



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2011 00650

(22) Data de depozit: 12.07.2011

(41) Data publicării cererii:
29.03.2013 BOPI nr. 3/2013

(71) Solicitant:
• PETRUȘ ADRIANA, STR. ROȘIORILOR
NR. 19, BL. PB 18, ET. 4, AP. 19, ORADEA,
BH, RO;
• CACHIȚĂ DORINA, ALEEA SNAGOV
NR. 2, AP. 72, SC. 4, ET. 3, CLUJ NAPOCA,
CJ, RO

(72) Inventatori:
• PETRUȘ ADRIANA, STR. ROȘIORILOR
NR. 19, BL. PB 18, ET. 4, AP. 19, ORADEA,
BH, RO;
• CACHIȚĂ DORINA, ALEEA SNAGOV
NR. 2, AP. 72, SC. 4, ET. 3, CLUJ NAPOCA,
CJ, RO

(54) **PROCEDEE DE OPTIMIZARE A MICROPROPAGĂRII ȘI
CONSERVĂRII *IN VITRO* A PLANTELOR, UTILIZÂND
MIEREA DE ALBINE ȘI APA SĂRĂCITĂ ÎN DEUTERIU**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de creștere a masei vegetale în culturile *in vitro*. Procedeu conform invenției constă din înlocuirea zaharozei și apei distilate din mediul de bază Murashige-Skoog modificat și solidificat cu 7 g/l agar-agar, pH 5,7, lipsit de regulatori de creștere, cu componentele miere de albine și, respectiv, apă

sărăcită în deuteriu, cu un conținut de 25 ppm D, în amestec într-un sistem de dublu strat, sau de temporizare a creșterii fitoinoculilor prin utilizarea individuală a celor două componente.

Revendicări: 2



OFICIUL DE STAT PENTRU INVENTA ȘI MĂRCI
Cerere de brevet de invenție
Nr. 2011 00 050
Data depozit ...12.07.2011...

SA

**PROCEDEE DE OPTIMIZARE A MICROPROPAGĂRII ȘI CONSERVĂRII
IN VITRO A PLANTELOR, UTILIZÂND MIEREA DE ALBINE ȘI APA SĂRĂCITĂ
ÎN DEUTERIU**

DESCRIERE

Domeniul tehnic

Invenția se referă la două proceduri: una de intensificare a creșterii calității și cantității biomasei vegetale obținută prin culturi *in vitro* și cealaltă de conservare *in vitro* a biodiversității vegetale.

Procedurile propuse de noi constă în înlocuirea zaharozei din mediul de cultură, cu miere de albine, respectiv de înlocuire a apei distilate, cu apă sărăcită în deuteriu (D) (cu 25 ppm D) și utilizarea celor două modificări ale mediului de cultură fie individual, fie concomitent, în sistem de simplu strat sau în sistem de dublu strat.

Stadiul tehnicii

În industria de micropropagare există un deosebit interes în direcția identificării de noi tehnici de cultură care să permită îmbunătățirea calității și uneori a cantității de biomasă vegetală, fără ridicarea prețului de producție. Pe de altă parte, în cazul în care se dorește menținerea în vitrocultură a biomasei vegetale, pe o perioadă mai lungă de timp, cu costuri cât mai mici, se încearcă identificarea unor metode de temporizare a creșterii, implicit de prelungire a intervalelor de subkultură.

Potrivit literaturii de specialitate - deosebit de bogată în acest domeniu, ceea ce demonstrează interesul acordat de cercetători acestui fenomen – metodele semnalate în acest sens, până în prezent, sunt diverse. Ele fac referire la fiecare dintre etapele unei micropropagări, pornind de la alegerea tipului de inocul, a momentului prelevării acestuia, a alegerii recipientelor de cultură, la îmbunătățiri ale tehnicilor de inoculare, la identificarea condițiilor optime de incubare și creștere și până la optimizarea mediilor de cultură, în acest ultim domeniu amintit încadrându-se și procedurile care fac obiectul prezentei cereri de brevetare.

Metode de optimizare a micropropagării prin creșterea biomasei vegetale

Încă de la începuturile cultivării *in vitro* a speciilor vegetale optimizarea acestor tehnici a fost vizată de către cercetători. MURASHIGE (1974) și-a adus o contribuție însemnată în dezvoltarea tehnologiilor micropropagării plantelor prin descrierea stadiilor ce trebuie parcurse pentru desăvârșirea acestuia, precum și a constituentilor importanți care nu pot lipsi din compoziția mediului de cultură.

Există diferite rețete de medii de cultură, unele având un conținut ridicat de săruri, așa cum este mediul Murashige – Skoog (1962); alte rețete prevăd o concentrație moderată de compuși anorganici, precum mediul Nitsch – Nistch (1969), sau cu mai puține săruri - mediul White (1963); dar, toate rețetele de medii dețin componentele esențiale, organice și anorganice de care au dispus celulele explantului atât timp cât s-a aflat în planta donoare intactă (CACHIȚĂ, 1987). Alături de componenta minerală, mediile de cultură trebuie să conțină și compuși organici, dintre care vitaminele, facultativ aminoacizi, hidrați de carbon (cu excepția culturilor fotoautotrofe, care se cultivă pe medii lipsite de o sursă de carbon, precum zaharoza, glucoza, fructoza), agar - agar (când se dorește solidificarea mediului) și, adeseori, regulatori de creștere.

Lipsa sursei glucidice din mediu, poate conduce la o necrozare treptată a țesuturilor fitoinoculiilor și la moartea acestora (CACHIȚĂ, 1987). De-alungul anilor au fost numeroase studii de identificare a naturii sau concentrației sursei de carbon, în funcție de scopul dorit sau de specia de interes. Astfel, a fost demonstrat faptul că *creșterea concentrației de zaharoză* în mediul de cultură, de la concentrația prevăzută în rețeta MS (1962), la 120 mM, a îmbunătățit capacitatea de aclimatizare a culturilor de trandafir, ceea ce a condus la atingerea unui procent de *supraviețuire* al exvitroplantulelor, postaclimatizare, de 100% (TAJI și WILLIAMS, 1990).

VAN HUYLENBROECH și DEBERGH (1996) au studiat impactul diferitelor concentrații de zahăr (3% și 6%) prezente în mediul de vitrocultură asupra *fotosintezei* și a *metabolismului carbonului* în decursul perioadei de aclimatizare a exvitroplantulelor de *Spathiphyllum*. Vitroplantulele cultivate pe mediu cu concentrație scăzută de zaharoză, de exemplu de 3%, au prezentat - la finele perioadei de vitrocultură - o activitate fotosintetică, față de cele cultivate pe medii bogate în zaharoză (6%), care aveau un regim mixotrof și un conținut scăzut de clorofilă. Suplimentarea mediului cu zahăr a confirmat, încă o dată, inhibarea fotosintezei (din cauza existenței acestui glucid în substratul de cultură, făcând nefuncționali centrii de reacție fotosintetici), un regim mixotrofic de nutriție și creșterea cantității de amidon și a rezervelor de zaharoză, la finele perioadei de vitrocultură. Nivelul F_v/F_m și o reducere puternică a proceselor fotochimice la nivelul vitroplantulelor cultivate pe mediu cu concentrație ridicată de zaharoză relevă un aparat fotosintetic nefuncțional cu o rată scăzută de oxidare a acceptorului primar (KRAUSE și WEIS, 1991). În primele zile de aclimatizare, fotosinteza netă și activitatea adenzin difosfoglucozo pirofosforilaza (ADPG) scad, atât în cazul utilizării în mediu a 3% zaharoză, cât și a 6% din acest glucid (VAN HUYLENBROECH și DEBERGH, 1996). După o săptămână de la transferarea *ex vitro* a

vitroplantulelor s-a remarcat o creștere treptată a capacității fotosintetizatoare, iar după două săptămâni de aclimatizare nu au mai fost înregistrate diferențe în ceea ce privește fotosinteza, între exvitroplantulele provenite de pe medii de vitrocultură cu 3% sau cu 6% zaharoză.

KEUL și colaboratorii (1999) au arătat că *natura sursei* de carbon glucidic, în decursul multiplicării *in vitro* a plantelor de *Leontopodium alpinum*, joacă un rol important. Autorii citați au testat efectele zaharozei, ale glucozei și ale fructozei, în concentrații de 10, 20 și 30 g/l, asupra capacității de înrădăcinare *in vitro* a neoplantulelor. Din acest punct de vedere, *fructoza*, în concentrație de 20 g/l s-a dovedit a fi cea mai eficientă sursă glucidică. Însă, pe medii cu *glucoză*, KEUL și colaboratorii (1999) au constatat neformarea unui sistem radicular mai bine dezvoltat decât pe mediile cu zaharoză (glucid care este utilizat în mod obișnuit ca sursă energetică în compoziția mediilor de bază pe care sunt vitrocultivați fitoinoculii). Dacă numărul de rădăcinițe a diferit în funcție de natura glucidului prezent în mediul de cultură, creșterea lor a fost mai puțin influențată de concentrația acestora, însă, autorii au observat că, cu cât concentrația de fructoză a crescut în mediu, cu atât s-a înregistrat o reducere a taliei rădăcinițelor. În ceea ce privește glucoza, rezultatul a fost invers, lungimea rădăcinițelor a fost direct proporțională cu concentrația glucozei în mediul de cultură, respectiv lungimea maximă a acestora a fost înregistrată la concentrația de 30 g/l. Și în cazul zaharozei, cele mai bune rezultate - în ceea ce privește rizogeneza - au fost obținute pe mediul care a conținut acest glucid în concentrație de 20 g/l.

DANESH și TAJI (2002) au procedat la *diminuarea concentrației de zaharoză* din mediu și reducerea gradată a umidității relative din incintele vaselor de cultură. Efectele acestei metode s-au materializat prin creșterea cantității de ceară epicuticulară pe suprafața epidermelor foliare și a nivelului de clorofilă, realizându-se și o diminuare a densității stomatelor pe unitatea de suprafață a frunzelor. Procedura a necesitat 3 săptămâni de *preaclimatizare*, după care aclimatizarea *ex vitro* a vitroplantulelor s-a realizat în 10 zile, reducându-se, astfel, costurile de producție în unitățile de micropropagare *in vitro* a trandafirului. Tot prin scăderea concentrației de glucoză, din mediul WPM ½, de la 30 g/l, la 20 g/l, concomitent cu adăugarea de 10 mg.L⁻¹ AIB, ŠEDIVÁ (2009) a reușit o înrădăcinare maximă, de 63% a vitroplantulelor de *Acer platanoides* 'Jirka' și ulterior, aclimatizarea acestora cu succes. ZAVATTIERI și colaboratorii (2009), la *Pinus pinea* L. au încercat stimularea rizogenezei, în vederea aclimatizării vitroplantulelor, încă din perioada de vitrocultură, prin utilizarea diferitelor *combinații de glucoză și zaharoză*, în diferite concentrații, în diferite condiții de temperatură și iluminare aplicate în faza de inducție și expresie a rizogenezei. Rezultatele au arătat o creștere a numărului de rădăcini la lotul de

vitroplantule regenerate pe mediu de cultură cu adaos de 0.117 M glucoză, iar culturile au fost menținute (în aceea perioadă)la întuneric, la 19 °C. Astfel autorii au concluzionat faptul că, în timpul fazei de inducție a procesului de rizogeneză, condițiile optime de vitrocultură presupun lipsa luminii, conținut scăzut de zahăr, și temperaturi medii, toate acestea conducând la alungirea rădăcinilor.

Uneori, suplimentarea concentrației de glucide din mediul de cultură este obligatorie. SHIMASAKI și colaboratorii (2009) au arătat că introducerea în mediul de cultură la *Gloriosa superba* a unor concentrații ridicate de zaharoză, de 80 g L⁻¹, combinat cu 3 μM TDZ (thidiazuron) sau înlocuirea glucozei cu 40 g L⁻¹ trehaloză au fost deosebit de eficiente în sporirea formării de tuberculi la nivelul tulpinițelor.

Înlocuirea zaharozei 3% cu *manitol*, la culturile *in vitro* de garoafe, a condus la înlăturarea fenomenului de vitrificare (ZIV și HALEVY, 1983). În contrast cu aceste concluzii, DEBERGH și colaboratorii (1981) au constatat faptul că, la culturile de anghinare (*Cynara scolymus*) vitrificarea nu a fost afectată de creșterea nivelului de zaharoză în mediul de cultură și nici prin substituirea acesteia cu *manitol*, ceea ce a condus la concluzia că, între specii se înregistrează diferențe de reacție în ceea ce privește răspunsul acestora la creșterea nivelului de carbohidrați în mediul de cultură.

Efectele *amidonului*, ca înlocuitor al zaharozei în mediul de cultură a fost studiat de SLABECKA – SZWEYKOWSA (1955). Autoarea a demonstrat faptul că, la vitroculturile de viță – de – vie, adaosul de hidrolizat enzimatic de amidon a determinat o creștere de trei ori mai mare a taliei vitroplantulelor, comparativ cu martorul. De asemenea, la *Cymbidium*, utilizarea amidonului de porumb în mediul de vitrocultură, ca atare sau în combinație de 2:1 cu zaharoză, ca înlocuitor a zaharozei (30 g/l), a condus la obținerea de sporuri în ceea ce privește creșterea biomasei protocormilor (BLIDAR și colab., 2004).

Asupra culturilor *in vitro* vegetale efectul diferitelor surse de carbon a fost mult studiat, dar înlocuirea zaharozei cu *miere de albine* este un subiect mai puțin studiat (PETRUȘ-VANCEA și colab., 2007). La noi în țară, cercetări în acest sens au fost realizate de către CACHIȚĂ și PĂTRU, în perioada 2000 – 2003 (PĂTRU și CACHIȚĂ, 2003) asupra culturilor de crizanteme, garoafe și *Cymbidium*, dar în sistem de simplu strat și fără adaos de apă sărăcită în deuteriu. Mierea de albine a fost utilizată cu succes în prepararea mediilor de vitrocultură, în scopul îmbunătățirii aclimatizării exvitroplantulelor de orhidee (VANCEA și colab., 2002) sau de crizanteme și violete africane (PETRUȘ - VANCEA și colab., 2007) la mediul septic de viață. În aceste studii, au fost semnalate ușoare inhibări ale organogenezei *in vitro* la protocormii de *Cymbidium* (VANCEA și colab., 2002) sau la plantule de crizanteme

și violete africane (PETRUȘ-VANCEA și colab., 2007) cultivate pe medii de cultura în care zaharoza a fost înlocuită cu miere de albine, de salcâm 20g/l, dar în momentul transferării plantulelor, indiferent de specie, în mediul septic de viață, supraviețuirea lotului crescut *in vitro* pe miere a fost superioară celui provenit de pe mediu a cărui sursă de carbon a fost zaharoza.

La protocormii de *Cymbidium* (VANCEA și PĂTRU, 2002) sau la plantule de crizanteme și violete africane (PETRUȘ-VANCEA și colab., 2007) au fost semnalate ușoare inhibări ale organogenezei *in vitro* cultivați fiind pe medii de cultura în care zaharoza a fost înlocuită cu miere de albine, de salcâm 20g/l, dar în momentul transferării plantulelor, indiferent de specie, în mediul septic de viață, supraviețuirea lotului crescut *in vitro* pe miere a fost superioară celui provenit de pe mediu a cărui sursă de carbon a fost zaharoza.

Culturile tradiționale, dar mai ales cele moderne vor fi în viitor esențiale pentru asigurarea securității alimentelor și furajelor, în condițiile noii politici europene (BOGDAN și colab., 2010; IPATE și colab., 2010) în relație cu conservarea biodiversității și a schimbării climatice (ANTOFIE și colab., 2010).

Alte metode de optimizare a creșterii biomasei vegetale:

- *ventilarea recipientelor:* BLAZCOVÁ și colaboratorii (1989) la *Chenopodium rubrum*, CURNAC și colaboratorii (1991) la *Solanum tuberosum*, SHIM și PAEK (2003) au descoperit că ridicarea ratei de ventilație a accelerat creșterea vitroplantulelor, indiferent dacă zaharoza a fost sau nu prezentă în substratul de cultură. În cazul aplicării aceleiași rate de schimb a aerului, creșterea vitroplantulelor și fotosinteza au fost mai intense la loturile de pe mediu cu zaharoză, comparativ cu parametrii respectivi măsurați la vitroculturile executate pe mediu lipsit de zaharoză.

- *dimensiunea recipientelor de cultură:* PETRUȘ – VANCEA și colaboratorii (2004)

- *utilizarea unor concentrații mai mari sau mai reduse de săruri minerale în mediile de cultură:* WILIAMS (1993) la cultura de *Ptilotas exaltatus* a observat că, prin scăderea concentrației de Ca²⁺ din mediul de vitrocultură umiditatea relativă în vasul de cultură s-a ridicat la 100%. Pe de altă parte, în ultimii ani s-a vehiculat tot mai mult ideea conform căreia, mediile de cultură bogate în nutrienți, precum este mediul MURASHIGE – SKOOG (1962) nu este unul propice creșterii vitroplantulelor (DESJARDINS și colab., 2009). În acest sens, HWANG (2009) concluziona că, elongarea lăstarilor de *Trichosanthes kirilowii*, a fost optimă pe mediu MS, ½, lipsit de regulatori de creștere.

- *reducerea hiperhidriei:* în acest sens am avut contribuții originale, brevetate (CACHIȚĂ și colab., 2010) sau în cursul de brevetare (CACHIȚĂ și colab., în curs de

evaluare) privind prevenirea, respective anihilare hiperhidriei prin înlocuirea apei distilate din mediile de cultură cu apă sărăcită în deuteriu, respectiv cu apă Pi.

- *culturile în dublu strat*: MAENE și DEBERGH (1985) au propus adăugarea la mediul solid, a unui mediu lichid, la sfârșitul stadiului de proliferare, realizând astfel o *cultură în dublu strat*, pentru a obține o alungire a rădăcinilor. Tot o cultură în dublu strat a fost realizată de către CANO-CASTILLO și colaboratorii (2009) la vitrocultură de *Astragalus nitidiflorus*. După o perioadă de menținere a fitoinoculilor pe mediu solid MS cu adaos de BA și K, peste acesta a fost aplicat un al doilea strat, constând din soluție de glucoză 50%, conducând la creșterea numărului de lăstari și de frunze, precum și la stimularea rizogenezei.

- *utilizarea regulatorilor de creștere*: CACHIȚĂ și colaboratorii (1985 - 1986) au testat reacția diferitelor tipuri de explante la cultură *in vitro*, pe medii agarizate, cu adaos de acid 2 – cloroetilfosfonic (ACEP), un generator de etilenă. Rezultatele obținute au fost comparate cu evoluția unor explante similare, crescute pe medii în care unicul regulator de creștere prezent în mediul de cultură a fost fie AIA, fie BA; explante similare au fost cultivate pe medii complet lipsite de aportul vreunui regulator de creștere, lot martor. În general, ACEP a stimulat puternic procesele de morfogeneză la garoafe, orhidee, crizanteme, gerbera, cartof. Concentrația de ACEP nu a modificat natura organogenezei, ci numai amploarea acesteia.

MAENE și DEBERGH (1987) au fost de părere că, alegerea concentrației de citochinină și a compoziției mediului de alungire (stadiul III) este o etapă deosebit de importantă. BA inhibă elongarea uniformă a tulpinițelor și apoi, formarea rădăcinilor. Chinetina, însă, folosită în concentrații optime, poate inhiba dominanța apicală exercitată de către mugurele terminal, facilitând creșterea lăstărașilor laterali.

La orhideea *Epidendrum radicans* s-a studiat (PATELI și colab., 2003) germinarea semințelor și creșterea vitroplantulelor pe medii de cultură *lichide* sau *agarizate*, îmbogățite cu ANA și BA, câte 1 mg l⁻¹ și cu lapte de cocos 15%. Mediul lichid, comparativ cu cel solid, a permis regenerarea de vitroplantule cu talia mult mai mare, precum și neogeneza unui număr mai mare de protocormi.

LEAL și colaboratorii (2009) au menționat că minibutașii de *Isatis tinctoria* L. s-au multiplicat optim pe mediu Gamborg (B5) suplimentat cu 1,0 mg/l BA și nu pe mediu MS-MB, cu același adaos de regulator de creștere, iar adaosul de auxină nu a stimulat creșterea vitroplantulelor, în schimb adaosul de cărbune activ în mediul MS-MB a condus la alungirea tulpinițelor, direct proporțional cu creșterea numărului de noduri la nivelul acestora, ating cele mai ridicate valori când mediul a fost și cu adaos de 1,0 mg/l BA.

- *realizarea de coculturi*: în urma efectuării unor experimente de cocultură, a fost semnalat faptul că, infectarea vitroculturilor cu diferite tulpini de microorganisme a stimulat creșterea plantulelor regenerate din fragmente caulinare care conțineau mugurele apical. Experimentele de biotizare și micorizare *in vitro* sunt multiple (CACHIȚĂ și ARDELEAN, 2009).

Metode de conservare in vitro prin temporizarea creșterii biomasei vegetale

Culturile de țesuturi s-au dovedit a fi nu numai o alternativă în propagarea speciilor vegetale, dar și o procedură eficientă de risc minor în stocarea germoplasmei. Vitroculturile fiind practicate în flacoane de mici dimensiuni, pot fi depozitate în spații restrânse, în variate condiții ecologice, cum ar fi: temperaturi coborâte, întuneric continuu ori semiîntuneric, utilizarea de medii de cultură menite să temporizeze creșterea cormofito inoculilor, imprimând acestora o creștere lentă, mărind, astfel, intervalul de subkultură, de la 1 – 2 luni la 1-2 ani.

În cazul în care se dorește păstrarea vitroculturilor pe o durată cât mai lungă de timp, cu mărirea intervalelor de subkultură, a resurselor genetice recalcitrante la înmulțirea vegetativă a speciei respective, a produselor biotehnologice, cum ar fi de genotipuri de elită, a unor plante rare și specii aflate pe cale de dispariție, se pot practica modificări în regimul ecofizilogic de creștere a fitoinoculilor, folosind diferite metode de reducere a intensității proceselor vitale, fie prin hipoxie (diminuând aportul de oxigen în incintele de creștere), fie prin coborârea presiunii atmosferice, ori prin creșterea presiunii osmotice a substratului de cultură, deshidratând menajat celulele materialului vegetal vitrocultivat, fie prin menținerea culturilor la temperaturi joase, de 4 - 7 °C, în condiții de iluminare scăzută, fie chiar prin păstrarea acestora în azot lichid, la - 196 °C (criostocare).

Pe termen mediu, se realizează și o conservare *in vitro*, prin diferite metode de temporizare a creșterii în vitro cultură, ceea ce conduce la creșterea intervalelor între subculturi, dar, conservarea pe termen lung, se realizează prin crioprezervare în azot lichid la -196 °C.

Există numeroase metode de stocare *in vitro* a germoplasmei constând din vitroplantule, minibutași, propaguli, muguri axilari, bulbi florali, calusuri, suspensii celulare, embrioni somatice, a diferitelor specii vegetale având ca obiectiv reducerea costului de producție (WILLIAMS și TAJI, 1987).

PETRUȘ și colaboratorii (2004) la protocormi de *Cymbidium* inoculați direct într-un mediu MB-MS fie lichid, fie solid, dar într-un singur strat, lipsit de regulatori de creștere, în care apa distilată a fost înlocuită cu apă săracită în deuteriu, în diferite concentrații de deuterium, și anume: 25 ppm D și 87,5 ppm D. Autorii au concluzionat că, la culturile de

protocormi de *Cymbidium* în mediile de cultură lichide, prezența apei sărăcite în deuteriu (cu numai 25 ppm D) a condus la diminuarea drastică a ratei de multiplicare și de creștere a protocormilor, dar culturile pe mediile agarizate, preparate cu apă sărăcită în deuteriu, fie în concentrație de 25 ppm D, fie de 87,5 ppm D, s-au necrozat în totalitate. Aceeași autori au menționat că, la vitroplantule de *Petunia* rizogeneza și caulogeneza au fost evident inhibate de prezența în compoziția mediilor de cultură MB-MS agarizate a apei sărăcitate în deuteriu, atât la concentrația de 25 ppm D, cât și la cea de 87,5 ppm D, ca înlocuitoare a apei distilate.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este realizarea a două proceduri, prima vizând creșterea biomasei vegetale, iar cea de-a doua temporizarea creșterii fitoinoculilor, prin înlocuirea din compoziția mediului de vitrokultură a zaharozei cu miere de labine și/sau a apei distilate cu apă sărăcită în deuteriu (D) (cu 25 ppm D), respectiv prin realizarea unui sistem în dublu strat, în care, peste un strat de mediu de cultură solid, mineral, de bază, Murashige – Skoog (1962), cu modificările aduse de noi, s-a adăugat un al doilea strat, lichid, ca supernatant.

În raport cu stadiul tehnicii, invenția prezintă următoarele avantaje: eficiență bună în producerea rezultatului scontat (creșterea calității și cantității biomasei vegetale); în funcție de scopul dorit, costuri mult mai mici de micropropagare prin reducerea numărului de repicări; aplicabilitate facilă, atât din punct de vedere al componentelor utilizate (mierea de albine și apa sărăcită în deuteriu), cât și a realizării procedurii.

Tehnicile - conform modelelor propuse de noi - vizează fie substituirea totală sau parțială a zaharozei din mediul de cultură cu miere de albine, respectiv a apei distilate din substratul de cultură a fitoinoculilor cu apă sărăcită în deuteriu, fie prin efectuarea de culturi în simplu strat, fie în dublu strat, în care peste mediul de cultură agarizat, pe care se află fitoinoculii, să se aplice un supernatant constând din apă sărăcită în deuteriu și/sau miere de albine.

Noutatea absolută a cercetărilor noastre constă în ipoteza de la care am plecat și care s-a dovedit a fi adevărată, și anume aceea că mierea de albine, în sistem de dublu strat, în amestec cu apa sărăcită în deuteriu (ASD) stimulează creșterea masei vegetale, în timp ce utilizarea individuală a celor doi compusi conduce la temporizarea creșterii vitroplantulelor, metoda utilă când se dorește conservarea *in vitro* a germoplasmei de exemplu prin înființarea unor "living collections".

Se dă în continuare un exemplu de realizare a invenției, respectiv a celor două proceduri, de optimizare a micropropagării:

12-07-2011

12

Pentru a demonstra caracterul de generalitate a procedurilor inițiate de noi, am ales demonstrarea eficienței acestora asupra patru specii vegetale, cu cerințe eco-fiziologice diferite, atât monocotiledonate, cât și dicotiledonate, și anume:

Minibutași uninodali, apicali de sfeclă de zahăr (*Beta vulgaris* var. *Saccharifera*) obținuți dintr-o cultură primară de la vitroplantulelor generate de la nivelul embrionilor zigotici, pe medii de cultură MS (1962) ½;

Propaguli de sparanghel (*Asparagus officinalis*) și de roua cerului (*Drosera rotundifolia*), cultivați pe mediu MS (1962), solid, lipsit de regulatori de creștere;

Protocormi de orhidee (*Cymbidium hybridum*) cultivați pe mediu MS (1962), solid, lipsit de regulatori de creștere.

Mediul de cultură utilizat a fost cel MURASHIGE-SKOOG (MS) (1962), căruia i se aduc unele modificări, și anume: vitaminele tiamină HCl, piridoxină HCl și acid nicotinic, în loc de 0,1 mg/l sau 0,5 mg/l, cât este prevăzut în rețeta originală, sunt adăugate câte 1 mg/l și se scot aminoacizii și se adaugă 7 g/l agar-agar, în loc de 10 g/l; pH-ul mediului de cultură este întotdeauna ajustat la valoarea de 5,7, prealabil autoclavării acestuia.

În experimentele în care *apa distilată* (AD) a fost înlocuită cu *apa sărăcită în deuteriu* (ASD), cu 25 ppm deuteriu (D) se respectă toate celelalte ingrediente menționate anterior, în concentrațiile menționate, precum și regulile generale de preparare a mediului de cultură. Aceeași regulă este respectată și în cazul înlocuirii zaharozei cu miere de albine.

Prepararea de medii de cultură s-a realizat la toate cele 4 specii, conform următoarelor variante experimentale:

Sistem unic strat:

V₀ - MB-MS solid, preparat cu AD și zaharoza 30 g/l (martor)

V₁ - MB-MS preparat cu ASD și zaharoza 30g/l

V₂ - MB-MS preparat cu AD și miere 30 g/l

V₃ - MB-MS preparat cu ASD și miere 30 g/l

Sistem în dublu strat:

V₄ - MB-MS, preparat cu AD și 30g/l+supernatant ASD

V₅ -MB-MS, preparat cu AD și zaharoza 15g/l+ supernatant miere 15g/l, în amestec cu AD

V₆ - MB-MS, preparat cu AD și zaharoza 15g/l+supernatant miere 15 g/l în amestec cu ASD

S-a avut în vedere ca, la fiecare variantă experimentală, conținutul de glucid (indiferent de natura acestuia) să fie, în total, de 30 g/l, atât la culturile practicate în unic strat, cât și în dublu strat. Experimentele s-au repetat de patru ori.

Recipientele de vitrocultură au constat din borcane din sticlă, de 200 ml, cu înălțimea de 8 cm și cu un diametru de 4 cm, cu câte 20 ml mediu solid (primul strat), pentru *subcultura* de sfeclă de zahăr, sparanghel și roua cerului și recipiente din sticlă incoloră, cu înălțime de 7 cm și cu un diametrul de 2 cm, conținând câte 5 ml de mediu solid (primul strat), pentru protocormii de orhidee.

Supernatantul a fost de 5 ml în recipientele în borcane și de 2,5 în recipientele de dimensiuni mai mici (pentru orhidee).

Incubarea și creșterea s-a realizat în camera de creștere la $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, iluminare cu tuburi fluorescente de culoare albă, fotoperioadă de 16h lumină din 24 h, intensitate luminoasă de 1 700 lx. La 30, 60 și 90 de zile au fost realizate biometrizări ale indicilor de creștere. La 90 de zile de la inoculare s-a cântărit și greutate proaspătă și greutate uscată/variantă, la toate cele patru specii.

Datele obținute în urma observațiilor și a măsurătorilor din diferite etape experimentale sunt interpretate statistic prin *analiza varianței* și prelucrate cu ajutorul programului pentru calculator Microsoft Excel, 2007, iar semnificația statistică a fost stabilită cu ajutorul *testului t* din programul pentru calculator de prelucrare statistică SPSS for Windows.

La sfeclă, la 90 de zile de la inoculare, rizogeneza la nivelul vitroplantulelor a fost redusă la vitroplantulele cultivate pe medii control (V_1) și pe cele în simplu strat, în care AD a fost înlocuită cu ASD. Mai mult decât atât, fitoinoculii submersați în supernatant constând din ASD (V_5) nu au prezentat procese de regenerare *in vitro*.

Același efect inhibitor al rizogenezei exercitat de ASD a fost semnalat de către noi [PETRUS-VANCEA și CACHITA (2008 și 2009)] în cazul udării cu acest tip de apă a bazei plantulelor de crizanteme sau de violete africane, pe tot parcursul perioadei de aclimatizare la mediul septic de viață. La culturile de *Cymbidium hybridum* și *Petunia*, amplasate pe mediu MS (1962), în sistem de simplu strat, solid, lipsit de regulatori de creștere, ASD a avut efect de temporizare a creșterii fitoinoculilor, cu rol important în conservarea culturilor *in vitro* (PETRUS și colab., 2004).

În demonstrarea eficienței procedurilor care fac obiectul prezentei cereri de brevetare, tot amestecul de miere și ASD, dar ca supernatant a fost benefic și în stimularea caulogenezei, cele mai lungi tulpinițe, în medie de 2,11 cm, dar și un număr mare de frunzulițe, puține dintre

12-07-2011

ele necrozate fiind înregistrate la vitroplantulele cultivate pe varianta experimentală notată cu V₆. Mediile cu conținut de miere și ASD au generat vitroplantulele cu greutatea proaspătă, respectiv uscată cea mai ridicată, în cazul lotului cultivat pe medii în care amestecul menționat era în stratul solid, de la bază (V₃), rizogeneza fiind stimulată, iar la vitroplantulele regenerate în supernatant constând din cele două componente (V₆), caulogeneza fiind intensificată, în timp ce utilizarea separată a celor doi compuși naturali a generat chiar inhibarea totală a regenerării *in vitro*, precum în cazul ASD utilizată, individual, ca supernatant (V₄). Cel mai optim mediu de cultură pentru sfeclă s-a dovedit a fi cel preparat cu miere, în care AD a fost înlocuită cu ASD (V₃).

La sparanghel, la 90 de zile de la inoculare, rizogeneza la nivelul vitroplantulelor de sparanghel a fost absentă la vitroplantulele cultivate pe medii cu amestec de miere și ASD, fie în simplu strat (V₃), fie ca supernatant (V₆). Valorile indicilor de creștere înregistrate la lotul notat cu V₁ au fost nesemnificative din punct de vedere statistic deoarece acest lot a înregistrat pierderi foarte mari prin lipsa regenerării la nivelul fitoinoculilor, apa sărăcită în deuterium, ca înlocuitoare a AD din stratul solid, exercitând un puternic efect inhibitor al organogenezei.

În schimb, caulogeneza, exprimată prin numărul total de propaguli a fost foarte ridicată pe mediile de cultură practicate în sistem de dublu strat (V₄ – V₆), în special la nivelul vitroplantulelor cultivate pe mediu de cultură preparat cu AD și 30g/l zaharoză, ca prim strat, peste care s-a aplicat ASD ca supernatant (V₄). Tot la nivelul loturilor crescute în sistem de dublu strat (V₄-V₆) au fost semnați și propagulii cu dimensiunile cele mai mari, de până la 3,4 cm.

Direct proporțional cu organogeneza - pusă în evidență la nivelul fitoinoculilor - au fost valorile greutăților proaspete ale vitroplantulelor, la nivelul variantelor experimentale testate. În schimb, greutatea uscată a vitroplantulelor crescute pe mediul preparat cu AD și zaharoză 15g/l, plus supernatant miere 15g/l, în amestec cu AD (V₅) (a cărui greutate proaspătă a fost cea mai ridicată) a marcat valori asemănătoare cu cele înregistrate la celelalte două loturi cultivate pe medii cu supernatant (V₄ și V₆).

La roua cerului, la 90 de zile de la inoculare, indicii de creștere - atât în ceea ce privește rizogeneza, cât și caulogeneza - cei mai ridicați au fost identificați la loturile de vitroplantule cultivate în regim de dublu strat (V₄ – V₆), în schimb procentul de supraviețuire *in vitro* și de regenerare de neoplantule a fost maxim doar la varianta experimentală codată V₁, constând din mediu MB-MS preparat cu ASD și zaharoză 30g/l.

12-07-2011

La orhidea *Cymbidium*, la 90 de zile de la inoculare, loturile cultivate pe medii în dublu strat se disting clar de lotul martor, atât din punct de vedere cantitativ, cât și calitativ, implicit ca procent de supraviețuire *in vitro*.

Concluziile care se pot formula sunt următoarele: 1). Sistemul în dublu strat prin combinarea apei sărăcite în deuteriu (cu 25 ppm D) cu miere de albine a condus la creșterea calității și cantității biomasei vegetale, atât la sfecla de zahăr și sparanghel, cât și la roua cerului și cimbidium, metoda putându-se considera cu caracter de generalitate; 2). Prin utilizarea individuală a apei sărăcite în deuteriu (cu 25 ppm D) ca înlocuitoare a apei distilate din mediile de vitrocultură se obține temporizarea creșterii biomasei vegetale, metodă utilă în vitroconservare. Același efect inhibitor al creșterii îl prezintă și mierea de albine, ca înlocuitoare a zaharozei din mediile de cultură.

Implicațiile economice ale procedeelelor identificate în prezentele cercetări sunt importante, deoarece am reușit să rezolvăm două dintre cele mai delicate probleme ale culturii *in vitro*, în special la specii recalcitrante la astfel de proceduri, precum sfecla și sparanghelul, respectiv hiperhidria și cantitatea de biomasă vegetală, grație combinației reușite dintre apa sărăcită în deuteriu și mierea de albine. Amestecând mierea de albine cu apă sărăcită în deuteriu (cu 25 ppm D) am reușit să atingem două obiective de importanță majoră în micropropagare, și anume creșterea biomasei în vitrocultură și prevenirea instalării hiperhidriei la speciile predispuse acestui fenomen, eliminându-se astfel pierderile de producție și reducându-se costurile obținerii de material vegetal sănătos, impactul bio-economic fiind unul cert.

După identificarea celor două proceduri noi de cultivare *in vitro* cu rezultate pozitive în ceea ce privește scopul propus, și anume creșterea calității și cantității masei vegetale, respectiv temporizarea creșterii fitoinoculilor, cu prevenirea fenomenului de hiperhidrie și fără ridicarea prețului de producție, ne-am propus să continuăm testele asupra materialului vegetal rezultat prin aceste noi proceduri, prin testarea viabilității ulterioare a acestuia, fie în vederea subcultivării lui, fie în scopul transferării în condiții naturale de viață. Astfel că, la 90 de zile de cultivare conform variantelor experimentale descrise anterior, s-a procedat fie la subcultivarea minibutasilor, uninodali apicali de sfeclă, sau a propagulilor de sparanghel și roua cerului pe medii MS proaspete, solide, lipsite de regulatori de creștere, fie aclimatizarea vitroplantulelor la mediul septic de viață, iar în cazul orhideei, protocormii regenerați *in vitro* au fost subcultivați pe medii proaspete, solide, tot lipsite de regulatori de creștere. La 30 de zile de la inițierea experimentelor de testare a viabilității fitoinoculilor obținuți prin tehnicile noi de micropropagare care fac obiectul prezentei cereri de brevetare, am concluzionat că, în

funcție de scopul dorit putem stabili care dintre variantele experimentale nou identificate pentru stimularea calității și cantității materialului vegetal produs prin micropopagare poate fi utilizată. Tehnicile care presupun simplu, respectiv dublu strat, cu adaos de miere de albine ca înlocuitoare parțială sau totală a zaharozei sau cu adaos de apă sărăcită în deuteriu sunt viabile și ele pot fi utilizate cu certitudine fără a exista riscul pierderii în timp a viabilității materialului vegetal. Toate cele patru specii de plante s-au pretat tehnicilor noi de micropopagare, acestea conducând nu numai la creșterea calității și cantității masei vegetale, ci și ulterior la continuarea etapelor micropropagării, fie prin subkultură, fie prin aclimatizare, motiv pentru care reconfirmăm caracterul de generalitate a tehnicilor noi de micropropagare testate. Neoplantulele și protocormii regenerați *in vitro* pe medii de cultură ca au indus temporizarea creșterii au fost la fel de viabili ca și cei la care creștere a fost stimulată.

Rezultatea cercetarilor vor fi utile bioindustriei, in producerea de biomasă prin biotehnologii vegetale, domeniu de baza al productiei de alimente in anii ce vor urma.

Bibliografie

- Antofie, M.M., Constantinovici, D., Pop, M.R., Iagrăru, P., Sand,C., Cirotea, G., 2010. Theoretical methodology for assesing the status of conservation of crop landraces in Romania. *Analele Universității din Oradea – Fascicula Biologie*, Tom. XVII (2), pp. 313-317.
- Blazcová, A., Ullmann, J., Josefusová, Z., Machácková, I., 1989, The influence of gaseous phase on growth of plants *in vitro* - the effect of different types of stoppers. *Acta Horti*, 251, pp. 209 - 214.
- Blidar, C.F., Cachiță, C.D., Petruș-Vancea, A., Drăghici, F., 2004, Vitroculturile de protocormi de *Cymbidium* pe medii cu amidon de porumb ca înlocuitor parțial sau total al zaharozei. În: *Lucrările celui de al XII-lea Simpozion Național de Culturi de Țesuturi și Celule Vegetale*, intitulat „Fiziopatologia celulei vegetale în regim de vitrocultură”. Cachiță, C.D., Ardelean, A., Fati, V. (eds.), Editura Daya, Satu-Mare, pp. 203 - 212.
- Bogdan, A.T., Ipate, I., Bara, V., Diaconescu, D., Purcarea, C., Strateanu, A.G., 2010. Ecoeconomic and bioeconomic impact of food safety and security in perspective increased consumption of food and feed during 2030-2100. *International Symposium “Risk Factors for Environment and Food Safety”*, Faculty of Environmental Protection, November 5 - 6, Oradea 2010, pp.1044 – 1056.
- Cachiță, C.D., 1987, *Metode in vitro la plantele de cultură*, Editura Ceres, București.
- Cachiță, C.D., Ardelean, A., 2009, *Tratat de biotehnologie vegetală. Vol 2*. Editura Dacia, Cluj – Napoca.
- Cachiță, C.D., Ardelean, A., 2009, Studiarea fenomenelor de fitopatogenitate și a celor de fitosimbioză prin intermediul vitroculturilor. *Cocultura*. În: *Tratat de biotehnologie vegetală, Vol. II*. Editura Dacia.
- Cachita, C.D., Petrus-Vancea, A., Radovet, D., Proceduri de prevenire sau de anihilare a hiperhidriei la fitoinoculi, prin utilizarea apei sărăcite în deuteriu, Număr Patent RO 125649-A2, din 30.08.2010, International Patent Classification A01N-02500; C01B005/00.
- Cachita, C.D., Petrus-Vancea, A., Radovet, D., Proceduri de prevenire sau de anihilare a hiperhidriei la fitoinoculi, prin utilizarea Pi, Cerere de brevet, Nr. A/00736 din 13.08.2010 la OSIM Bucuresti.

- Cachiță, C.D., Deliu, C., Rakosy T.L., Ardelean, A., 2004, *Tratat de biotehnologie vegetală*. Vol. 1. Editura Dacia, Cluj – Napoca.
- Cano-Castillo, M., Serrano-Martínez, F., Casas, J.L., 2009, *In vitro* propagation of *Astragalus nitidiflorus* (leguminosae), an endemic and endangered species from south-east of Spain. *Acta Horticulturae*, 812, pp. 545-550.
- Cournac, L., Dimon, B., Carrier, P., Iohou, A., Chagvardiff, P., 1991, Growth and photosynthetic characteristics of *Solanum tuberosum* plantlets cultivated *in vitro* in different conditions of aeration, sucrose supply and CO₂ enrichment. *Plant Physiology*, 97, pp. 112 – 117.
- Danesh, M., Taji, A., 2002, Acclimatization of tissue – cultured *Rose* via *in vitro* RH reduction. *Agricell Report*, 3, p. 1 și 18.
- Debergh, P.C., Harboui, Y., Leweur, R., 1981, Mass propagation of globe artichoke (*Cynara scolymus*): Evaluation of different hypotheses to overcome vitrification with special reference to water potential. *Physiol. Plantar*, 53, pp. 181 – 187.
- Desjardins, Y., Dubuc, J.-F., Badr, A., 2009, *In vitro* culture of plants: A stressful activity! *Acta Hort. (ISHS)* 812, pp. 29-50.
- Hwang, S.J., 2009, High frequency shoots regeneration from stem explants of *Trichosanthes kirilowii* via organogenesis. *Acta Horticulturae*, 812, pp. 241-245.
- Ipate, I., Bogdan, A.T., Paraschivescu, M., Sandu, M., Ivana, S., Ipate, N., Strateanu, A. G., Toba, G., Enache, M., 2010. Use rare breed for genuine foods in Romanian rural tourism and possibility of traceability the traditional products. *Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnologies*, 67(1-2), pp. 225-230.
- Keul, B.A., Bindea, G., Deliu, M.C., Deliu, C., 1999, Influența sursei de carbon asupra organogenezei și inducerii calusului la *Leontopodium alpinum* Cass. În: *Lucrările reunite ale celui de al VII-lea și al VIII-lea Simpozion Național de Culturi de Țesuturi și Celule Vegetale, Arad 1997 și Buziaș 1998, intitulat “Culturi “in vitro” la cormofite”*. Cachiță, C.D., Ardelean, A., Crăciun, C. (eds.), Editura Risoprint Cluj-Napoca, pp. 82 – 84.
- Krause, G.H., Weis, E., 1991, Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Annu.Rev.Plant Psysiol.Plant Mol.Biol.*, 42, pp. 313 – 349.
- Leal, F., Cipriano, J., Carnide, V., Pinto-Carnide, O., 2009, *In vitro* culture establishment of woad (*Isatis tinctoria* L.). *Acta Horticulturae*, 812, pp. 121-124.
- Maene, L.J., Debergh, P.C., 1985, Liquid medium additions to established tissue cultures to improve elongation and rooting *in vitro*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 5, pp. 23 – 33.
- Maene, L.J., Debergh, P.C., 1987, Optimisation of the transfer of tissue cultured shoots to *in vivo* conditions. *Acta Horticulturae*, 212, pp. 335 - 348.
- Murashige, T., 1974, Plant propagation through tissue culture. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 25, pp. 135 – 166.
- Murashige T, Skoog F, 1962, A revised medium for rapid growth bioassays with tobacco tissue cultures, *Physiol. Plant.*, 15, pp. 473–497.
- Pateli, P., Papafotiou, M., Chronopoulos, J., 2003, Influence of *in vitro* culture medium on *Epidendrum radicans* seed germination, seedling growth and *ex vitro* establishment. In: *Proceedings of the first international symposium on acclimatization and establishment of micropropagated plants*. Economou, A.S., Read, P.E. (eds.), *Acta Horticulturae*, 616, pp. 151 – 156.
- Petruș, C.M., Cachiță, C.D., Petruș – Vancea, A., 2004 a, Micropropagarea la *Cymbidium* și *Petunia* pe medii de cultură preparate cu apă sărăcită în deuteriu. În: *Lucrările celui de al XII -lea Simpozion Național de Culturi de Țesuturi și Celule Vegetale, intitulat “Fiziopatologia celulei vegetale în regim de vitrocultură”*. Cachiță, C.D., Ardelean, A., Fati, V. (eds.), Editura Dacia Satu – Mare, pp. 185 – 192.

- Petruș - Vancea, A., Cachiță, C.D., 2008, Regards on *Chrysanthemum* (*Chrysanthemum morifolium* Ramat var. *Lamet*), leaf epidermis which were sprinkled, during "ex vitro" acclimatization period, with Pi water and deuterium depleted water. *Studia Univ. Vasile Goldiș, Seria Șt. Vieții* vol. 18/2008, pp. 81 – 86.
- Petruș – Vancea, A., Cachiță, C.D., 2009, The effect of Pi or deuterium depleted water on foliar stomata of *Saintpaulia ionantha* L. exvitroplantlets sprinkled foliar or radicular. *Studia Univ. Vasile Goldiș, Seria Șt. Vieții*, Vol. 19/2/2009, pp. 309 – 312.
- Petruș – Vancea, A., Cachiță, C.D., Blidar, C.F., Filip, C., 2004, Influența tipului de vas de vitrocultură și a cărbunelui activ asupra organogenezei "in vitro" la minibutașii de *Petunia*. În: *Lucrările celui de al XII -lea Simpozion Național de Culturi de Țesuturi și Celule Vegetale, intitulat "Fiziopatologia celulei vegetale în regim de vitrocultură"*. Cachiță, C.D., Ardelean, A. (eds.), Editura Daya, Satu – Mare, pp. 178 – 184.
- Petruș – Vancea, A., Bandici, G.E., Radovet, D., Blidar, C.F., 2007, The acclimatization capacity of the *Saintpaulia* and of the *Chrysanthemum* exvitroplantlets, derived from vitroculture medium in which the saccharose was replaced with honey. *Analele Universității din Craiova, Vol XII (XLVIII), Secțiunea Biologie*, pp. 209-214.
- Pătru, D.M., Cachiță, C.D., 2003, Cultivarea minibutașilor de crizanteme pe medii de cultură cu fructoză. În: *Lucrările celui de al XI-lea simpozion Simpozion Național de Culturi de Țesuturi și Celule Vegetale, intitulat "Omagiu dedicat lui G. Haberlandt (100 de ani de la lansarea teoriei totipotentialității celulei vegetale și lui Morel și Martin (50 de ani de la realizarea de vitroculturi libere de viroze)"*. Cachiță C.D., Ardelean A. (eds.), Editura Daya, Satu-Mare, pp. 86 – 92.
- Vancea, A., Cachiță, C.D., Pătru, D.M., 2002, Capacitatea adaptativă a vitroplantulelor de *Cymbidium hybridum* la viața *ex vitro*, provenite de pe medii cu miere de albine, ca înlocuitoare a zaharozei. *Analele Univ. Oradea, Fasc. Biologie, Tom. IX*, pp. 213 - 218.
- Zavattieri, A., Lima, M., Sobral, V., Oliveira, P., Costa, A., 2009, Effects of carbon source, carbon concentration and culture conditions on *in vitro* rooting of *Pinus pinea* L. microshoots. *Acta Horticulturae*, 812, pp.173-180.
- Shim, S.W., Paek, K.Y., 2003, Effect of air exchanges on *in vitro* growth and *ex vitro* survival. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 75, pp. 57 – 62.
- Shimasaki, K., Sakuma, K., Nishimura, Y., 2009, Tuber formation of *Gloriosa superba* using stem sections of branches under cultivation. *Acta Horticulturae*, 812, pp. 245-250.
- Slabecka – Szwevkowska, A., 1955, On the influence of the wave length of light on the biogenesis of anthocyanin pigment in the *Vitis vinifera* tissue *in vitro*. *Acta.Soc.Bot.*, 24, pp. 3 – 11.
- Šedivá, J., 2009, Influence of explant type, sucrose and IBA on *in vitro* growth of *Acer platanoides* L. 'Jirka'. *Acta Horticulturae*, 812, pp. 185-188.
- Taji, A.M., Williams, R.R., 1990, Propagation of Australian by tissue culture. *Australian Horticulture*, 88, pp. 89 – 92.
- Van Huylenbroeck, J.M., Debergh, P.C., 1996, Impact of sugar concentration in vitro on photosynthesis and carbon metabolism during ex vitro acclimatization. *Plant. Physiol.*, 96, pp. 298 – 304.
- Williams, R.R., 1993, Mineral nutrition in vitro - A mechanistic approach. *Aust. J. Bot.*, 41, pp. 227 – 251.
- Williams, R.R., Taji, A.M., 1989, Auxin type, gel concentration, rooting, and survival of *Cheiranthra volubilis in vitro*. *HortScience*, 24, pp. 305 – 307.
- Ziv, M., Halevy. A.H., 1983, Factors influencing the production of hardened glaucous carnation plantlets in vitro. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 2, pp. 55 – 65.

REVENDICĂRI

Procedură de creștere a biomasei vegetale în vitrocultură, **caracterizată prin aceea că** utilizează mierea de albine și apa sărăcită în deuteriu, în prepararea mediul de cultură destinat creșterii culturilor *in vitro* vegetale.

Procedură de temporizare a creșterii fitoinoculilor, **caracterizată prin aceea că** utilizează mierea de albine sau apa sărăcită în deuteriu, în prepararea mediul de cultură destinat creșterii culturilor *in vitro* vegetale