



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2012 00772

(22) Data de depozit: 30.10.2012

(41) Data publicării cererii:  
30.04.2014 BOPI nr. 4/2014

(71) Solicitant:  
• UNIVERSITATEA DE VEST "VASILE  
GOLDIȘ" DIN ARAD, BD. REVOLUȚIEI  
NR. 94-96, ARAD, AR, RO

(72) Inventatori:  
• RADOVEȚ DORINA, STR. TRANSILVANIEI  
NR. 33, BL. B 58, ET. 4, AP. 25, ORADEA, BH,  
RO;

• CACHIȚĂ DORINA, ALEEA SNAGOV  
NR. 2, AP. 72, SC. 4, ET. 3, CLUJ NAPOCA,  
CJ, RO;  
• ȚURCUȘ VIOLETA, STR. TÂRGULUI  
NR. 5-7, BL. 15, ARAD, AR, RO;  
• PETRUȘ ADRIANA, STR. ROȘIORILOR  
NR. 19, BL. PB 18, ET. 4, AP. 19, ORADEA,  
BH, RO

(54) PROCEDURĂ DE TEMPORIZARE A CREȘTERII  
FITOINOCULILOR PRIN ÎNLOCUIREA AGAR-AGARULUI CU  
UN AGENT GELIFIANT SINTETIC

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un metodă de conservare *in vitro* a unor fitoinoculi. Metoda conform invenției constă din cultivarea fitoinoculilor în regim de creștere lentă, într-un mediu de vitrocultură de tip polimetilviniliter în combinație cu acid maleic, săruri de sodiu, săruri de calciu, un amestec de petrolatum și parafină lichidă, și

o gumă celulozică, sub forma unei paste de consistență semisolidă, ce are ca efect o scădere a numărului de subculturi, fără a afecta capacitatea regenerativă a fitoinoculilor.

Revendicări: 1



2012 - 00772  
30.10.2012  
42

## PROCEDURĂ DE TEMPORIZARE A CREȘTERII FITOINOCULILOR PRIN ÎNLOCUIREA AGAR-AGARULUI CU UN AGENT GELIFICANT SINTETIC

### DESCRIERE

#### Domeniul tehnic

În principal, invenția se referă la o nouă procedură de încetinire a creșterii vitroplantulelor, sau a altor tipuri de vitroculturi vegetale, în scopul conservării lor „*in vitro*” prin înlocuirea agar-agarului din compoziția mediului de cultură, cu un agent gelificant, complex, de tipul *metilvinileter*.

#### Stadiul tehnicii

Potrivit ONU, populația globală se estimează să crească de la 7 miliarde, în prezent, la 9,1 miliarde, până în anul 2050. În prima jumătate a acestui secol, cererea mondială de alimente și de furaje este de așteptat să crească cu 70%. Cererea de produse, de proveniență vegetală, în viitor, va pune o presiune crescândă asupra resurselor agricole, care sunt deja limitate. În timp ce agricultura va fi obligată să concureze pentru terenuri și apă, cu întinsele așezări urbane, va fi, de asemenea, necesar să contribuie la contracararea daunelor produse de schimbările climatice de pe pământ, iar biologii să se preocupe, și să găsească soluții, pentru conservarea habitatelor naturale și menținerea biodiversității pe Terra. Pentru a răspunde acestor cerințe, fermierii vor avea nevoie de noi tehnologii pentru a produce mai mult de pe mai puține terenuri, cu personal și costuri mai scăzute – motiv pentru care *Băncile de Gene* au rolul major în păstrarea genotipurilor valoroase din punct de vedere ecosanogen (Bogdan și colab, 2010; Loy și colab, 2010; FAO, 2012).

Conservarea resurselor vegetale sub formă de *vitroculturi* constituie una dintre cele mai importante direcții de valorificare practică a culturilor de țesuturi și celule vegetale, actualmente evidențiindu-se utilitatea noilor biotehnologii atât din punct de vedere calitativ, prin diversificarea componentei genetice a celulelor vegetale supuse conservării, cât și din punct de vedere cantitativ, prin multiplicarea speciilor conservate, solicitate la un moment dat în variate scopuri. Pe de altă parte, conservarea unui material vegetal aflat deja în vitrocultură se referă la o reducere sau o stopare, temporară, a proceselor vitale, la nivelul celulelor fitoinoculilor, cu menținerea șanselor de a readuce – după dorință – culturile respective la viață activă, normală, cu multiplicarea celulelor, țesuturilor și a organelor, și regenerarea genotipului conservat, fără pierderea capacităților morfofiziologice și biochimice ale acestuia, conservarea având rolul de a temporiza – pe o durată mai scurtă sau mai lungă de timp –

procesele de creștere și de dezvoltare ce se desfășoară la nivelul vitroculturilor vegetale (Cachiță și colab., 2004; Cachiță și Sand, 2011; Ciobanu și colab., 2011a).

Potrivit literaturii de specialitate, care este deosebit de bogată în acest domeniu (vezi Cachiță și Sand, 2011), s-a demonstrat că, metodele convenționale de conservare a materialului vegetal în *Băncile de Gene* sunt fie sub formă de semințe, de polen sau de organe de înmulțire vegetativă, fie sunt colecții de plante menținute în teren (care, din păcate, nu oferă certitudini în ceea ce privește menținerea varietății covorului vegetal sau a plantelor de interes teoretic ori practic, sunt supuse variabilității, dar și condițiilor meteorologice extreme), fie sub formă de *vitroculturi*.

Metodele de stocare și de păstrare a materialului vegetal sub formă de *culturi de țesuturi și celule*, în condiții de asepsie totală, se încadrează în categoria procedurilor moderne de conservare a genotipurilor valoroase. Actualmente, biotehnologia își îndreaptă atenția și asupra elaborării de soluții pentru stocare și apoi clonarea rapidă a acestora, prin multiplicare *in vitro*, după încheierea etapei de vitroconservare (Withers, 1990, Yoshimatsu și colab., 2000), ceea ce constituie un aspect foarte important în cadrul micropropagării (Ciobanu și colab., 2011).

De-a lungul anilor au fost utilizate variate metode de temporizare (diminuarea) a ratei de creștere a fitoinoculilor, ele vizând mărirea intervalului de subcultură și îmbunătățirea randamentului în micropropagare. În cele ce urmează vom descrie câteva din principalele proceduri utilizate în acest scop:

- ✦ utilizarea unui *minim de mediu de cultură*, pentru vitrocultivarea fitoinoculilor în regim de *creștere „lentă*, sau introducerea în mediu a unor *regulatori de creștere*, ori folosirea de medii de cultură lipsite de zaharoză (Jones, 1974), sau introducerea de acid abscisic în substratul de cultură (Henshaw și colab., 1978), ori adăugarea de azotat de argint (Turhan, 2004), sau de diaminozidă, manitol sau sorbitol în mediu (Ciobanu și colab., 2011b) etc;
- ✦ utilizarea *uleiului mineral*, ca supernatant, mai ales pentru culturile de calus provenite din țesuturi de la plantule de cartof (Caplin, 1959), va temporiza creșterea fitoinoculilor; stocarea culturilor de țesuturi de plante medicinale vitrocultivate, acoperite fiind cu un strat de *ulei mineral*, timp de 4-6 luni, nu a necesitat operarea de frecvente subculturi (Augereau și colab., 1986); conservarea vitroculturilor de mugurași de *Lilium martagon*, și de *Lilium candidum* sub un strat de *ulei de parafină* (Bolba, 2004), ori de ulei de parafină și de *ulei de ricin* (Petruș și colab., 2006), sau de *ulei de silicon* a acționat benefic asupra menținerii vitalității fitoinoculilor cu toate

că s-a mărit intervalul de subcultură etc. (Radoveț și colab., 2008; Radoveț și Cachiță, 2012) etc.;

- ✚ stocarea timp de un an de zile a calusului *desicat* de *Daucus carota*, ori de embrionii somatici, după intrarea lor într-un regim optim de vitrocultură, a dovedit intrarea acestora într-un proces de normalitate, inclusiv embrionii germinând (Gray, 1987; Nitzsche, 2004; Baciș și colab., 2007) etc.;
- ✚ *presiune/cantitate scăzută de oxigen*, în atmosfera din recipientele cu fitoinoculi, a constituit o procedură care a fost operațională în ceea ce privește temporizarea creșterii culturilor de țesuturi, vegetale, pentru mărirea intervalului de subcultivare (Bridgen și Staby, 1981);
- ✚ folosirea *temperaturilor scăzute*, pozitive, cuprinse între 2-8°C, în camerele de stocare (cu evitarea înghețării) a fitoinoculilor, a menținut timp îndelungat viabilitatea acestora (Aitken – Christie și Singh, 1987) sau 10°C (Hassan, 2004);
- ✚ cel mai adesea, pentru conservare pe termen lung a fitoinoculilor este practică metoda *crioconservării*, prin aducerea la un nivel zero al metabolismului celular, prin *înghețarea* culturilor în azot lichid (-196°C) - (Bajaj, 1990; Halmagyi și colab, 2003; Baciș și colab., 2007; Cachiță și Sand, 2011).

În industria de micropropagare a speciilor vegetale de interes bioeconomic, utilizarea unor agenți gelificanți este necesară pentru solidificarea mediilor de cultură aseptice, destinate creșterii *in vitro* a variatelor tipuri de explante (fitoinoculi), susținerea lor fiind indispensabilă pentru anumite categorii de inoculi, regimul de submersie – la unii dintre fitoinoculi – cauzând nenumărate implicații fiziologice negative, în ceea ce privește aprovizionarea țesuturilor lor cu oxigen.

Adeseori, evoluția fitoinoculilor, morfogeneza, creșterea și diferențierea la nivelul acestora, depind de calitatea agarului, acest ingredient influențând nu numai dezvoltarea fitoinoculilor, ci și scăderea prețului de producție, respectiv de desfacere a materialului de plantat generat *in vitro*. Reducerea prețului de cost este un motiv în plus de a se investiga metode noi de înlocuire – totală sau parțială – a agarului, cu diferite tipuri de substraturi eficiente de susținere a vitroculturilor. dar care să aibă un preț de producție cât mai scăzut, în vederea valorificării unui astfel de produs pe scară industrială.

În literatura de specialitate sunt descrise numeroase soluții pentru înlocuirea agarului și, eventual, reducerea costurilor, dar majoritatea au avut efecte de stimulare a creșterii fitoinoculilor, cum este *sago* (amidonul comestibil prelucrat, gelatinizat), care a fost folosit cu succes ca agent de gelificare a mediului de cultură, metoda fiind utilizată de către Naik și

Sarkar (2001). Acest înlocuitor de agar a favorizat o creștere optimă a 10 genotipuri de cartof (*Solanum tuberosum* L.); Arregui și colaboratorii (2003) a înlocuit agarul cu *Phytigel*, produs care – la cartof – comparativ cu agarul, a indus mult mai rapid microtuberizarea și a stimulat formarea unui număr mult mai mare de minituberculi. Cachiță și colaboratorii (1995) au utilizat, ca suport de susținere a fitoinoculilor, un material vegetal denumit de autori *lignoskeleton* (brevet de invenție românesc Nr. 110018 B1, din 1995), dimensionat din fructe de luffa; alții, sau utilizat diferite fibre sintetice, de poliamidă sau sferule de poliacrilat (Cachiță și Sand, 2011). Blidar și Cachiță (2005) au constatat faptul că, la nivelul minibutașilor binodali de cartof, cultivați în regim de vitrocultură, pe substrat lignoscheletic de luffa (ca înlocuitor al agar-agarului), au fost evidențiate cele mai rapide și intense procese regenerative, de creștere și de organogeneză. Duong Tan Nhut și colaboratorii (2006) au realizat un sistem hidroponic *in vitro*, în scopul producerii de minituberculi de cartof, de pe un sistem hidroponic „triplustrat”, alcătuit din fibre de bumbac, aceștia au recoltat minituberculi cu dimensiuni mult mai mari, față de sistemul triplu strat din hârtie de filtru. Mohamed și colaboratorii (2010) au experimentat producerea de vitroplantule de cartof, de calitate superioară, pe mediu de cultură gelificat cu 0,1 sau 2 g/l agar, în amestec cu 40, 50 sau 60 g/l amidon de porumb, sau de cartof. Majoritatea procedeele de înlocuire a agarului au avut ca scop stimularea creșterii inoculilor, ceea ce este remarcabil pentru micropropagare, dacă obiectivele urmărite au fost de această natură.

**Problema tehnică** pe care o rezolvă prezenta propunere de invenție este înlocuirea agar-agarului din compoziția mediului de vitrocultură, cu un agent gelifiant care, practic, să fie și cu efecte antibacteriene, și care să determine *temporizarea* (diminuarea) creșterii fitoinoculilor, fără a afecta capacitatea regenerativă a acestora, în subkultură. Metoda este utilă atunci când se dorește conservarea *in vitro* a fitoinoculilor, în scopul măririi intervalelor de subkultură, implicit cu reducere costului de întreținere a vitroculturilor, menținând capacitatea regenerativă a vitroculturilor ce au fost conservate, fără a afecta – în etapa de micropropagare – clonarea acestora.

În raport cu stadiul tehnicilor existente în acest domeniu, prezenta propunere de invenție are următoarele avantaje: eficiență în *temporizarea creșterii fitoinoculilor* și *diminuarea numărului de subculturi*. Prin mărirea intervalului de subkultură a genotipurilor vegetale stocate în *Banca de Gene* nu este afectată capacitatea regenerativă a fitoinoculilor, menținându-se eficiența în micropropagare. Substratul realizat de noi, descris în prezenta propunere de invenție, este moale, elastic, dar suficient de ferm pentru a susține materialului vegetal vitrocultivat, împiedicând scufundarea acestuia în mediu de cultură. Însă, cel mai

important efect s-a dovedit a fi capacitatea produsului „*Polii*” de a încetini creșterea fitoinoculilor, fără a provoca daune remanente, de inhibare a creșterii materialului vegetal în momentul subcultivării acestuia în regim optim de vitrocultură. Produsul testat de noi, care face obiectul prezentei cereri de brevetare, prezintă aplicabilitate facilă, atât din punctul de vedere al prezentării produsului, cât și a realizării procedurii, în sensul că el nu produce o afectare a compoziției mediului de cultură, cum ar fi precipitarea sau cristalizarea componentelor folosiți în mod tradițional sau schimbări de pH, agentul gelifiant propus de noi fiind inert din punct de vedere chimic; el este ușor manevrabil și se procură din comerț.

Cercetările executate de noi cu acest produs au fost făcute cu variate modele experimentale și s-a testat reacția fitoinoculilor proveniți de la mai multe specii vegetale (plante ierboase, sau lemnoase), de interes alimentar sau ornamental, chiar și medicinal, precum și de la specii care se regăsesc în flora spontană.

În continuare, prezentăm câteva exemple de realizare a invenției, respectiv a procedurii de înlocuire a agar-agarului, din mediile de cultură destinate cultivării „*in vitro*” a explantelor vegetale, având ca efect o temporizare a creșterii fitoinoculilor, cu mărirea intervalului de subcultură, fără a afecta capacitatea regenerativă a acestora.

Procedeul conform invenției noastre are la bază substituirea totală a agar-agarului din mediul de cultură, cu un agent gelifiant, complex, care este alcătuit – din punct de vedere chimic – dintr-un *polimetilvinileter combinat* cu *acid maleic*, cu *săruri de sodiu* și de *calciu*, cu o *mixtură de hidrocarburi* (petrolat și parafină lichidă) și cu o gumă celulozică; produsul care este comercializat sub forma unei paste de consistență semisolidă este utilizată ca adeziv în practica stomatologică. Ea are nu numai rol de adeziv, ci și proprietăți antibacteriene (conform prospectului).

Mediul de cultură MS – Murashige-Skoog (1962) – solidificat prin intermediul produsului denumit de noi *Polii* (abreviere care derivă de la compusul de bază al adezivului utilizat de noi ca agent de gelificare, înlocuitor de agar-agar, respectiv *polimetilvinileter*), a fost folosit în tehnicile de vitroculturi vegetale, pentru prima oară, de către noi, în scopul cultivării fitoinoculilor în regim de *creștere lentă*. Întrucât produsul nu a mai fost folosit de către de alți autori, la nivel național sau internațional, am considerat că acest tip de mediu poate constitui obiectul prezentei cereri de brevetare. În literatura de specialitate nu am identificat date referitoare la utilizarea unui astfel de agent aderent ca gelifiant al mediilor de cultură destinate vitroculturilor.

Potrivit concepției noastre, în scopul gelificării (solidificării) mediului de cultură, clasic, MS lichid – (Murashige-Skoog, 1962) – ce constă dintr-o serie de macroelemente,

microelemente și FeEDTA, în formularea noastră eliminând din acesta regulatorii de creștere și glicină, dar menținând adaosul de vitamine: tiamină HCl, piridoxină HCl și acid nicotinic, câte 1 mg/l, și de mezo-inozitol 100 mg/l și de zaharoză 30 g/l, și înlocuind agar-agarul – în loc de 10 g/l Difco Bacto Agar, cât – de regulă – este utilizat în rețeta originală (pentru solidificarea mediului de cultură), cu agentul gelificant tip „Poli””, ce trebuie dozat câte 1,2g/5 ml mediu de cultură per recipient, sau câte 240 g/l de mediu MS lichid (ori în oricare altă rețetă de mediu de bază); compoziția astfel obținută a fost omogenizată, după care a urmat sterilizarea acesteia și introducerea ei în recipientele de cultură. După răcirea recipientelor, post-autoclavare, în vasele de cultură a rezultat un gel uniform, care a asigurat un suport ferm, excelent pentru inocularea explantelor. Substratul de cultură astfel realizat a fost suficient de moale și de elastic, încât el a permis introducerea fitoinoculului în mediul de cultură, fără a traumatiza materialul vegetal, oferindu-i acestuia substratul necesar pentru susținerea lui la suprafața mediului de cultură. În vederea testării reacției fitoinoculilor la această nouă compoziție a mediului de cultură au fost utilizate mai multe tipuri de explante ce au provenit de la specii vegetale ierboase, precum și de la o specie lemnoasă, pentru a putea cunoaște capacitatea de reacție a diferitelor categorii de fitoinoculi la acest substrat și a aprecia potențialitatea extinderii acestei metode la cât mai multe tipuri de vitroculturi vegetale destinate cultivării lor în regim de *creștere lentă*. Inițial, am inoculat și am vitrocultivat minibutași de cartof (*Solanum tuberosum* var. *Gălănești* -14369, *Solanum tuberosum* var. *Gersa* – 14381) – provenit de la 2 soiuri deosebit de valoroase din punct de vedere ecosanogen, datorită conținutului lor ridicat în antociani, cât și o specie de plantă ornamentală, o orhidee (*Cymbidium* sp.), ori a unei specii protejate, existente în flora spontană a României, cum este roua cerului (*Drosera rotundifolia*), folosită și ca plantă medicinală, sau o specie rară, lemnoasă, monumentală, sequoia (*Sequoia sempervirens*).

După inocularea fitoinoculilor, recipientele de cultură au fost amplasate în camera de creștere, la temperatura de 23-25°C, iluminate fiind cu tuburi fluorescente (emitente de lumină albă), cu o intensitate luminoasă de 1700 lucși și fotoperioada de 16 h lumină/24h.

La fiecare 4 săptămâni de la inocularea fitoinoculilor evoluția culturilor a fost examinată din punctul de vedere al morfogenezei, dar și a creșterii organelor regenerate și evaluarea aspectului acestora. Totodată, au fost efectuate și măsurători biometrice, care au avut ca scop urmărirea creșterii fiecărui tip de organ al fitoinoculului. După o perioadă de 24 de săptămâni, vitroculturilor care s-au aflat în sistem de *creștere lentă*, li s-a testat *capacitatea de regenerare*, prin subcultivarea lor pe mediul MS clasic, agarizat, lipsit de *regulatori de creștere*, pentru a evidenția capacitatea lor regenerativă, fără a stimula creșterea acestora.

Vitroplantulele de cartof din lotul martor (MS clasic, agarizat), atât în cazul varietății 14369, cât și a celei indexate: 14381, au putut fi menținute în vitrocultură timp de 12 săptămâni, când culturile prezentau câte o tulpiniță cu înălțimea medie de cca. 11 cm, având câte 9 noduri și 5 ramificații și câte 15-22 rădăcinițe; la această vârstă plantulele ocupau întreg spațiul din recipientul de cultură, iar partea superioară a acestora se afla la nivelul foliei care acoperă recipientul de cultură, motiv pentru care vitroplantulele de la lotul martor am fost nevoite să le subcultivăm. La finalul celor 24 de săptămâni de la inoculare, vitroplantulele de cartof aparținând varietății 14369 cultivate pe substrat gelificat cu pasta de tip „*Polii*”, au prezentat o tulpiniță în medie de doar 1,2 cm (valoare medie de 9,17 ori inferioară lotului martor); tulpinița lor principală deținea doar 3 noduri (medie de 3 ori mai mică față de lotul martor) și numai 2 ramificații (valoare medie inferioară lotului martor de 2,5 ori) și doar 4 rădăcinițe (date medii de 3,75 ori mai mici decât lotul martor). Fitoinoculii de cartof, din varietatea 14381 inoculați pe suport de tip „*Polii*” au prezentat un ritm de creștere mult mai scăzut față de lotul martor, datele de creștere fiind asemănătoare cu cele menționate la varietatea precedentă. Chiar dacă vitroplantulele de cartof, la ambele varietăți, respectiv 14369 și 14381, față de lotul martor au prezentat o creștere mult încetinită, nici după o perioadă de timp dublă - 24 de săptămâni de creștere lentă, ele nu au atins valorile parametrilor de creștere semanlate la lotul martor, la 12 săptămâni; totuși și aceste culturi și-au păstrat culoarea intensă verde și au manifestat procese de caulogeneză, respectiv de rizogeneză, iar în subcultura realizată după 24 de săptămâni de creștere lentă, au generat vitroplantule viabile, fără efecte remanente de încetinire a creșterii.

Într-un al doilea exemplu de *creștere lentă*, organizat cu protocormii de *Cymbidium* ce au fost inoculați câte unul per recipient de cultură, au reacționat pozitiv la mediul preparat de către noi, identic cu cel descris și utilizat anterior la cartof. Menționăm faptul că, și acești fitoinoculi au manifestat o considerabilă încetinire a creșterii lor față de lotul martor, respectiv protocormi vitrocultivați pe mediu agarizat. În cazul orhideei, mediul de cultură solid este utilizat pentru inducerea procesului de diferențiere (Cachiță, 1987), care facilitează organogeneza, din protocormi formându-se plantule. Astfel, după 24 de săptămâni de vitrocultivare, la lotul martor s-a constatat prezența unui număr de 30 de protocormi/glomerul și un număr mediu de 6 plantule diferențiate/recipient de cultură (rădăcinițele lor fiind acoperite de velamen ceea ce demonstrează atingerea unui maxim al capacității de diferențiere a protocormilor; în schimb, la nivelul inoculilor din lotul cultivat pe substrat de tip „*Polii*”, după 24 de săptămâni de vitrocultivare s-a constatat regenerarea unui număr mediu de doar 11 protocormi/glomerul (o diferență inferioară celei descrise la lotul martor cu 475% respectiv de



2,72 ori mai puțin decât la martor). De asemenea, diametrul protocormilor la lotul martor a fost mult mai mare decât la lotul de protocormi cultivați pe suport de tip „Polii” el fiind cuprins între 0,34 – 0,52 cm în timp ce protocormii neoformați la proba de substrat „Polii” aceștia aveau doar 0,12 – 0,17 cm; la ambele variante experimentale culoarea protocormilor a fost verde intensă, dovadă a vitalității lor. Lotul de protocormi cultivați pe substrat gelificat cu pastă de tip „Polii”, nici după 24 de săptămâni de vitrocultură aceștia nu au manifestat declanșarea procesului de diferențiere, inoculii rămânând la nivelul de protocormi nediferențiați – dovadă clară a încetinerii dezvoltării lor. În schimb, odată cu subcultivarea inoculii de pe substrat gelificat cu pastă de tip „Polii”, pe mediu de cultură proaspăt, agarizat, au prezentat fenomenul de diferențiere, începând cu a 8-a săptămână de la subcultivare, exact ca și în cazul subculturii provenite din protocormi recoltați de la lotul martor.

Un al treilea exemplu de încetinire a creșterii fitoinoculilor a fost constatat de către noi în cazul utilizării culturilor de *propaguli*, formațiuni constând dintr-o minirozetă de frunzulițe de roua cerului (*Drosera rotundifolia* – plantă ierboasă, carnivoră, care se regăsește în flora spontană din țara noastră, în turbării, și este ocrotită). Propaguli de roua cerului se cultivă *in vitro* în scop medicinal, sau vitroculturile de *Drosera* servesc ca modele experimentale în studii de fitofiziologie (Turcuș, 2009), de vitrocultură. La lotul martor, după 24 de săptămâni de subcultivare a propagulilor de *Drosera*, la nivelul unui recipient de cultură s-au numărat în medie câte 36 de noi rozete de frunzulițe regenerate/un flacon. Rozetele au avut diametrul cuprins între 0,50 – 2,2 cm, în timp ce la lotul cultivat pe substrat de tip „Polii” s-a remarcat doar menținerea în viață a rozetei de frunzulițe, respectiv a propagulului inițial ce a fost inoculată per un recipient, ea având un diametru de 1,1 cm; menționăm faptul că, la ambele variante rozetele aveau culoarea verde intens – dovadă a vitalității lor. La nivelul lotului martor, după 24 de săptămâni de vitrocultură s-a constatat prezența la nivelul coloniei de propaguli, regenerați din propagulul inițial, a unui număr de 6 tije florale, în timp ce la inoculii cultivați pe substrat tip „Polii” nu s-au format tije florifere. În schimb, după 24 săptămâni de *creștere lentă*, odată ce inoculii de pe substrat gelificat cu pastă tip „Polii” au fost transferați pe mediu MS, agarizat, aceștia au manifestat o creștere similară aceea descrise la culturile lotului martor, fără efecte remanente de încetinire a creșterii.

Un al patrulea exemplu de sistem de *creștere lentă* descris anterior l-am demonstrat și în cazul minibutașilor de *Sequoia* (o specie lemnoasă), ce au fost inoculați și cultivați pe substrat normal (lot martor) sau pe mediu de tip „Polii” ce au manifestat o creștere mult mai lentă decât aceea marcată la lotul martor. Astfel, ambele variante au manifestat fenomene de caulogeneză – după 24 de săptămâni de vitrocultură talia plantulelor regenerate din

34

minibutașii cultivați pe mediu MS agarizat, lot martor, a atins valoarea medie de 11,6 cm, în timp ce talia vitroplantulelor regenerate din minibutașii cultivați pe substrat de tip „Polii” au atins talia medie de doar 1,8 cm (medie de 6,44 ori mai mică decât cea de la lotul martor). Și în ceea ce privește numărul mediu de lăstari generați/inocul, lotul martor a marcat 18 lăstari/recipient, în timp ce la lotul de minibutași inoculați pe substrat tip „Polii” s-au format doar câte 4 lăstari (medie de 4,5 ori mai mică comparativ cu valorile înregistrate la vitroplantulele cultivate pe mediu solidificat cu agar-agar); în schimb lăstarii generați au fost de culoare verde intensă, care după subcultivarea acestora pe mediu proaspăt, agarizat, au dat naștere la plantule cu o capacitate de creștere similară cu cea de la lotul martor.

Procedurile de încetinire a creșterii fitoinoculilor în micropropagare în sistem de *creștere lentă* – sunt deosebit de utile tuturor băncilor de gene vegetale, sau centrelor de cercetare care urmăresc păstrarea germoplasmei în vitrocultură, ori a stocului de soiuri în unitățile de producție axate pe micropropagare, ca și cap de clone, prin reducerea numărului de subculturi – diminuându-se astfel volumul de muncă și costurile aferente procedurilor de micromultiplicare, scăzând, totodată, și riscurile de infectare a vitroculturilor fără să se înregistreze efecte remanente, de inhibare a creșterii fitoinoculilor în subkultură.

### REVENDICĂRI

- Procedură de înlocuire a agar-agarului din mediul de cultură, se **caracterizează prin aceea că**, pentru prepararea mediului de cultură solid, destinat culturilor *in vitro* vegetale, cu scopul temporizării creșterii fitoinoculilor utilizează un suport de tip „Poli”.