



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2019 00868

(22) Data de depozit: 05/12/2019

(41) Data publicării cererii:
30/06/2021 BOPI nr. 6/2021

(71) Solicitant:
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE
DEZVOLTARE PENTRU CHIMIE ȘI
PETROCHIMIE - ICECHIM BUCUREȘTI,
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 - ARUXANDREI
DIANA, ȘOS. MIHAI BRAVU, NR.297,
BL. 15A, SC.A, ET.1, AP.5, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;
• BALA IOANA, STR.POIANA CU ALUNI,
NR.1, BL.4, SC.4, ET.4, AP.60, SECTOR 2,
BUCUREȘTI, B, RO;
• BĂRBIERU OTILIA GABRIELA,
STR.GHEORGHE DOJA, NR.5, BL.7A, SC.4,
ET.1, AP.62, GALAȚI, GL, RO;
• DIMITRIU LUMINIȚA, ALEEA BARAJULUI
BICAZ, NR.9, BL.M31, SC.B, ET.2, AP.408,
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;
• TRITEAN NAOMI, STR.PERFEȚIONĂRII,
NR.11, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO

(54) **BIOSTIMULANT CU ACȚIUNE DE ARMOȘARE ECHILIBRATĂ
A RĂSPUNSULUI DE APĂRARE DIN PLANTE**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o compoziție de biostimulant cu acțiune de amorsare echilibrată a răspunsului de apărare din plante destinată aplicării prin tratament foliar. Compoziția, conform invenției, este constituită din 60...70 g chitosan extras din ciuperci cu masa moleculară de 260 kDa și grad de acetilare 15%, 12...15 g

nanoparticule de siliciu, 12...20 g solvent eutectic format din clorură de colină și 2,3-butandiol în raport molar de 1:2, și în rest, până la 100 g, apă reziduală.

Revendicări: 1

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



BIOSTIMULANT CU ACȚIUNE DE AMORSARE ECHILIBRATĂ A RĂSPUNSULUI DE APĂRARE DIN PLANTE

Prezenta invenție se referă la un biostimulant cu acțiune de amorsare echilibrată a răspunsului de apărare din plante, destinată aplicării prin tratament foliar, pentru creșterea rezistenței plantelor la stresurile biotice și abiotice și favorizarea acumulării de compuși biologic activi în plantele de cultură.

Sunt cunoscute diferite tipuri de biostimulanți pentru plante, ca și utilizarea acestora pentru creșterea rezistenței plantelor la stresurile biotice și abiotice și favorizarea acumulării de compuși biologic activi în plantele de cultură. Biostimulanții pentru plante sunt o nouă categorie de produse utilizate ca inputuri în tehnologiile de cultură a plantelor, care determină: creșterea eficienței de preluare și utilizare a nutrienților de către plante, mărirea rezistenței la factorii de stres abiotici și îmbunătățirea calității recoltei. Interesul crescut pentru biostimulanți este determinat de faptul că această nouă categorie de inputuri agricole asigură o intensificare sustenabilă a producțiilor agricole. Acest interes pentru biostimulanții pentru plante, în directă legătură cu fertilizanții, este demonstrat și de revizuirea cadrului legislativ la nivelul Uniunii Europene. Noul Regulament referitor la fertilizanții EC, EC 2019/1009, inclus în pachetul economiei circulare, se referă și la biostimulanți pentru plante. De menționat aici că noul Regulament care reglementează fertilizanții CE este o parte a pachetului de reglementări destinat economiei circulare, și urmărește și stimularea închiderii lanțurilor de valoare din (bio)economie prin realizarea de biofertilizanți și biostimulanți pentru plante. Acest nou Regulament UE definește două mari clase de biostimulanți: microbieni și non-microbieni, organici („conținând carbon numai de origine animală sau vegetală”) și anorganici (în special elemente benefice, ca de ex. siliciu solubil / acidul silicic).

Biostimulanții pentru plante au o acțiune de stimulare a răspunsului de apărare din plante (Yakhin et al. 2017, *Biostimulants in plant science: a global perspective. Frontiers in plant science*, 7, 2049). Datorită acestei stimulări a mecanismelor de apărare din plante se stimulează producerea și/sau acumularea de compuși bioactivi în țesuturile vegetale și creșterea calității recoltei. (Du Jardin, 2015, *Scientia Horticulturae*, 196, 3-14).

Brevetul SUA 6720289 se referă la un procedeu de creștere a conținutului de uleiuri esențiale în plantele aromatice (în special *Pelargonium graveolens*, *Mentha arvensis*, *Chamomilla recutita*, *Artemisia pallens* și *Cymbopogon winterianus*) prin

tratamente cu pe bază de acid aminobutiric / derivaților de acid aminobutiric, izonicotinamidă / derivați de izonicotinamidă, acid salicilic / derivați de acid salicilic. Acești elicitori sunt formulați împreună cu un agent purtător, și, opțional, împreună cu metaboliți secundari (alcaloizi, acizi grași, proteine și vitamine). Formulările sunt aplicate prin tratament foliar (stropire), cu soluții / suspensii care au o concentrație de la circa 0.1 mM la circa 4 mM elictor, cu 15 zile înainte de recoltarea plantelor în vârstă de 15 zile.

Cererea de brevet US2006073121 descrie un procedeu de creștere a gradului de iuțeală a ardeilor care implică pulverizarea plantelor de ardei, cu flori complet deschise, cu o soluție / suspensie de (i) 0,25-2% g / v dintr-un biostimulant biotic alcătuit din extract de ciuperci microscopice *Aspergillus niger*, *Aspergillus parasiticus*, *Rhizopus oligosporus* și amestecuri ale acestora, și (ii) 1-5 μ M biostimulant abiotic, selectat din grupul constând din metil-jasmonat și acid salicilic.

Tratamentul fructelor de căpșun înainte de recoltare cu un biostimulant pentru plante pe bază de chitosan a determinat creșterea calității fructelor (He et al., 2018. *International Journal of Molecular Sciences*, 19, 2194).

Un dezavantaj al procedeelor care implică aplicare de biostimulanți rezultă din interacțiunile negative între diferitele căi metabolice implicate în răspunsul sistemic de apărare din plante. Elicitorii / factorii de stres biotici sau abiotici induc tipuri diferite de răspunsuri de apărare, care sunt reglate de diferiți fitohormoni - acid salicilic (SA), acid jasmonic (JA), etilenă (ET) și acid abscisic (ABA) (Pieterse et al. 2012. *Annual review of cell and developmental biology*, 28: 489-521). În general, SA este asociat cu rezistență la agenți patogeni biotrofi și la insectele care înțepă și sug, iar JA și ET/ABA sunt asociate cu rezistență la agenți patogeni neurotropi și, respectiv la insectele care rup și amestecă. Căile SA / JA - ET-ABA sunt antagoniste / în disonanță, generând o balansare între rezistență la biotrofi / insecte care înțepă și sug și neurotropi / insecte care rup și mestecă. Diferitele forme de stres abiotic (temperaturi extreme, radiație solară, agenți chimici pro-oxidanți) intervin și ele în căile SA / JA-ET-ABA, în special prin modificarea nivelului speciilor reactive de oxigen și azot, inclusiv a celui de oxid nitric (Xia et al 2015, *Journal of Experimental Botany*, 66:, 2839-2856). Toată această rețea de interacțiuni pozitive și negative determină în anumite situații o creștere a susceptibilității plantelor față de factori de stres biotici controlați de altă cale decât cea care a fost activată (Caarls et al. 2015, *Frontiers in Plant Science*, 6:170).

Sunt deci necesare procedee prin care să se folosească biostimulanți pentru plante care să determine stimularea echilibrată și cu spectru larg a sistemului de apărare din plante, limitând antagonismul dintre căile de apărare a plantelor, și favorizând producerea și acumularea de compuși bioactivi.

Pe de altă parte, activarea răspunsului de apărare din plante reprezintă un compromis între avantajele pentru individ și dezavantajele competitive la nivel de specie / populație (Neilson et al. 2013, *Trends in Plant Science* 18: 250–258). Consumul de energie metabolică pentru sinteza compușilor de apărare (care sunt și fitonutrienți de interes practic) se face în detrimentul creșterii și dezvoltării – producerii de fructe și respectiv semințe (recolta utilă). Acest compromis, între cantitatea producției (asociată conservării speciei prin producerea de semințe) și calitatea recoltei (asociată conservării individului prin formarea compușilor de metabolism secundar cu rol de protecție), este un alt dezavantaj în stadiul actual de dezvoltare al domeniului. Acest dezavantaj este și mai pregnant în cazul plantelor de cultură la care nu s-au selectat suficiente varietăți suficient de tolerante la stresul termic / temperatură ambientală ridicată / scăzută în timpul antezei (formării florilor). Schimbările climatice pot amplifica această problemă, afectând dezvoltarea florilor și formarea fructelor / semințelor (Chayut et al. 2014, *Plants*, 3: 304-323). Influența semnificativă este și asupra plantelor de cultură care sunt introduse în alte areale decât cele de origine, în care nu sunt suficient de bine adaptate.

Studiile recente au dovedit că siliciul solubil este unul dintre puținii biostimulanți pentru plante care amorsează în mod echilibrat diferitele căi metabolice implicate în răspunsul de apărare din plante (Van Bockhaven et al. 2013. *Journal of experimental botany*, 64:1281-1293). Acțiunea siliciului solubil nu se limitează doar la orchestrarea căilor metabolice implicate în apărarea plantelor față de atacul patogenilor și al dăunătorilor, dar are efecte și de: creștere a eficienței de utilizare a nutrienților; reducere a toxicității metalelor grele; limitare a efectelor stresului hidric (salin, secetă) și a stresului termic - îngheț, temperatură excesivă (Liang et al. 2015, *Silicon in Agriculture*, Springer Netherlands, Dordrecht, 235 pg.). Siliciul solubil are deci toate caracteristicile unui biostimulant pentru plante (Savvas& Ntatsi, 2015, *Scientia Horticulturae*, 196, 66-81).

În plante însă siliciul îndeplinește două funcții majore, una structurală și cealaltă fiziologică / biochimică (de biostimulant). Funcția structurală este asociată răspunsului inteligent al apoplastului (Nishitani și Demura 2015, *Plant and Cell Physiology*, 56, 177-179) și implică, în cazul plantelor care acumulează siliciu, și

formarea de fitolite cu rol analog unui endo-schelet (Schoelynck et al. 2014, *Journal of Vegetation Science*, 25: 301-313). Si această funcție structurală are un rol de apărare împotriva patogenilor și dăunătorilor, generând diferite bariere care limitează pătrunderea patogenilor și au un efect repelent asupra dăunătorilor. Funcția fiziologică, implică în reglarea fină / orchestrarea căilor metabolice implicate în răspunsul de apărare, necesită transportul acidului ortosilicic (H_4SiO_4) prin simplast și implică un sistem co-operat, prezent doar în rădăcini, format din acvaporine (proteine membranare care constituie canale pentru transportul facilitat al apei și al moleculelor mici, neutre / neionizate), din subfamilia NIP-26 (*nodulin-26-like proteins*), denumite și metaloido-porine (Pommerrenig et al. 2015. *Plant Science*, 238:212-22), și proteine de transport activ / „pompe” moleculare de siliciu, care transferă acidul ortosilicic în xilem (Ma și Yamaji 2015, *Trends in Plant Science*, 20:435-442).

Termenul "acid silicic" se referă la un grup de specii moleculare alcătuite din atomi de siliciu, hidrogen și oxigen. Acizii silicici simpli includ acidul metasilicic (H_2SiO_3), acidul ortosilicic (H_4SiO_4), acidul disilicic ($H_2Si_2O_5$) și acidul piroxilic ($H_6Si_2O_7$) și reprezintă speciile moleculare cu o solubilitate mai ridicată în soluțiile apoase. În soluția solului acidul ortosilicic există ca specie unică la concentrații reduse, de maximum 2 mM (Cornelis, et al 2011, *Biogeosciences*, 8: 89-112). În anumite condiții (concentrații ridicate, tărie ionică crescută, pH alcalin, prezența unor aminoacizi / peptide sau poliamine), acizii silicici (poli)condensează pentru a forma polimeri de acizi silicici, cu o structură complexă. Produsul de polimerizare avansată ($SiO_2 \cdot nH_2O$) este denumit silicagel, în stare semnificativ hidratată, silice amorfă, atunci când este parțial deshidratat, opal când procesul de condensare și de deshidratare este avansat. Structurile formate în țesuturile plantelor prin precipitarea și condensarea acidului silicic sunt denumite opal biogen, bioopal, fitolite (Belton et al. 2012, *FEBS Journal*, 279:, 1710-1720).

Siliciul aplicat foliar necesită stabilizarea prin utilizarea de colină (Laane 2018, *Plants*, 7(2), 45), iar soluțiile rezultate nu au o penetrabilitate foliară bună. O soluție ar fi forme de siliciu cu eliberare controlată de acid silicic (de exemplu silice amorfă), care să fie fixate pe suprafața frunzelor și apoi să livreze acid silicic prin cuticula plastifiată a plantelor.

Filmele formate de chitosan în care să fie înglobate nanoparticule de silice amorfă ar permite atât eliberarea controlată de acid silicic, cât și o acțiune de biostimulant complementară.

Majoritatea bioproduselor pe bază de chitosan realizate până în prezent sunt pe bază de chitosan din crustacee marine (McInnis et al. 2018, *Coatingstech*, 15, 36-43). Aceasta generează o serie de dezavantaje, datorită solubilității reduse în apă, proprietăților mecanice slabe ale filmelor de chitosan (Zivanovic et al. 2007, *Biomacromolecules*, 8, 1505-1510), ca și lipsei de reproductibilitate a sintezei și proprietăților filmelor bioactive, datorită diferențelor de masă, grad de deacetilare și cristalinitate a chitosanului provenit din crustacee marine (Philibert et al. 2017. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 181, 1314-1337).

O soluție pentru îmbunătățirea caracteristicilor mecanice ale chitosanului este utilizarea chitosanului provenit din ciuperci. Chitosanul obținut din ciuperci are proprietăți mecanice superioare și o reproductibilitate mai bună a sintezei și proprietăților filmelor bioactive, datorită gradului de deacetilare mare și unui tipar de deacetilare uniform (Ghormade et al. 2017, *International Journal of Biological Macromolecules*, 104, 1415-1421). De asemenea, chitosanul din ciuperci (macro sau micro-micete) are o capacitate superioară de inducere a răspunsului de apărare, (Sharif et al. 2018. *Molecules*, 23, 872).

Chitosanul are acțiuni multiple asupra plantelor de cultură, inclusiv acțiune de biostimulant pentru plante (Pichyangkura și Chadchawan 2015. *Scientia Horticulturae*, 196, 49-65). Biostimulanții pentru plante sunt o nouă clasă de produse utilizate ca inputuri în tehnologiile de cultură a plantelor, care determină: creșterea eficienței de preluare și utilizare a nutrienților de către plante, mărirea rezistenței la factorii de stres abiotici și îmbunătățirea calității recoltei (du Jardin, 2015. *Scientia Horticulturae*, 196, 3-14). Acțiunea de biostimulant pentru plante a chitosanului este datorată și caracteristicilor sale de elicitor, respectiv de agent de activare a răspunsului de apărare din plante, datorită caracteristicilor de MAMP (microbial associated molecular patterns) – tipar molecular asociat microbilor (Iriti & Faoro, 2009, *Plant Signaling & behavior*, 4(1), 66-68). Mecanismul acțiunii antimicrobiene și de elicitare a răspunsului de apărare din plante al chitosanului este prin modularea speciilor reactive de oxigen (Lopez-Moya, et al 2019, *International Journal of Molecular Sciences*, 20(2), 332). Penetrabilitatea foliară a chitosanului prin bariera hidrofobă a cuticule foliare este însă redusă, datorită caracterului său de polielectrolit.

Problema tehnică pe care o rezolvă această invenție este de a realiza un biostimulant cu acțiune de amorsare echilibrată a răspunsului de apărare din plante, cu aplicare foliară, pe bază de chitosan și nanosilice.

Autorii au găsit că asocierea chitosanului și a nanosilicei cu un solvent eutectic pe bază de colină și 2,3 butandiol favorizează preluarea foliară a chitosanului și a nanosilicei și stabilizează siliciul.

Compoziția conform invenției este alcătuită din: 60-70 grame chitosan extras din ciuperci, cu masa moleculară de 260 kDa și grad de acetilare 15 %, 12-15 grame nanoparticule de siliciu, 12-20 grame solvent eutectic format din clorură de colină și 2,3 butandiol, în raport molar de 1:2, restul până la 100 grame fiind apă reziduală.

Această invenție prezintă următoarele avantaje:

- ✓ Favorizează penetrarea foliară a siliciului și a chitosanului datorită efectului de plastifiere a cuticulei exercitat de 2,3 butandiol;
- ✓ Stabilizează acidul silicic datorită acțiunii colinei;
- ✓ Sinergizează acțiunea de biostimulant a siliciului solubil și a chitosanului datorită acțiunii de stimulator de creștere a 2,3 butandiolului.

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

Exemplu 1. Într-un vas de sticlă Simax® de 10 litri (Kavalier, Sazava, Cehia), prevăzut cu manta de termostatare, agitare mecanică și refrigerent se solubilizează chitosanul extras din butoni de ciuperci *Agaricus bisporus*, (260 kDa, grad de acetilare 15 %). Acesta este dizolvat în soluție de acid acetic 0,7 % pentru a forma 3,5 kg soluție 2 %. Soluția de chitosan de 2% este încălzită la 60°C. În soluția caldă de chitosan sunt omogenizate 500 grame de soluție hidroalcoolică 50% care conțin 15 grame nanoparticule de silice extrasă din substrat epuizat de la cultivarea ciupercilor *Pleurotus*. Se continuă agitarea până la definitivarea gelifierii ionotrope a chitosanului încărcat pozitiv cu silicea încărcată negativ. Hidrogelul rezultat se separă prin decantare de superantant, și se usucă sub vid. Peste amestecul uscat se aduc 12 grame de solvent eutectic format din clorură de colină și 2,3 butandiol, în raport molar de 1:2.

Exemplu 2. Se lucrează la fel ca în exemplul 1, cu diferența că se folosesc 3 kg de soluție de chitosan 2%, 12 grame de nanoparticule de silice și 20 grame de solvent eutectic format din clorură de colină și 2,3 butandiol, în raport molar de 1:2.

Exemplu 3. Biostimulantul conform Exemplu 1 s-a aplicat la cultura de roșii, crescute în solar, pe sol udat prin picurare, în doză de 1 și 2 litri la ha, comparativ cu un produs pe bază de chitosan. În fructele de roșii recoltate la o lună de la tratament au fost determinați compușii bioactivi – carotenoide totale, polifenoli totali, flavonoide

totale, acid ascorbic. Rezultatele, prezentate în tabelul 1, demonstrează o creștere a acumulării de compuși bioactivi în plantele de roșii tratate.

Tabel 1. Influența aplicării produsului cf. ex.1 asupra acumulării de compuși bioactivi în cultura de roșii.

Compuși bioactivi	Martor (stropit cu apă)	Chitosan, soluție 60% (echiv. 1 litru per ha)	Compoziție conf. Ex.1 (echiv. 1 litru per ha)	Compoziție conf. Ex.1 (echiv. 2 litru per ha)
Carotenoizi totali (mg/100 g s,p,)	11,09±0,89b	14,27±0,62a	12,55±0,60b	15,32±0,81a
Acid ascorbic (mg/100 s,p,)	117,8±8,74b	112±12,68b	134,5±11,21a	147,2±9,73a
Polifenoli totali (mg galic acid eq./100g s,u,)	13,62±1,04b	12,84±0,69b	15,35±0,87a	14,72±0,79a
Flavonoizi totali (mg quercetin eq./100 g s,u,)	9,48±0,87b	10,62±0,72b	12,47±0,35a	12,12±0,42a

Revendicare

1. Biostimulant cu acțiune de amorsare echilibrată a răspunsului de apărare din plante, conform invenției, **caracterizat prin aceea că** este alcătuit din: 60-70 grame chitosan extras din ciuperci, cu masa moleculară de 260 kDa și grad de acetilare 15 %, 12-15 grame nanoparticule de siliciu, 12-20 grame solvent eutectic format din clorură de colină și 2,3 butandiol, în raport molar de 1:2, restul până la 100 grame fiind apă reziduală.