



(12)

## BREVET DE INVENȚIE

- (21) Nr. cerere: **a 2018 01011**
- (22) Data de depozit: **03/12/2018**
- (45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **29/03/2024** BOPI nr. **3/2024**

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

(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.D7, 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**

(56) Documente din stadiul tehnicii:  
**RO 131933 A2; RO 128889 B1;  
EP 0922387 B1**

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



# RO 134164 B1

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

Sunt cunoscute diferite metode de selecție a elicitorilor pentru plante. Elicitorii sunt  
5 agenți care activează răspunsul de apărare din plante la nivel sistemic (**Thakur and Sohal  
2013. ISRN biochemistry, 2013 Article ID 762412**).

7 Documentul **RO 131933 A2** dezvăluie o metodă de biotestare a unor analogi de  
strigolactone pentru capacitatea de a induce/stimula producerea de compuși bioactivi volatili  
9 în microorganismele asociate plantelor de cultură. Metoda conform invenției constă în  
etapele de: distribuire aseptică a unui mediu de cultură hidrogelificat cu un tribloc co-polimer  
11 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  
13 pozitiv la strigolactone, 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  
15 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  
17 strigolactone care au produs acest efect.

**RO 128889 B1** descrie o tulpină de *Trichoderma harzianum* Td50b care prezintă  
19 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  
21 de microorganisme antagoniste față de agenții fitopatogeni cum ar fi *Rhizoctonia solanii* și  
*Fusarium graminearum*.

23 Brevetul **EP 0922387 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  
25 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  
27 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  
29 ai metabolismului secundar și ai acumulării de compuși secundar de metabolism benefic.

Cererea de brevet **WO 2017176587 A1** descrie utilizarea unor elicitori peptidici pentru  
31 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  
33 păstrare a fructelor sau legumelor.

Brevetul **EP 2735609 B1** prezintă un procedeu prin care se stimulează acumularea  
35 unor produse de interes, ca de exemplu: alcaloizi, terpene, stilbenoizi sau flavonoizi prin  
tratarea plantelor cu elicitori.

37 Cererea de brevet **WO 2007088024 A1** descrie un procedeu de stimulare a obținerii  
glucozinolaților dintr-un exudat radicular al plantelor din ordinul *Capparales* prin utilizarea  
39 elicitorilor aplicați foliar.

Elicitorii aplicați foliar care stimulează secreția radiculară de exo-semnale sunt utili  
41 pentru a amplifica utilizarea microbiomului benefic plantelor, respectiv al acelor microorga-  
nisme implicate în protecția și nutriția plantelor (**Doornbos, et al. 2012. Agronomy for  
43 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  
45 mutualiste, ca un „strigăt de ajutor” în rizosferă (**Lopez-Râez et al. 2011, Botany, 89:513-  
522**). În cazul unui microorganism benefic pentru plantele de cultură, *Pseudomonas putida*  
47 KT2440, s-a demonstrat un efect chemoattractant și de favorizare a colonizării rizosferei sub

# RO 134164 B1

acțiunea benzoxazinoidelor (ca 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, 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 stimularea plantelor, sub influența exo-semnalelor 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 microorganismele 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 (Lopez-Bucio et al. 2015, Scientia Horticulturae, 196: 109-123).

Problema tehnică pe care își propune să o rezolve invenția, o reprezintă selecția elicitorilor aplicați foliar care stimulează producerea de exo-semnale radiculare, printr-o metodă *in vitro* de stimulare a microbiomului benefic.

Nu au fost încă descrise metode 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.

Metoda conform invenției este alcătuită din următoarele etape: aplicarea 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 plăci de titrare, distribuția de mediu lichefiat fără retentat în celelalte plăci; inocularea mediului agarizat cu 3 tulpini de microorganismele, 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 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 imediat 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.

# RO 134164 B1

1           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  
3 de două blocuri hidrofile de polietilenglicol, care este similară cu polimerul amfifil utilizat  
pentru hidrogelifierea mediului de cultură.

5           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  
7 este un compus care are masa moleculară de 12,600 daltoni și o balanță hidrofil-lipofilă  
(HLB) de 22.

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

11          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  
13 se testează efectul strigolactonelor în ceea ce privește producerea de volatili cu efect inhi-  
bitor de către microorganismele benefice, timp de 2 zile, sau plantule de *Arabidopsis thaliana*  
15 sau grâu, provenite din semințe germinate aseptice timp de 3 zile, față de care se testează  
efectul biostimulator al compușilor volatili produși de 3 microorganismele benefice sub  
17 acțiunea strigolactonelor, pentru o perioadă de timp de 7 zile.

          Determinarea efectului biologic se realizează prin calcularea procentului de efect  
19 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  
21 biologic în varianta în care a fost confruntat cu compușii volatili produși de microorganismele;

          Selecția finală a elicitorilor care stimulează secreția de exo-semnale radiculare se  
23 face prin analiza variantei și identificarea analogilor de strigolactone care au produs modi-  
ficări ale capacității tulpinilor de a biosintetiza compuși volatili bioactivi.

25          Metoda conform invenției prezintă următoarele avantaje:

          - asigură o stabilitate crescută pentru exo-semnalele radiculare, extrase în structuri  
27 micelare în care sunt protejate la hidroliză și care sunt distribuite la rece, la temperaturi de  
sub  $10^\circ\text{C}$ , într-un mediu hidrogelificat cu tribloc co-polimer, format dintr-un bloc central  
29 hidrofob de polioxipropilenă, flancat de două blocuri hidrofile de polioxietilenă, care are  
proprietăți de gelificare inversă, fiind lichid la temperaturi scăzute, și sub formă de gel la  
31 temperatura camerei;

          - determină o distribuție uniformă a exo-semnalelor hidrofobe recuperate din mediul  
33 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  
35 bloc central hidrofob de polioxipropilenă, flancat de două blocuri hidrofile de polioxietilenă;

          - permite randamente înalte de screening, pentru un interval mare de concentrații ale  
37 analogilor de strigolactone în mediu de cultură;

          - generează date prin care se selectează cei mai eficienți elicitori ai secreției de exo-  
39 semnale radiculare care amplifică răspunsului microbiomului benefic, utilizabili în cadrul  
sistemelor tehnologice agricole pentru o mai bună exploatare a interacțiilor benefice plante-  
41 microorganismele;

          - detectează influența exo-semnalelor de rizosferă asupra producerii de compuși  
43 volatili, care au fie acțiune de biostimulare a dezvoltării plantelor, fie acțiune de inhibare a  
creșterii agenților fitopatogeni.

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

# RO 134164 B1

## Exemplul 1

Pe un sistem de cultivare hidroponică Wilma XXL (Atami, Rosmalen, Olanda), prevăzut cu 20 de ghivece de 6 L, și cu un rezervor de 100 L utili pentru mediu de cultură, se cultivă plante de tomate. Plantele se mențin în 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 h, suplimentată cu lumină cu intensitatea de  $160 \text{ mcE/m}^2/\text{s}$ , provenită de la 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 L (5 L 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 suprafața de  $50 \text{ cm}^2$  (Merck Group, Darmstad, Germania), 1 recipient de recepție a retentatului de 1 L 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 maximum de 280 ml/min. Pompa peristaltică alimentează o coloană cromatografică cu dimensiunile de  $5 \times 30 \text{ cm}$ , împachetată cu rășină neutră Amberlite® XAD4 (Dow DuPont, Midland, MI, SUA), de 20-60 mesh.

Se preiau din rezervorul sistemului Wilma XXL 10 L. În acești 10 L se aduc la temperatura de  $30^\circ\text{C}$ , 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 (Poloxamer 407/Pluronic® F127, BASF AG, Ludwigshafen, Germania). Se ajustează pH la valoarea de 5,6 cu o soluție 0,01 N  $\text{HNO}_3$  și se agită timp de 15 min, la temperatura camerei, pentru a facilita captarea exo-semnalelor hidrofobe în interiorul micellei 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  $0,2 \mu\text{m}$ .

Se prepară un decoct de cartofi, prin fierberea a 200 g de cartofi, spălați bine de resturile de pământ, dar necoșiți, și tăiați în cuburi cu latura de aproximativ 1 cm, în aproximativ un litru de apă distilată, pentru 30 min. Se filtrează decoctul prin pânză de tifon dublă și se adaugă 20 g de glucoza (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  $121^\circ\text{C}$  timp de 20 min, după care se răcește pentru lichiefiere până la  $4^\circ\text{C}$ . Poloxamerul 407 are proprietăți de gelifiere termoreversibile. Soluțiile de 30% Poloxamer 407 sunt lichide la temperaturi mai mici de  $15^\circ\text{C}$  și se solidifică la temperaturi mai mari de  $15^\circ\text{C}$ .

# RO 134164 B1

1 Mediul se distribuie aseptic la rece, la temperaturi care sunt menținute sub 10°C, într-o  
o placă cu 24 godeuri (CELLSTAR®, Greiner Bio-One, Kremsmunster, Austria). În fiecare  
3 placă se distribuie câte 3 ml mediu lichefiat la rece. Se omogenizează în mediu. Se omogenizează  
5 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  
7 câte 30 µl de acetonă, care nu conțin analogi de strigolactone.

Se inoculează mediul agarizat cu câte 30 µl conținând 10<sup>7</sup> 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 h 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-glucoza-poloxamer, inoculat cu 0,03 ml de suspensie de *R. solanii* conținând 10<sup>7</sup> propagule per ml (suspensie reconstituită din miceliu cultivat pe mediu cartof-glucoza 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 incubează 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 variantei.

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.

## Exemplul 2

Se lucrează la fel ca în exemplul 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.

# RO 134164 B1

## Exemplul 3

Se lucrează ca în exemplul 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.

## Exemplul 4

Se lucrează ca în exemplul 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.

## Exemplul 5

Se lucrează ca în exemplul 5, cu următoarea diferență: se folosesc plante de floarea-soarelui.

## Revendicări

1  
3 1. Metodă de selecție a elicitorilor aplicați foliar care stimulează producerea de exo-  
5 semnale radiculare conform invenției, **caracterizat prin aceea că**, este alcătuit din  
7 următoarele etape: aplicarea foliară a elicitorilor de selectat pe plante test, cultivate pe medii  
9 hidroponice, recuperarea prin ultrafiltrare tangențială amplificată micelar a exo-semnalelor  
11 hidrofobe din rizosferă prin utilizarea unor polimeri amfifili, sterilizarea și concentrarea  
13 retentatului până la 5% din substanța uscată, amestecarea retentatului cu mediu de cultură  
15 hidrogelificat lichid, distribuția mediului cultură lichid cu retentat în 12 godeuri, din cele 24 de  
17 godeuri ale unei plăcii de titrare, distribuția de mediu lichefiat fără retentat în celelalte plăci;  
19 inocularea mediului agarizat cu 3 tulpini de microorganisme, cunoscute pentru acțiunea lor  
21 biostimulantă datorită producerii de compuși volatili, distribuite randomizat în trei repetiții, pe  
23 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 h 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 imediat 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.

25 2. Metodă 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.

27 3. Metodă de selecție a elicitorilor aplicați foliar care stimulează producerea de exo-  
semnale radiculare conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că**, ultrafiltrarea  
29 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  
31 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  
33 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.

35 4. Metodă de selecție a elicitorilor aplicați foliar care stimulează producerea de exo-  
semnale radiculare conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că**, structurile purtător  
37 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  
39 polietilenglicol, care este similară cu polimerul amfifil utilizat pentru hidrogelifierea mediului  
de cultură.

41 5. Metodă de selecție a elicitorilor aplicați foliar care stimulează producerea de exo-  
semnale radiculare conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că**, tribloc co-polimerul  
43 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  
45 masa moleculară de 12,600 daltoni și o balanță hidrofili-lipofilă (HLB) de 22.



6. Metodă 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 hidrogelificat în concentrații cuprinse între 1 și 10%. 1  
3
7. Metodă 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. 5  
7  
9  
11
8. Metodă 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 variantei și identificarea analogilor de strigolactone care au produs modificări ale capacității tulpinilor de a biosintetiza compuși volatili bioactivi. 13  
15  
17

