molecular Plant*, 6, 1381-1383), fiind implicați, în același timp și în stimularea dezvoltării apresorilor oomicetelor

fitopatogene (Wang et al. 2012, *Current Biology*, **22**, 2242-2246). Sorgoleonele, componentul major al exsudatelor hidrofobe ale plantelor de sorg, acționează atât ca inhibitori ai procesele de nitrificare din sol, crescând eficiența utilizării azotului (Subbarao et al. 2013, *Plant and Soil*, **366**, 243-259), cât și ca alomoni implicați în interacții alelopatice, cu efect erbicid pentru alte plante (Einhellig și Souza, 1992, *Journal of Chemical Ecology*, **18**, 1-11). Plantele secretă compuși care mimează N-acil-homoserin-lactonele bacteriene (Teplitski et al. 2000, *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **13**, 637-648), exo-semnale hidrofobe implicate în comunicarea din cadrul comunităților microbiene și în reglarea concertată a exprimării genelor / *quorum sensing* (Fuqua et al. 2001, *Annual Review of Genetics*, **35**, 439-468). Percepția de către plante a N-acil-homoserin-lactonele, ca un indicator al prezenței microorganismelor / un tipar molecular asociat microbilor (MAMP, *microbe-associated molecular pattern*), determină o serie de efecte benefice, inclusiv amorsarea sistemului de apărare din plante (Schikora et al. 2016, *Plant Molecular Biology*, **90**, 605-612).

Sunt cunoscute brevete prin care au fost revendicate diferite utilizări agronomice, pentru majoritatea acestor bio-molecule exo-semnal hidrofobe și/sau pentru analogii lor / compuși bio-mimetici. Brevetul EP 0245931 descrie diferite flavone substituie, ca de ex. 7,4'-dihydroxiflavonă, 7,4'-dihydroxi-3'-metoxiflavonă și 4'-hidroxi-7-metoxiflavonă, din extractul de trifoi, care sunt inductori ai genelor implicate în nodularea de la *Rhizobium trifolii*. Brevetul US 5229113 prezintă o serie de izoflavone, daidzein, genistein, 7-hidroxi-isoflavonă, 5,7-dihidroxi-isoflavonă, biochanină A, formononetină și prunetină, ca și compuși flavonoidici, care includ 4',7'-dihydroxiflavona, apigenina, kaempferolul și coumestrolul, extrase din plante de soia, care sunt inductori ai genelor de nodulare de la *Bradyrhizobium japonicum*. Brevetul FR 2660658 revendică un compus cu o structură lipo-polizaharidică similară factorului *Nod* produs de *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* și *Azorhizobium*, care acționează ca factor semnal favorizând formarea simbiozelor fixatoare de azot. Brevetul US 9241454 B2 protejează utilizarea unei structuri lipochitooligozaharidică, cu un lanț acil saturat sau mono-ne-saturat, conținând 16 sau 18 atomi, pentru stimularea formării simbiozelor micorizale.

Întrucât sinteza sorgoleonelor este laborioasă și scumpă, iar extragerea lor din exsudatele radiculare este limitată, au fost realizate și brevetate procedee de sinteză a unor compuși hidrofobi natural identici / biosimilari strigolactonele alelopatice, cu

acțiune erbicidă, prin transformarea oleoresinei din coajă de nucă caju (Brevet US 9447010 B2).

Brevetul US 8101171 B2 se referă la 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. Cererea de brevet WO 2013034621 A1 dezvăluie folosirea, ca tratament în brazdă sau ca tratament al seminței, a unor derivații ai acil-homoserin lactonelor, pentru creșterea randamentului culturilor agricole, conținutului de clorofilă al plantelor, germinarea semințelor, preluarea nutrienților și interacțiile simbiotice micorizale.

O problemă tehnică care limitează utilizarea eficientă a acestor exo-semnale hidrofobe în tehnologiile de cultivare a plantelor este determinată de solubilitatea redusă a unor astfel de compuși în apa utilizată pentru aplicarea unor tratamente în agricultură, și care reprezintă vehiculul de transfer către mediul predominant hidrofil specific rizosferei plantelor de cultură. Nu au fost descoperiți decât un număr limitat de compuși naturali care cresc solubilitatea în apă a acestor exo-semnale (semiochimicale) hidrofobe, și care sunt secretați inclusiv de organismul receptor. În cazul flavonoidelor hidrofobe solubilitatea lor este crescută de către ciclosoforoaze (beta-glucani ciclici), produse de rhizobiile - receptori ai respectivelor exo-semnale hidrofobe (Lee et al. 2003, *Antonie van Leeuwenhoek*, **84**, 201-207). Compuși din clasa beta-glucanilor ciclici au fost puși în evidență ca fiind produși și de tulpina *Paenibacillus graminis* FL400 (NCAIM B001365), care favorizează formarea simbiozelor fixatoare de azot (Brevet RO 125651 B1).

A fost descrisă utilizarea ciclodextrinelor pentru creșterea solubilității în apă a compușilor hidrofobi. Mecanismul este similar cu cel al beta-glucanilor ciclici. Ciclodextrinele formează complecși de incluziune cu compușii hidrofobi, pe care îi sechestrează în interiorul hidrofob. Astfel de compuși de incluziune au fost propuși pentru creșterea solubilității medicamentelor hidrofobe (Loftsson și Brewster, 1996, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **85**, 1017-1025), biocidelor (Nardello-Rataj și 2014, *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, **10**, 2603-2622) sau a regulatorilor de creștere pentru plante (Cerere de brevet JP2013241384 A). Ciclodextrinele sunt însă

relativ scumpe și au o stabilitate redusă în sol, datorită unei biodegradabilități semnificative (Fenyvesi et al. 2005, *Chemosphere*, **60**, 1001-1008).

Alte soluții tehnice sunt cele de condiționare a exo-semnalelor hidrofobe sub forma unor concentrate emulsionabile. Cererea de brevet EP 3060561 A1 revendică și o formulare a strigolactonelor (de biosinteză sau analogi sintetici) de tip concentrat emulsionabil, în care strigolactonele sunt dizolvate într-un alcool, metanol, etanol, propanol, iso-propanol, and butanol, emulsionat cu un surfactant, sulfosuccinat, sulfonat de naftalenă, este sulfat, ester fosfat, alcool sulfat, sulfonat de alchil benzen, policarboxilat, condensat de sulfonat de naftalene, condensat de acid fenol sulfonic, lignosulfonat, taurat de metil oleat, alcool polivinilic sau orice combinație dintre acești surfactanți. Formulările de tip concentrat emulsionabil au însă o serie de dezavantaje: suprautilizare a ingredientului activ, necesar pentru a genera gradientul de concentrație implicat în difuza din solvent în mediu apos; riscul de supradozare sau de sub-dozare datorită erorilor de amestecare și/sau de calibrare; afectarea suprafețelor de material plastic sau de cauciuc de către solvenți; distrugerea straturilor de lacuri și vopsele care protejează metalele diferitelor utilaje și echipamente agricole împotriva coroziunii; efect coroziv al solvenților în unele situații; inflamabilitatea, care complică manipularea.

Un alt dezavantaj al acestor formulări de tip concentrat emulsionabil, specific pentru semiochimicalele hidrofobe din rizosferă, este determinat de stabilitatea redusă în mediu apos a unor astfel de compuși, ca de ex. strigolactonele. Pentru a limita pierderilor de substanță activă în soluțiile / emulsiile apoase utilizate pentru stropit, cererea de brevet US 20160198714 A1 descrie utilizarea unor solvenți ne-apoși, polari, de tipul alcoolilor, dialchil cetonelor, carbonatului de alchilene, esterilor alchilici și esterilor aril, sau combinații ale acestora, sau semi-polari, ca de ex. polietilenglicol, pentru formularea unor factori de creștere pentru plante, majoritatea puternic hidrofobi. Cererea de brevet EP2949215 prezintă utilizarea unui amestec de iso-flavone, dizolvate într-un purtător acceptabil din punct de vedere agronomic, pentru tratamentul seminței leguminoaselor, în vederea favorizării formării simbiozelor fixatoare de azot. Formulările descrise mai sus protejează semnificativ numai compușii hidrofobi instabili în mediu apos care sunt aplicați ca tratament al seminței.

În rizosferă compușii hidrofobi secretați de către rădăcinile plantelor / diferitele (micro)organisme sunt protejați prin închidere în buzunarele hidrofobe ale materiei

organice, respectiv în structurile supra-moleculare amfifile de acizi humici (Canellas et al. 2015, *Scientia Horticulturae*, **196**, 15-27). Materia organică din sol, care include acizi humici, formează astfel o structură care poate fi considerată analoagă uneia logistice, de preluare, depozitare și transport a diferitelor semnale hidrofobe (Lehmann și Kleber, 2015, *Nature*, **528**, 60-68).

Acizii humici sunt cunoscuți pentru formularea diferitelor inputuri utilizate în tehnologiile de cultură a plantelor. De exemplu brevetul SUA 9073796 B1 dezvăluie o combinație de acizi humici și fertilizanți, obținută prin amestecarea lignitului cu azot lichid, adăugarea, în etape, de acid fosforic, apă și potasă, filtrarea amestecului și separarea filtratului. Până în prezent însă nu a fost descrisă utilizarea acizilor humici pentru formularea semiochimicalelor / exo-semnalelor hidrofobe din rizosferă.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este de a descrie un procedeu prin care cantități mici de compuși hidrofobi, cu rol de comunicare în reglarea interacțiilor tripartite din rizosferă, sunt dispersați uniform într-o suspensie apoasă de acizi humici.

Procedeeul conform invenției este alcătuit din următoarele etape:

- Humificarea suplimentară și hidrofobizarea turbei oligotrofe, adusă la 25% umiditate, prin tratare în câmp de microunde prin încălzire timp de 20 min în câmp incremental de microunde, de la 400 la 500W, la temperaturi de max. 92°C;
- Extracția acizilor humici și fulvici din turba oligotrofă tratată prin microunde, prin amestecarea timp de 12 ore a 1 parte turbă oligotrofă hidrofobizată cu 5 părți într-o soluție de KOH 0,5M, la 35°C;
- Precipitarea acizilor humici prin aducerea pH-ului soluției la pH 2,5 cu acid fosforic 85% și recuperarea acizilor humici prin filtrare;
- Resuspendarea acizilor humici în tampon citrat de sodiu – acid citric 0,1M, în raport de 1 parte acid citric la 4 părți tampon, și adăugarea compuși hidrofobi, cu rol de comunicare în reglarea interacțiilor tripartite din rizosferă, în raport de 0,02-1 la 100 părți acid humic;
- Omogenizarea amestecului de acizi humici și exo-semnale hidrofobe, prin trecerea repetată de 3 ori, printr-un micro-fluidizator cu camere ceramice, la o rată de 15 ml/min și la presiuni de 140-150 MPa.

Prezenta invenție prezintă următoarele avantaje:

- Permite condiționarea diferitelor tipuri de exo-semnale hidrofobe, într-o formulă de acizi humici foarte compatibilă cu diferite tratamente la sol – stropiri directe, tratamente în brazdă, tratamente ale seminței.
- Crește gradul de încărcare cu compuși hidrofobi ai acizilor humici extrași din turba oligotrofă, datorită creșterii indicelui de hidrofobitate;
- Protejează compuși exo-semnal prin închiderea în buzunarele hidrofobe, neaccesibile apei, din cadrul structurilor supra-moleculare de acizi humici;
- Asigură o eliberare controlată de factorii de mediu, respectiv exsudatele radiculare acide ale rădăcinilor plantelor, care determină schimbări conformaționale, cu expunerea parțială a buzunarelor hidrofobe la structuri hidrofobe ale rizoplanului plantelor;
- Reduce riscul supradozării datorită diluării semnificative a ingredientelor active în produsul formulat, la max. 1%;
- Nu prezintă riscuri de inflamabilitate, coroziune, sau de afectare a suprafețelor de material plastic sau cauciuc.

În continuare se prezintă exemple de realizare care ilustrează invenția fără a o limita.

*Exemplu 1.* 500 g de turbă oligotrofă blondă, adusă la umiditate de 25%<sup>^</sup>, și cu o granulație de 1-5 mm (Klassman TS 3 fin, Klasmann-Deilmann, Geeste, Germania) se introduce într-un reactor de sticlă pyrex de 5 litri, prevăzut cu capac cu gât rodat. Se fixează capacul pe reactorul de sticlă cu cleme de teflon, și se montează cu într-un reactor cu microunde (Minilabotron 2000, Sairem, Neyron, Franța), cu gâtul rodat în sus, în afara incintei iradiate cu microunde. Pe gâtul rodat se fixează un refrigerent spiralat, care se ancorează pe diagonală de 2 din picioarele de sprijin ale stativului de susținere a reactorului cu microunde. Se încălzește timp de 20 min în câmp incremental de microunde, de la 400 la 500W, la temperaturi de max. 92°C. Se scoate flaconul de sticlă cu turba hidrofobizată, se răcește și se trece pe o baie de apă termostată și cu agitare (Lab Companion 37 L, Cole Parmer, Vernon Hills, SUA). Se adaugă 2,5 litri de soluție KOH 0,5 M. Se menține la 35°C, sub ușoară agitare (5 rpm) timp de 12 ore. Se separă humina ne-extrasă de acizi humici și fulvici prin filtrare. Filtratul se trece într-un reactorul de sticlă de 5 litri și se aduce la pH 2,5 cu acid fosforic 85%. Cele 25 g de acizii humici precipitați se recuperează prin filtrare. Se trec acizi humici recuperați într-un flacon erlenmeyer de 250 ml și se resuspendă în 100 ml tampon citrat de sodiu – acid citric 0,1M. Peste amestecul

acizi humici - tampon citrat se aduc 5 mg de GR24, 3E,3aR,8bS)-3-[[[(2S)-4-metil-5-oxo-2H-furan-2-il]oximetilidene]-4,8b-dihidro-3aH-indeno[1,2-b]furan-2-onă, analog sintetic de strigolactone. Amestecul de acizi humici și GR24 în tampon citrat se omogenizează prin trecerea repetată de 3 ori, printr-un micro-fluidizator cu camere ceramice (LM10, Microfluidics, Westwood, SUA), la o rată de 15 ml/min și la presiuni de 140-150 MPa.

*Exemplul 2.* Se lucrează la fel ca în exemplul 1, numai că etapa inițială, de hidrofobizare a turbei prin încălzire în câmp de microunde, nu se mai realizează. Acizii humici extrași prin cele două procedee, cu sau fără microunde, au fost analizați din punct de vedere al indicelui de hidrofobicitate prin tehnica DRIFT (*diffuse reflectance infrared Fourier transform*, spectroscopie IR cu transformată Fourier și difuzia reflectanței). Pentru analiza DRIFT probele de acizi humici (300 mg) au fost amestecate cu 900 mg KBr (FTIR grade 99%, Sigma-Aldrich, St.Louis, SUA) și mojarate. Amestecul mojarat a fost transferat într-o cupă de reflectanță (diametru 12 mm). Spectrele DRIFT au fost măsurate pe un echipament Thermo Nicolet Avatar 320 FTIR (Thermo Fisher, Waltham, SUA), echipat cu accesorii „smart” pentru detectarea reflectanței difuze. Indicele de hidrofobicitate a fost estimat prin divizarea arie pentru banda de absorbție alifatică (de la 3.000 to 2.800  $\text{cm}^{-1}$ ) la conținutul de carbon al probelor (Capriel, 1997, *European Journal of Soil Sciences*, **48**, 457-462).

În produsele finale realizate a fost determinată activitatea analogului sintetic de strigolactone în inducerea modificărilor în tiparul de dezvoltare al ciupercilor patogene, respectiv *Botrytis cinerea* (Dor et al. 2011, *Planta*, **234**, 419-427). S-a lucrat prin tehnica diluțiilor seriale 1 cu 1, determinându-se diluția maximă la care se mai observă efectul biologic. În tabelul 1 sunt prezentate rezultatele..

Tab.1. Indicele de hidrofobicitate al acizilor humici extrași din turbă tratată și netratată cu microunde și diluția maximă la care se mai observă efectul biologic al analogului de strigolactone GR24

Variantă	Indice de hidrofobicitate	Diluția maximă la care se observă efect biologic
Exemplul 1, turbă tratată cu microunde	23	1:1024
Exemplu 2, turbă netratată cu microunde	4,9	1:256



Rezultatele din tabelul 1 demonstrează faptul că prin tratare cu microunde se produce o hidrofobizare a acizilor humici, care permite o mai ridicată încărcare cu exo-serrnale hidrofobe, respectiv cu analog de strigolactone GR24.

*Exemplul 3.* Compoziția formulată cu acizi humici și analog de strigolactone GR24 a fost menținută la temperatura camerei timp de 12 luni. Trimestrial s-a determinat diluația minimă la care se mai induc modificări în tiparul de dezvoltare al ciupercilor patogene, respectiv *Botrytis cinerea* (Dor et al. 2011, Planta, 234, 419-427). Nu au fost constatate modificări, deci analogul de strigolactone GR24 este stabil timp de 12 luni prin formulare în acizi humici.

*Exemplu 4.* Se lucrează ca în exemplu 1, numai că se folosește N-Tetradecanoyl-DL-homoserine lactonă, un factor semnal utilizat de bacterii pentru detectarea cvorumului / densității populaționale și care este perceput de plante ca un semnal al prezenței microorganismelor, care activează răspunsul de apărare.

*Exemplul 5.* Se lucrează ca în exemplul 1, numai că se folosește naringenină, ( $\pm$ )-2,3-Dihidro-5,7-dihidroxi-2-(4-hidroxifenil)-4H-1-benzopirani-4-one, 4',5,7-trihidroxiflavanone, izoflavonă care stimulează formarea simbiozelor fixatoare de azot la leguminoase.

*Exemplul 6.* Se lucrează ca în exemplu 1, numai că se folosește sorgoleone 364, 2-Hidroxi-5-metoxi-3-tridecil-[1,4]benzochinonă, compus cu acțiune alelopată și de inhibare a nitrificării.

*Exemplul 7.* Se lucrează ca în exemplul 1, numai că se folosește 3-metil-5-(2-pirimidin-4-il-fenoxi)-5H-furan-2-onă, un analog sintetic de strigolactone.

*Exemplu 8.* Se lucrează ca în exemplu 1, numai că se folosește 3-metil-5-(4-fenilchinazolin-2-il-oxi)-5H-furan-2-onă, un analog sintetic de strigolactone.

*Exemplu 9.* Se lucrează ca în exemplul 1, numai că se folosește acid dihidroxistearic, un analog al monomerilor de cutină.

## Revendicare

1. Procedeu de formulare a exo-semnalelor hidrofobe din rizosferă **caracterizat prin aceea** că este alcătuit din următoarele etape: humificarea suplimentară și hidrofobizarea turbei oligotrofe, adusă la 25% umiditate, prin tratare în câmp de microunde prin încălzire timp de 20 min în câmp incremental de microunde, de la 400 la 500W, la temperaturi de max. 92°C; extracția acizilor humici și fulvici din turba oligotrofă tratată prin microunde, prin amestecarea timp de 12 ore a 1 parte turbă oligotrofă hidrofobizată cu 5 părți într-o soluție de KOH 0,5M, la 35°C; precipitarea acizilor humici prin aducerea pH-ului soluției la pH 2,5 cu acid fosforic 85% și recuperarea acizilor humici prin filtrare; resuspendarea acizilor humici în tampon citrat de sodiu – acid citric 0,1M, în raport de 1 parte acid citric la 4 părți tampon, și adăugarea compuși hidrofobi, cu rol de comunicare în reglarea interacțiilor tripartite din rizosferă, în raport de 0,02-1 la 100 părți acid humic; omogenizarea amestecului de acizi humici și exo-semnale hidrofobe, prin trecerea repetată de 3 ori, printr-un micro-fluidizator cu camere ceramice, la o rată de 15 ml/min și la presiuni de 140-150 MPa.