



(12) **CERERE DE BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. cerere: **a 2018 01011**

(22) Data de depozit: **03/12/2018**

(41) Data publicării cererii:
30/06/2020 BOPI nr. **6/2020**

(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;**

• **CONSTANTINESCU-ARUXANDEI DIANA,
ȘOS.MIHAI BRAVU NR. 297, BL. 15A,
SC. A, AP. 5, ET.1, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **DEȘLIU-AVRAM MĂLINA, STR. GÂRLENI
NR. 4, BL. C85, SC. A, ET. 6, AP. 40,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **ZAMFIROPOL-CRISTEA VALENTIN,
DRUMUL TABEREI NR.78, BL.M40 BIS,
AP.49, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO**

(54) **PROCEDEU DE SELECȚIE A ELICITORILOR
CARE STIMULEAZĂ PRODUCEREA DE EXO-SEMNALE
RADICULARE**

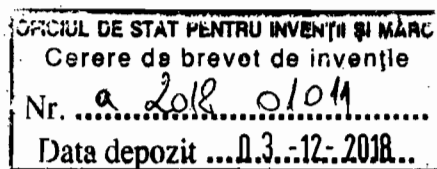
(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de selecție a elicitorilor care stimulează producerea de exo-semnale radiculare. Procedeu, conform invenției, constă în următoarele etape: aplicarea foliară a elicitorilor de selectat pe plante test, cultivare pe medii hidroponice, recuperarea prin ultrafiltrare tangențială amplificată micelar a exo-semnalelor hidrofobe din rizosferă, sterilizarea și concentrarea retenatului până la 5% substanță uscată, amestecarea acestuia cu mediu de cultură hidrogelifiat lichid, distribuția în 12 godeuri și inocularea cu 3 tulpini demicroorganisme cu acțiune

biostimulantă, datorită producerii de compuși volatili, acoperirea plăcii cu 24 godeuri și incubarea timp de 48 h la 25°C, depunerea plăcii în care s-au dezvoltat izolatele de testat peste o placă cu 24 godeuri pe care se află sistemul biologic față de care se testează compoziții biologice active, incubarea plăcilor reunite cu placa cu tulpinile cu mediu hidrogelifiat, determinarea efectului biostimulator realizat prin analiza imaginii plăcii de microtitrare cu 24 godeuri.

Revendicări: 8





PROCEDEU DE SELECTIE A ELICITORILOR CARE STIMULEAZĂ PRODUCEREA DE EXO-SEMNALE RADICULARE

Prezenta invenție se referă la un procedeu de selecție a elicitorilor aplicați foliar care stimulează producerea de exo-semnale radiculare prin care se recrutează microorganisme benefice plantelor de cultură.

Sunt cunoscute diferite procedee de selecție a elicitorilor pentru plante. Elicitorii sunt agenți care activează răspunsul de apărare din plante la nivel sistemic (Thakur and Sohal 2013. *ISRN biochemistry*, 2013 Article ID 762412). Brevetul EP0922387 B1 descrie un procedeu de selecție a unui elicitor care induce producerea de fitoalexine în orez. Procedeu implică utilizarea unei plante de orez în primele faze de vegetație ca plantă testată, tratarea unei părți adecvate din planta de orez cu produsul de testat și selectarea elicitorilor prin determinarea formării fitoalexinelor fitocasane și/sau nomilactone A, cu ajutorul unei tehnici de cromatografie de înaltă presiune.

Elicitorii au diferite utilizări, ca ingrediente pentru protecția plantelor sau ca activatori ai metabolismului secundar și ai acumulării de compuși secundar de metabolism benefic. Cererea de brevet WO2017176587 descrie utilizarea unor elicitori peptidici pentru creșterea rezistenței și stimularea creșterii plantelor, amplificarea toleranței la stresurile biotice și abiotice, inclusiv la bolile post-recoltare / în depozite, ca și pentru mărirea duratei de păstrare a fructelor sau legumelor. Brevetul EP2735609 prezintă un procedeu prin care se stimulează acumularea unor produse de interes, ca de ex. alcaloizi, terpene, stilbenoizi sau flavonoizi prin tratarea plantelor cu elicitori. Cererea de brevet WO2007088024 descrie un procedeu stimulare a obținerii glucozinolaților dintr-un exsudat radicular al plantelor din ordinul *Capparales* prin utilizarea elicitorilor aplicați foliar.

Elicitorii aplicați foliar care stimulează secreția radiculară de exo-semnale sunt utili pentru a amplifica utilizarea microbiomului benefic al plantelor, respectiv al acelor microorganisme implicate în protecția și nutriția plantelor (Doornbos, et al. 2012. *Agronomy for Sustainable Development*, 32, 227-243). Un exemplu de astfel de exo-semnal radicular sunt strigolactonele. 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 chemoatractant 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).

Exsudatele radiculare ale plantelor stresate atrag fungii benefice din genul *Trichoderma*, în special tulpinile care produc compuși volatili (Lombardi *et al.* 2018, *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 31, 982-994). 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).

Nu au fost încă descrise procedee prin care să se realizeze un screening al elicitorilor care stimulează producerea de compuși volatili benefici plantelor cultivate, prin care să se realizeze stimularea microbiomului benefic. Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este să realizeze un astfel de procedeu.

Procedeeul conform invenției este alcătuit din următoarele etape: Aplicarea elicitorilor de selectat pe plante tes, cultivate pe medii hidroponice, recuperarea prin ultrafiltrare tangențială amplificată micelar a exo-semnalelor hidrofobe din rizosferă prin utilizarea unor polimeri amfifili, sterilizarea și concentrarea retentatului până la 5% din substanța uscată, amestecarea retentatului cu mediu de cultură hidrogelificat lichid, distribuția mediului cultură lichid cu retentat în 12 godeuri, din cele 24 de godeuri ale unei plăcii de titrare, distribuția de mediu lichefiat fără retentat în celelalte plăci; 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 cu și fără retentat radicular; 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 retentat radicular 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 realizat mediat de către elicitorul aplicat inițial pe planta test prin analiza imaginii plăcii de microtitrare cu 24 godeuri, preluate de un sistem de fotodocumentare.

Plantele test sunt plante de tomate, castraveți, grâu, fasole, floarea-soarelui.

Ultrafiltrare tangențială amplificată micelar a exo-semnalelor hidrofobe din rizosferă se realizează prin adăugarea unei structuri purtător polimer amfifile, în proporție de 0,1% din masa de mediu hidroponic recirculat, pentru a se realiza extracția (macro)micelară a exo-semnalelor hidrofobe; ajustarea pH-ului la valori de 5,6 – 6,2 și agitarea timp de 15 min, la temperatura camerei, pentru a facilita extracția exo-semnalelor hidrofobe în interiorul structurilor purtător amfifile; ultrafiltrarea tangențială a suspensiei rezultate, pe o membrană cu limită de excludere de 25 KDa, la o diferență de presiune de 140-170 kPa.

Structurile purtător polimer amfifile sunt structuri non-ionice și cu polaritate limitată, respectiv tribloc co-polimer, format dintr-un bloc central hidrofob de polipropilenglicol, flancat de două blocuri hidrofile de polietilenglicol, care este similară cu polimerul amfifil utilizat pentru hidrogelifierea mediului de cultură.

Tribloc co-polimerul preferat ca structură amfifilă care are o capacitate mare de legare a componentelor bio-active hidrofobe prezente uzual în mediile hidroponice recirculate este un compus care are masa moleculară de 12,600 daltoni și o balanță hidrofil-lipofilă (HLB) de 22.

Retentatul radicular este distribuit în mediul hidrogelificat în concentrații finale cuprinse între 1 și 10%.

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.

Determinarea efectului biologic se realizează prin 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 microorganismele;

Selectarea finală a elicitorilor care stimulează secreția de exo-semnale radiculare se face prin analiza varianței și identificarea analogilor de strigolactone care au produs modificări ale capacității tulpinilor de a biosintetiza compuși volatili bioactivi.

Procedeul conform invenției prezintă următoarele avantaje:

- ✓ Asigură o stabilitate crescută pentru exo-semnalele radiculare, extrase în structuri micelare în care sunt protejate la hidroliză și care sunt 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 distribuție uniformă a exo-semnalelor hidrofobe recuperate din mediul hidroponic, 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 elicitori ai secreției de exo-semnale radiculare care amplifică răspunsului microbiomului benefic, utilizabili în cadrul sistemelor tehnologice agricole pentru o mai bună exploatare a interacțiilor benefice plante-microorganismele.
- ✓ Detectează influența exo-semnalelor de rizosferă 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. Pe un sistem de cultivare hidroponică Wilma XXL (Atami, Rosmalen, Olanda), prevăzut cu 20 de ghivece de 6 litri, și cu un rezervor de 100 litri utili pentru mediu de cultură, se cultivă plante de tomate. Plantele se mențin condiții controlate, la $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ în timpul zilei și $17\pm 2^{\circ}\text{C}$ în timpul nopții, cu o fotoperioadă de 12 ore, suplimentată cu lumină cu intensitatea de $160\text{ mcE/m}^2/\text{s}$, provenită din lămpi cu halogen, atunci când intensitatea luminoasă scădea sub $500\text{ mcE/m}^2/\text{s}$. condiții de seră, la $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ în timpul zilei și $17\pm 2^{\circ}\text{C}$ în timpul nopții, cu o fotoperioadă de 12 ore, suplimentată cu lumină cu intensitatea de $160\text{ mcE/m}^2/\text{s}$, provenită din lămpi cu halogen, atunci când intensitatea luminoasă scădea sub $500\text{ mcE/m}^2/\text{s}$.

Plantele aflate în a 60 zi de la însămânțare se tratează cu elicitori de testat. În sistemul de cultivare hidroponică se intercalează un sistem de ultrafiltrare tangențială, alcătuit din 1 recipient de 8 litri (5 litri utili), prevăzut cu agitator mecanic, care este vasul de alimentare, 1 modul de ultrafiltrare Biomax, cu membrană de polietersulfonă, cu pragul de excludere de 25 kDa și cu o suprafață de 50 cm^2 (Merck Group, Darmstadt, Germania), 1 recipient de recepție a retentatului de 1 litru util, 1 recipient de recepție a permeatului și un sistem de pompe pentru ultrafiltrare Cogent M1 (Merck Group). Recipientele se conectează prin furtune de plastic cu modulul Biomax. Printr-o valvă distribuitor prevăzută cu reometru recipientul de alimentare al sistemului de ultrafiltrare se conectează cu rezervorul sistemului Wilma XXL. Sistemul de pompe Cogent M1 se conectează prin furtune de plastic cu modulele Biomax. Recipientul de recepție a permeatului se conectează printr-o valvă la o pompă peristaltică Masterflex L/S (Cole Parmer, Vernon Hills, IL, SUA), cu un debit maxim de 280 ml/min. Pompa peristaltică alimentează o coloană cromatografică cu dimensiunile de 5 x 30 cm, împachetată cu rășină neutră Amberlite® XAD4 (Dow DuPont, Midland, MI, SUA), de 20-60 mesh.

Se preiau din rezervorul sistemului Wilma XXL 10 litri. În acești 10 litri se aduc la temperatura de 30°C , se introduc 10 g de tribloc co-polimer, care este format dintr-un bloc central hidrofob de polioxipropilenă, flancat de două blocuri hidrofile de polioxietilenă (Pluronic® F127 / Poloxamer 407, BASF AG, Ludwigshafen, Germania). Se ajustează pH la valoare de 5,6 cu o soluție 0,01 N HNO_3 și se agită timp de 15 min, la temperatura camerei, pentru a facilita captarea exo-semnalelor hidrofobe în interiorul

micelei formate de eterul etilic de polioxietilen. Se procedează la ultrafiltrarea tangențială a suspensiei rezultate, prin ultrafiltrare pe o membrană cu limită de excludere de 5 KDa, la un debit de 50 mL/min, cu o diferență de presiune de 140 kPa. Permeatul se reia cu pompa peristaltică și se introduce pe coloană cromatografică. Retentatul se concentrează până la 7% substanță uscată (verificată refractometric, cu refractometru digital HI 96801, Hanna Instruments, Cluj Napoca, România), prin concentrare la un evaporator rotativ sub vid (Rotavapor® R-300, Buchi, Flaviil, Elveția). Rezultă circa 5 ml de retentat radicular concentrat care se sterilizează prin ultrafiltrare pe membrană de 0,2 μm.

Se prepară un decoct de cartofi, prin fierberea a 200 grame de cartofi, spălați bine de resturile de pământ, dar necojiți, 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, Merck Group, Darmstad, Germania). Se aduce la 1000 ml cu apă distilată. Mediul se hidrogelifiează 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). 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 3 ml mediu lichefiat la rece. Se omogenizează în mediu. Se omogenizează la rece câte 30 μl de retentat radicular concentrat. Se menține la temperaturi sub 10°C, iar 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 10^7 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). 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 - poloxamer, inoculat cu 0,03 ml de suspensie de *R. solanii* conținând 10^7 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. Datele sunt utilizate pentru a verifica eficacitatea elicitorului testat de a induce secreția de exo-semnale implicate în stimularea rizomicrobiomului benefic.

Exemplu 2. Se lucrează la fel ca în exemplu 1, cu următoarele diferențe: se folosesc plante de castraveți, concentrație finală în mediu a retentatului radicular concentrat este de 2%, iar sistemul biologic față de care se face testarea este o cultură de *Fusarium graminearum* DSM4527.

Exemplu 3. Se lucrează ca în exemplu 1, cu următoarele diferențe: se folosesc plante de fasole, concentrație finală în mediu a retentatului radicular concentrat este de 5%, 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 exo-semnalelor pentru o perioadă de timp de 7 zile.

Exemplu 4. Se lucrează ca în exemplu 1, cu următoarele diferențe: se folosesc plante de grâu, concentrație finală în mediu a retentatului radicular concentrat este de 3%, 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 5. Se lucrează ca în exemplu 5, cu următoarea diferență: se folosesc plante de floarea-soarelui.

Revendicări

1. Procedeu de selecție a elicitorilor aplicați foliar care stimulează producerea de exo-semnale radiculare conform invenției **caracterizat prin aceea că** este alcătuit din următoarele etape: aplicarea foliară a elicitorilor de selectat pe plante test, cultivate pe medii hidroponice, recuperarea prin ultrafiltrare tangențială amplificată micelar a exo-semnalelor hidrofobe din rizosferă prin utilizarea unor polimeri amfifili, sterilizarea și concentrarea retentatului până la 5% din substanța uscată, amestecarea retentatului cu mediu de cultură hidrogelificat lichid, distribuția mediului cultură lichid cu retentat în 12 godeuri, din cele 24 de godeuri ale unei plăcii de titrare, distribuția de mediu lichid fără retentat în celelalte plăci; 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 cu și fără retentat radicular; 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 retentat radicular 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 realizat mediat de către elicitorul aplicat inițial pe planta test asupra sistemului biologic prin analiza imaginii plăcii de microtitrare cu 24 godeuri, preluate de un sistem de fotodocumentare.

2. Procedeu de selecție a elicitorilor aplicați foliar care stimulează producerea de exo-semnale radiculare conform revendicării 1 **caracterizat prin aceea că** plantele test sunt plante de tomate, castraveți, grâu, fasole, floarea-soarelui.

3. Procedeu de selecție a elicitorilor aplicați foliar care stimulează producerea de exo-semnale radiculare conform revendicării 1 **caracterizat prin aceea că** ultrafiltrarea tangențială amplificată micelar a exo-semnalelor hidrofobe din rizosferă se realizează prin adăugarea unei structuri purtător polimer amfifile, în proporție de 0,1% din masa de mediu hidroponic recirculat, pentru a se realiza extracția (macro)micelară a exo-semnalelor hidrofobe; ajustarea pH-ului la valori de 5,6 – 6,2 și agitarea timp de 15 min, la temperatura camerei, pentru a facilita extracția exo-semnalelor hidrofobe în interiorul

structurilor purtător amfifile; ultrafiltrarea tangențială a suspensiei rezultate, pe o membrană cu limită de excludere de 25 KDa, la o diferență de presiune de 140-170 kPa.

4. Procedeu de selecție a elicitorilor aplicați foliar care stimulează producerea de exo-semnale radiculare conform revendicării 1 **caracterizat prin aceea că** structurile purtător polimer amfifile sunt structuri non-ionice și cu polaritate limitată, respectiv tribloc co-polimer, format dintr-un bloc central hidrofob de polipropilenglicol, flancat de două blocuri hidrofile de polietilenglicol, care este similară cu polimerul amfifil utilizat pentru hidrogelifierea mediului de cultură.

5. Procedeu de selecție a elicitorilor aplicați foliar care stimulează producerea de exo-semnale radiculare conform revendicării 1 **caracterizat prin aceea că** tribloc co-polimerul preferat ca structură amfifilă care are o capacitate mare de legare a componentelor bio-active hidrofobe prezente uzual în mediile hidroponice recirculate este un compus care are masa moleculară de 12,600 daltoni și o balanță hidrofil-lipofilă (HLB) de 22.

6. Procedeu de selecție a elicitorilor aplicați foliar care stimulează producerea de exo-semnale radiculare conform revendicării 1 **caracterizat prin aceea că** retentatul radicular este distribuit în mediul hidrogelifiat în concentrații cuprinse între 1 și 10%.

7. Procedeu de selecție a elicitorilor aplicați foliar care stimulează producerea de exo-semnale radiculare 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.

8. Procedeu de selecție a elicitorilor aplicați foliar care stimulează producerea de exo-semnale radiculare conform revendicării 1 **caracterizat prin aceea că** selectarea finală a elicitorilor care stimulează secreția de exo-semnale radiculare se face prin analiza varianței și identificarea analogilor de strigolactone care au produs modificări ale capacității tulpinilor de a biosintetiza compuși volatili bioactivi.