

(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2018 00649

(22) Data de depozit: 05/09/2018

(41) Data publicării cererii:
30/03/2020 BOPI nr. 3/2020

(71) Solicitant:
• UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRICOLE
ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ DIN
CLUJ-NAPOCA, CALEA MĂNĂȘTUR
NR.3-5, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

(72) Inventatori:
• CLAPA DOINA, STR. TARNIȚA NR.5,
AP.6, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;

• FIRA ALEXANDRU, ALEEA BORȘA
NR. 5-7, BL. U 50, SC. III, AP. 25,
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• BORSAI ORSOLYA,
STR. CONSTRUCTORULUI NR.3, BL.5/A,
AP.3, TG. SECUIESC, CV, RO

(54) DISPOZITIV PENTRU ACLIMATIZARE EX VITRO

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un dispozitiv pentru aclimatizarea *ex vitro* a plantulelor înrădăcinate *in vitro* și/sau pentru înrădăcinarea și aclimatizarea concomitent *ex vitro* a lăstarilor obținuți în faza de multiplicare. Dispozitivul conform invenției este constituit dintr-un minibazin (1) realizat din material transparent, care are la bază o bandă (2) neagră pentru a împiedica astfel contaminarea cu alge a apei (3) din minibazin (1), minibazinul (1) fiind prevăzut cu un capac (4) detașabil, cu niște ferestre (5) de aerisire, cu un orificiu (6) de alimentare cu apă, prevăzut cu robinet, și cu un sistem (7) de evacuare a apei, prevăzut de asemenea cu robinet, în minibazin (1) existând o tavă-suport din polistiren, pentru vitropiante, realizată în două variante: o tavă (8) simplă din polistiren, cu niște benzi (9) dintr-un material cu proprietăți capilare, în care se află perlit (10), sau o tavă (11) din polistiren cu orificii cu diametru stabilit, prin care rădăcinile plantelor ajung în apă, și niște dispozitive de aclimatizare care pot fi suprapuse, caz în care, opțional, acestea pot fi racordate la rețeaua (12) de distribuție a apei și la rețeaua (13) de colectare a apei uzate.

Revendicări: 4

Figuri: 3

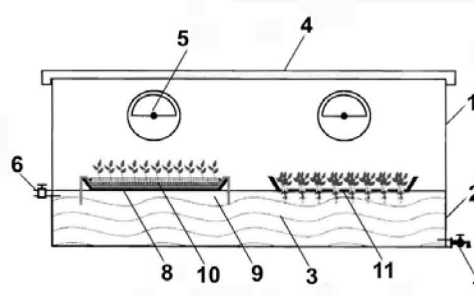


Fig. 1

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).



OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI
Cerere de brevet de invenție
Nr. a 2018 0649
Data depozit05-09-2018..

17

Dispozitiv pentru aclimatizare *ex vitro*

Descrierea invenției

1. Invenția se referă la un dispozitiv pentru aclimatizarea *ex vitro* a plantulelor înrădăcinate *in vitro* și/sau pentru înrădăcinarea și aclimatizarea concomitent *ex vitro* a lăstarilor obținuți în faza de multiplicare, destinat a fi utilizat pentru faza finală a micropropagării plantelor.
2. Este cunoscut faptul că micropropagarea permite producerea rapidă de material săditor de înaltă calitate, liber de boli și dăunători și uniform din punct de vedere genetic, indiferent de sezon și vreme. Cu toate acestea, o limitare majoră în aplicarea pe scară largă a acestei tehnologii o reprezintă pierrea plantelor în timpul transferului din laborator, din condițiile *in vitro*, în condițiile *ex vitro*. În timpul acestui transfer vitroplantele sunt expuse stresului abiotic (temperatura, intensitatea luminii sau umiditatea) dar și biotic (microflora din substrat), motiv pentru care au nevoie de aclimatizare pentru supraviețuire în noile condiții (Deb și Imchen, 2010).
3. Aclimatizarea *ex vitro* este faza finală a micropropagării plantelor, fază în care se face trecerea treptată a plantulelor de la condițiile de viață artificiale din cultura *in vitro* în condiții de asepsie strictă, temperatură controlată și umiditate foarte ridicată la condițiile obișnuite de viață din seră sau câmp, apropiate de condițiile naturale. Această fază intermediară este necesară deoarece plantulele cultivate *in vitro* nu pot supraviețui în cazul transferului direct în condiții naturale, deoarece nu prezintă caracteristicile fiziologice necesare pentru acest lucru. În timpul fazei de aclimatizare are loc dezvoltarea normală a plantulelor și dobândirea de caracteristici fiziologice care le asigură supraviețuirea în condiții de mediu normale, necontrolate artificial.
4. Plantulele înrădăcinate, rezultate în faza de înrădăcinare *in vitro* sau, în unele cazuri, lăstarii neîn rădăcinați din faza de multiplicare sunt scoase din vasele de cultură *in vitro*, se spală pentru a se îndepărta urmele de mediu nutritiv după care sunt plantate în substraturi speciale (sol, turbă, perlit, vermiculit etc. sau amestecuri dintre acestea) apoi udate și amplasate în locuri special amenajate (camere de vegetație, sere, solarii, tuneluri) în care sunt asigurate

condiții controlate de temperatură, ventilație, lumină și în special umiditate, aceasta din urmă fiind apropiată de 100 % și, pe măsura dezvoltării plantulelor pe parcursul fazei de aclimatizare, umiditatea atmosferică este redusă treptat.

5. Principala problemă a plantulelor cultivate *in vitro* este inexistența unor formațiuni adecvate care să le asigure supraviețuirea în condiții normale de umiditate. Astfel, nu există o cuticulă adecvată și stomate funcționale care să permită reglarea transpirației. De aceea, principalul factor de mediu care trebuie controlat în mod artificial în faza de aclimatizare este umiditatea aerului, pentru a se preveni deshidratarea plantulelor.
6. Pospóšilová și colab. (1999) arată că datorită condițiilor speciale din timpul culturii *in vitro* rezultă plante anormale morfologic, anatomic și fiziologic care după transferul *ex vitro*, pot fi afectate cu ușurință de schimbările bruște ale condițiilor de mediu astfel că au nevoie de o perioadă de aclimatizare pentru corectarea anomaliilor.
7. Ca urmare a celor enumerate mai sus, eficientizarea procesului de aclimatizare a plantulelor precum și înrădăcinarea și aclimatizarea concomitent *ex vitro* a lăstarilor obținuți în faza de multiplicare *in vitro* au drept scop creșterea procentului de plante aclimatizate, reducerea pierderilor în faza de aclimatizare și prin urmare un cost mai scăzut al plantelor obținute prin micropropagare.
8. În literatura de brevete se regăsesc date privind fazele culturilor *in vitro* precum și unele aspecte legate de aclimatizarea *ex vitro*, dar nu se găsesc brevete care să descrie un dispozitiv de aclimatizare.
9. Brevetul de invenție US 5168059A prezintă un procedeu de îmbunătățire a viabilității plantelor la transferul de la condițiile micropropagării *in vitro* la condiții *ex vitro* care constă în încorporarea în mediul de cultură *in vitro* a unui regulator de creștere în concentrație de la 0,001 până la 10 mg pe litru de mediu, regulatorul de creștere fiind un inhibitor al căii giberelinei.
10. Brevetul de invenție US 4554252A prezintă un procedeu de îmbunătățire a eficienței micropropagării plantelor care cuprinde tratarea plantelor în timpul micropropagării și/sau plantării ulterioare cu o soluție apoasă ce conține o amidă sau un amestec de amide



substituite sau o diamidă sau un amestec de diamide substituite pentru creșterea ratei de supraviețuire a plantelor în timpul aclimatizării.

11. De asemenea, în literatura de specialitate au fost realizate diferite studii privind aclimatizarea *ex vitro* în care s-au testat diferite substraturi de cultură pentru plantarea *ex vitro* sau diferite medii de cultură care să ducă la obținerea unor vitroplante cât mai apte pentru aclimatizare dar nu există date privind realizarea unui aparat de aclimatizare.
12. Najaf-Abadi și Hamidoghli (2009) au raportat o aclimatizare de 85% la mur în condițiile în care au aclimatizat plantule înrădăcinate în vitro pe medii suplimentate cu IBA (indole butyric acid). Plantulele înrădăcinate *in vitro* au fost aclimatizate în recipiente de plastic în amestec de turbă și perlit (1/1, v/v), sub sticlă, timp de trei săptămâni apoi transplantate la ghivece. În comparație, în dispozitivul de aclimatizare descris în prezentul brevet, lăstarii de mur obținuți în faza de multiplicare au fost aclimatizați în procent de 98% folosind ca substrat apa. Astfel, este eliminată faza de înrădăcinare *in vitro*, manopera cu transplantatul fir cu fir *ex vitro*, suprafața ocupată de plante în timpul aclimatizării, recipientele de plastic și amestecul de turbă și perlit.
13. Roy și colab. (2001) descriu un protocol pentru micropropagarea hameiului care include faza de înrădăcinare *in vitro* și aclimatizarea într-un amestec de sol ce asigură un procent de aclimatizare de 95%. În comparație, în dispozitivul de aclimatizare descris în prezentul brevet, plantulele de hamei înrădăcinate *in vitro* pot fi aclimatizate în procent de 100% în tava de polistiren cu perlit iar lăstarii neîn rădăcinați obținuți în etapa de multiplicare pot avea un procent de înrădăcinare și aclimatizare directă *ex vitro* în tava din polistiren cu perlit de 97,33%, caz în care este eliminată faza de înrădăcinare *in vitro*.
14. Lobna și colab. (2008) au dezvoltat un protocol pentru micropropagare la paulownia (*Paulownia kowakamii*) care propune înrădăcinarea *in vitro* și aclimatizarea plantelor înrădăcinate *in vitro* într-un amestec de mușchi de turbă și nisip (1:1) asigurând un procent de aclimatizare de 90%. Prin utilizarea dispozitivului de aclimatizare descris în prezentul brevet se poate opta pentru un protocol de aclimatizare care exclude înrădăcinarea *in vitro* astfel că lăstarii obținuți în faza de multiplicare pot fi înrădăcinați și aclimatizați concomitent *ex vitro* în procent de 90% utilizând tava din polistiren cu perlit. Dacă se

optează pentru protocolul descris de autori, plantele înrădăcinate *in vitro* pot fi aclimatizate cu ajutorul dispozitivului de aclimatizare chiar și în procent de 100%.

15. Aguilar și colab. (2000) au constatat că odată cu creșterea concentrațiilor endogene de ABA (abscisic acid) ale plantelor *in vitro* (cum ar fi prin ventilație sau adiția de ABA la mediu) se îmbunătățește controlul pierderii apei din frunze, supraviețuirea plantelor *ex vitro* și vigoarea plantelor la *Tagetes erecta*.
16. Da Silva și colab. (2017) arată că din aproximativ 100 de studii privind micropropagarea la *Dendrobium* revizuite, doar 40% prezintă și aspecte legate de aclimatizarea *ex vitro*. Aceste studii detaliază aspecte legate de substratul folosit pentru aclimatizare și condițiile de mediu în care s-a realizat aclimatizarea, în niciunul dintre studii nu a fost specificat un dispozitiv pentru aclimatizare. Majoritatea aclimatizărilor s-au realizat în spații cu umiditate ridicată și în substraturi complexe formate din diferite amestecuri, astfel:
 - în substrat format din bucăți mici de cărbune și cărămidă (1:1), 75% umbrire, procent de aclimatizare 95% (Vijayakumar et al. 2012);
 - în seră, în substrat format din bucăți mici de cărămidă sterilizate: cărbune: turbă de mușchi (1:1:0,5) 25–30 °C, 60%–70% umiditate relativă, procent de aclimatizare 80% (Hossain, 2013);
 - în seră, în substrat format din vermiculit: scoarță de copac: sol (1:2:2), procent de aclimatizare 100% (Luo et al. 2008);
 - sub folie de plastic, în substrat format din coaja de cocos: perlit (1:1), procent de aclimatizare 92% (Rangsayatorn, 2009);
17. Unele metode de aclimatizare *ex vitro* în perlit flotant sau în hidrocultură au fost descrise anterior de Clapa și colab., 2013, 2017; Borsai și colab., 2017; Fira și colab., 2010, 2012, 2014a, 2014b, 2015). Spre deosebire de aceste metode, dispozitivul de aclimatizare descris în prezentul brevet are o serie de avantaje: prin utilizarea tăvilor din polistiren cu fitil absorbant necesită o cantitate mai mică de perlit, ceea ce duce la reducerea cantității de deșeuri (perlitul uzat) care rămân după transplantarea la amestec de sol a plantelor înrădăcinate și aclimatizate iar utilizarea tăvilor din polistiren cu orificii asigură contactul tuturor vitroplantelor cu substratul lichid și o aerisire mai bună a lor, evitându-se apariția mucegaiurilor. De asemenea, spre deosebire de aceste metode, dispozitivele de aclimatizare

pot fi amplasate pe verticală în diferite spații și pot fi foarte ușor echipate cu instalații de iluminat dacă este cazul și asigură procente mai mari de aclimatizare.

18. **Problema tehnică** pe care o rezolvă invenția constă în aceea că dispozitivul pentru aclimatizare destinat a fi utilizat pentru faza finală a micropropagării plantelor permite aclimatizarea vitroplantelor fără a fi necesară asigurarea unei umidități ridicate a aerului atmosferic în incinta în care sunt cultivate plantulele aflate în curs de aclimatizare iar prin cele două variante de tăvi permite aclimatizarea lăstarilor înrădăcinați *in vitro* dar și aclimatizarea și înrădăcinarea concomitent a lăstarilor neîn rădăcinați obținuți în faza de multiplicare. Spre deosebire de procedeele de aclimatizare *ex vitro* clasice, uzuale, descrise anterior, procedeul nostru se bazează pe cultura vitroplantelor într-un strat de apă de 8-10 cm grosime, în tăvi de polistiren prevăzute cu orificii cu diametrul de 10-15 mm, părțile supraterane ale sus-numitelor vitroplante aflându-se în contact direct cu aerul atmosferic iar rădăcinile sau, după caz, baza lăstarilor, în contact cu apa. Noutatea tehnică a invenției constă în utilizarea apei ca și substrat lichid pentru aclimatizare fără a fi necesară asigurarea unei umidități ridicate a aerului atmosferic în incinta în care sunt cultivate vitroplantele aflate în curs de aclimatizare.

19. **În raport cu stadiul tehnicii, prin aplicarea invenției, se obțin următoarele avantaje:**

- Se elimină necesitatea unor spații protejate (sere, solarii, tuneluri, camere de vegetație) cu dotări speciale pentru menținerea umidității aerului, dispozitivul se poate amplasa în construcții obișnuite, de exemplu sere și solarii de uz general, în camere de vegetație cu dotări simple, similare cu cele pentru culturile *in vitro* sau chiar în spații restrânse, în laborator, pentru teste ad-hoc la scară mică.
- Nu necesită dotări tehnice sofisticate (de exemplu aparate pentru ceața artificială, higrostat) care se defectează ușor și nu necesită intervenția unui profesionist. Acest lucru mărește siguranța procesului tehnologic de aclimatizare, reducând riscul pierderilor datorate defecțiunilor tehnice.
- Datorită absenței unor instalații și dispozitive sofisticate, dispozitivul de aclimatizare prezentat este foarte ușor de utilizat și foarte sigur, nu prezintă riscul de a crea pierderi datorită erorilor privind reglarea parametrilor necesari pentru aclimatizare (umiditate atmosferică, irigații, drenaj, temperatură, ventilație), procesul fiind pasiv și static, nu dinamic.

- Se elimină necesitatea irigațiilor, deoarece, în varianta dispozitivului de aclimatizare cu tăvi din polistiren cu orificii substratul de aclimatizare este chiar apa iar în varianta a doua a dispozitivului accesul apei în substratul de aclimatizare (în cazul de față perlit) se face în mod pasiv, prin absorbție.

- Dispozitivul de aclimatizare permite aplicarea procesului tehnologic de aclimatizare într-o manieră flexibilă, la scară mică sau la scară mare. La scară mică se poate utiliza un singur dispozitiv de aclimatizare sau un număr mai mic, iar la scară mare se pot utiliza un număr mare de unități de aclimatizare asamblate ca și un sistem de module (Figura 3). Teoretic, sistemul de module poate fi oricât de mare, poate conține oricât de multe module, iar mărimea minimă a sistemului este de o singură unitate (un singur dispozitiv de aclimatizare). Din sistem se pot elimina module sau se pot adăuga module, după necesități. Sistemul se poate asambla și dezasambla rapid, poate fi relocat în altă clădire sau altă cameră sau seră, se poate reasambla în mai multe subsisteme, deoarece modulele sunt ușor de transportat și de manevrat.

- Dispozitivul de aclimatizare permite utilizarea spațiului disponibil într-o manieră flexibilă și în diverse moduri. Modulele pot fi amplasate pe orizontală și/sau pe verticală în camere, coridoare, pe etajere, pe podea sau în sere, solarii, chiar în aer liber dacă vremea permite; pot utiliza lumina naturală și/sau artificială, pot fi foarte ușor echipate cu instalații de iluminat. Astfel, prezintă avantaje față de metodele obișnuite, clasice de aclimatizare care utilizează spații (sere, solarii, tuneluri, camere de vegetație) cu umiditate atmosferică ridicată, lumină naturală, cu posibilitatea suplimentării cu lumină artificială (sere, solarii) sau doar lumină artificială (camere de vegetație).

- Datorită umidității atmosferice scăzute în aparatul de aclimatizare se reduce în mod considerabil riscul apariției de boli și dăunători.

- Datorită faptului că alimentarea cu apă a substratului (perlit) are loc în mod pasiv, prin capilaritate, prin fitilurile din material textil, nu există riscul inundării substratului, astfel eliminându-se riscul deteriorării rădăcinilor plantelor datorită umidității excesive în substrat.

- Se pretează pentru diverse intervenții simple și rapide, schimbând apa cu soluții conținând fertilizanți și/sau regulatori de creștere, de exemplu auxine, pentru a manipula creșterea și dezvoltarea plantelor și nutriția acestora.

20. **În continuare este prezentată pe larg invenția.** Dispozitivul de aclimatizare, conform invenției, este format dintr-un minibazin (1) din policarbonat sau alt tip de material plastic transparent, ce are la bază o bandă de culoare neagră (2) de lățime suficientă pentru a împiedica penetrarea luminii și contaminarea cu alge a apei sau a soluției din bazin (3),

prevăzut cu capac detașabil (4), ferestre pentru aerisire (5), orificiu sau mai multe orificii pentru alimentare cu apă (6) și robinet sau alt sistem pentru evacuarea apei sau a soluției conținute (7). În interiorul minibazinului, pe suprafața lichidului se află tava-suport din polistiren pentru vitroplante în 2 variante: tavă de polistiren simplă (8) cu benzi de fitil din bumbac sau alt material textil sau netextil cu proprietăți capilare (9), în care se află un strat de perlit cu grosimea 2-3 cm (10) sau tavă de polistiren cu orificii (11) cu diametrul stabilit în funcție de speciile aclimatizate sau în funcție de dimensiunile și particularitățile materialului vegetal transferat *ex vitro* pentru aclimatizare (1-2 cm). Dispozitivele de aclimatizare pot fi suprapuse, caz în care, opțional, pot fi racordate la o rețea de distribuire a apei (12) și una de colectare a apei uzate (13) (Figura 1, Figura 2).

21. Dispozitivul de aclimatizare poate fi utilizat în următoarele cazuri:

- Pentru aclimatizarea *ex vitro* a plantulelor înrădăcinate obținute în faza de înrădăcinare în vitro. În acest caz înrădăcinarea lăstarilor obținuți în faza de multiplicare se efectuează în vitro, în condiții sterile, pe mediile nutritive de înrădăcinare (rizogeneză) în vitro. Plantulele înrădăcinate se scot din vasele de cultură, se spală sub jet de apă pentru a înlătura resturile de mediu de cultură și se transplantează *ex vitro* în condiții nesterile în tava cu orificii (11) sau în tava cu perlit (8) prevăzută cu benzi de fitil, descrise în prezentul document. În tăvile de polistiren cu strat de perlit plantulele înrădăcinate se plantează individual iar în tăvile prevăzute cu orificii se amplasează mănunchiuri de plantule al căror număr se stabilește în funcție de vigoarea plantulelor astfel încât coletul plantelor să fie la nivelul tăvii, rădăcinile în contact cu apa iar partea aeriană în contact cu aerul. Introducerea unui număr prea mic de plantule într-un orificiu va favoriza scufundarea plantulelor în minibazin și necrozarea acestora. Tăvile cu plante se amplasează pe suprafața apei din minibazin (1) asigurându-se contactul dintre apa și benzile de fitil. În 3-4 săptămâni plantulele vor fi aclimatizate și înrădăcinate în dispozitivul de aclimatizare rezultând plante apte pentru transplantarea în amestec de sol.

- Pentru înrădăcinarea directă *ex vitro* și aclimatizarea, într-o singură fază, a lăstarilor obținuți în faza de multiplicare *in vitro*. În acest caz este eliminată din protocol faza de înrădăcinare *in vitro*. Explantele transferate *ex vitro* sunt lăstari axilari regenerați *in vitro* în faza de multiplicare. Plantulele din faza de multiplicare *in vitro* au aspectul morfologic de tufe în miniatură, cu câțiva sau câteva zeci de lăstari axilari. Plantulele respective sunt transferate *ex vitro*, se excizează lăstarii axilari, care ulterior sunt transplantați, unul câte unul, individual, în stratul de perlit (10) sau grupați în mici buchete de 10-20 de lăstari, în funcție de specie și de dimensiuni, iar buchetele respective se introduc în orificiile din tava

de polistiren cu orificii (11). În dispozitivul de aclimatizare are loc înrădăcinarea (rizogeneza) la nivelul lăstarilor axilari transferați *ex vitro*, rezultând plantule întregi, înrădăcinate, care ulterior se dezvoltă în dispozitiv și se aclimatizează în 3-4 săptămâni, devenind apte pentru transplantarea în amestec de sol.

- În incintele în care se amplasează dispozitivele de aclimatizare se recomandă ca umiditatea aerului să nu fie ridicată, iar temperatura să fie de 20-25 °C. Îngrijirea culturilor constă din realimentarea periodică cu apă proaspătă, înlăturarea apei uzate (brunificate) dacă este cazul și înlăturarea eventualelor plante necrozate pe parcursul perioadei de cultură. Ulterior perioadei de aclimatizare *ex vitro*, plantele înrădăcinate și aclimatizate sunt apte pentru a fi transplantate la ghivece sau plăci alveolare, în amestecuri de pământ specifice pentru culturile horticole clasice, în sere, solarii sau umbrare.

22. **Se dau în continuare câteva exemple** de utilizare a dispozitivului de aclimatizare pentru diferite specii. Dispozitivul de aclimatizare testat a avut următoarele dimensiuni:

- volum minibazin: 15 l
- dimensiuni minibazin: 35x25x15 cm
- volum de apă: 5 l
- banda neagra: 5 cm
- tavă din polistiren cu perlit: 22x14x3 cm, greutate 8 g prevăzută cu o bandă de fitil din bumbac cu lungimea de 35 cm și lățimea de 2 cm (greutate 6 g). Fitilul umed a fost amplasat de-a lungul tavii, sub stratul de perlit umed, cu capetele în contact cu apa din minibazin.
- tavă din polistiren cu orificii: 22x14x3 cm, greutate 6g, cu 32 de orificii cu diametrul de 1,5 cm.

23. **Aclimatizare *ex vitro* la mur (*Rubus fruticosus*)**. Murul poate fi aclimatizat cu ajutorul dispozitivului de aclimatizate, în toate variantele:

- lăstarii neîn rădăcinați obținuți în faza de multiplicare aclimatizați în tavă din polistiren cu perlit;
- lăstarii neîn rădăcinați obținuți în faza de multiplicare aclimatizați în tavă din polistiren cu orificii;
- lăstarii în rădăcinați *in vitro* aclimatizați în tavă din polistiren cu perlit;
- lăstarii în rădăcinați *in vitro* aclimatizați în tavă din polistiren cu orificii.

În toate cazurile procentele de aclimatizare au fost de peste 98%. Cea mai rapidă și eficientă variantă este aclimatizarea lăstarilor neîn rădăcinați obținuți în faza de multiplicare în tavă

din polistiren cu orificii. În acest caz se elimină din protocolul de micropropagare etapa de înrădăcinare *in vitro* iar necesarul de manopera este mult scăzut, fapt ce reduce costurile materialului săditor obținut. În dispozitivul de aclimatizare cu dimensiunile descrise anterior au putut fi aclimatizați 640 de lăstari neîn rădăcinați obținuți în faza de multiplicare aclimatizați în tava din polistiren cu orificii;

24. Aclimatizare *ex vitro* la hamei (*Humulus lupulus* L.). Dispozitivul de aclimatizare a permis aclimatizarea *ex vitro* a hameiului în următoarele variante:

- lăstarii neîn rădăcinați obținuți în faza de multiplicare aclimatizați în tavă din polistiren cu perlit;
- lăstarii în rădăcinați *in vitro* aclimatizați în tavă din polistiren cu perlit;
- lăstarii în rădăcinați *in vitro* aclimatizați în tavă din polistiren cu orificii;

Procentul de aclimatizare *ex vitro* în tava de polistiren cu perlit a plantulelor de hamei în rădăcinate *in vitro* a fost de 100% iar pentru cele în rădăcinate *in vitro* și aclimatizate în tava din polistiren cu orificii a fost de 90%. Pentru lăstarii neîn rădăcinați obținuți în etapa de multiplicare, rata de în rădăcinare și aclimatizare directă *ex vitro* în tava din polistiren cu perlit a fost de 97,33%. Lăstarii neîn rădăcinați obținuți în faza de multiplicare nu au putut fi aclimatizați în tavă din polistiren cu orificii.

25. Aclimatizare *ex vitro* la paulownia (*Paulownia elongata*). Dispozitivul de aclimatizare a permis aclimatizarea *ex vitro* la paulownia în următoarele variante:

- lăstarii neîn rădăcinați obținuți în faza de multiplicare aclimatizați în tavă din polistiren cu perlit;
- lăstarii în rădăcinați *in vitro* aclimatizați în tavă din polistiren cu perlit;
- lăstarii în rădăcinați *in vitro* aclimatizați în tavă din polistiren cu orificii.

Procentul de aclimatizare *ex vitro* în tava de polistiren cu perlit a plantulelor de paulownia în rădăcinate *in vitro* a fost de 100% iar pentru cele în rădăcinate *in vitro* și aclimatizate în tava din polistiren cu orificii a fost de asemenea de 100%. Pentru lăstarii neîn rădăcinați obținuți în etapa de multiplicare, rata de în rădăcinare și aclimatizare directă *ex vitro* în tava din polistiren cu perlit a fost de 90 %. Lăstarii neîn rădăcinați obținuți în faza de multiplicare nu au putut fi aclimatizați în tavă din polistiren cu orificii.

26. Aclimatizare *ex vitro* la rubarbă (*Rheum rhabarbarum* L.). Dispozitivul de aclimatizare a permis aclimatizarea *ex vitro* a lăstarilor de rubarbă în rădăcinați *in vitro* în tava din

polistiren cu perlit. Minirubarbele fără rădăcină obținute în faza de multiplicare nu au putut fi înrădăcinate și aclimatizate în dispozitiv, necrozându-se în proporție de 100%. Minirubarbele înrădăcinate *in vitro* s-au aclimatizat în proporție de 90% în tavă din polistiren cu perlit. Înainte de plantarea în perlit s-au înlăturat 1-2 frunze cu jumătate din lungimea petiolului (cele mai lungi) pentru o mai buna fixare în perlit și pentru a reduce suprafața foliară în timpul procesului de aclimatizare. Plantele de rubarbă aclimatizate în perlit flotant și transferate în plăci alveolare în substrat de turbă, în sera, au supraviețuit în proporție de 98%. Varianta de aclimatizare a lăstarilor înrădăcinați *in vitro* în tavă din polistiren cu orificii a fost testată și la alte specii cu procente de aclimatizare cuprinse între 90-100%: *Amelanchier canadensis*, *Drosera rotundifolia*, *Lycium barbarum*, *Nephrolepis* sp, *Ribes nigrum*, *Rosa hybrida*.

27. **Importanța practică** a invenției constă în reducerea necesarului de manoperă pentru transplantarea *ex vitro*, reducerea necesarului de spațiu pentru aclimatizarea *ex vitro*, eliminarea necesității utilizării unui spațiu cu dotări speciale pentru aclimatizarea *ex vitro* (tunel, seră de aclimatizare cu aparate de ceață artificială) și eliminarea amestecurilor speciale de substraturi. Dispozitivele pentru aclimatizare pot fi suprapuse astfel că se utilizează spațiul pe verticală, ele pot fi amplasate atât în incintele laboratoarelor cât și în sere sau solarii, sau chiar în aer liber dacă vremea permite. Dispozitivul de aclimatizare, prin intermediul celor două variante de tăvi, permite atât aclimatizarea vitroplantulelor înrădăcinate *in vitro* în faza de înrădăcinare dar și lăstarilor neîntrădăcinați obținuți în faza de multiplicare, eliminându-se astfel o etapă costisitoare din protocolul de micropropagare. Dispozitivul de aclimatizare are avantajul că poate fi utilizat cu succes în laboratoare pentru cercetare dar și pentru producția de material săditor obținut prin micropropagare.

28. **Literatura citată:**

1. US 5168059A
2. US 4554252A
3. Aguilar, M. L., Espadas, F. L., Coello, J., Maust, B. E., Trejo, C., Robert, M. L., Santamaria, J. M. 2000. The role of abscisic acid in controlling leaf water loss, survival

and growth of micropropagated *Tagetes erecta* plants when transferred directly to the field. *Journal of Experimental Botany*, 51(352), 1861-1866.

4. Borsai O., D. Clapa, A. Fira, M. Hârța, A. Dumitraș, R. Pop, D. Pamfil. 2017. The Effect of Gelling Agent on the Micropropagation of Common Lilac (*Syringa vulgaris* L.). *Agriculture - Science and Practice* 3-4(103-104):63-71.
5. Clapa D., A. Fira, O. Borsai, M. Hârța, C. Sisea, R. Pop, D. Pamfil. 2017. Micropropagation of *Rosa damascena* Mill.: the Effects of Gelling Agents on the Multiplication Stages and Acclimatization. *Agriculture - Science and Practice* 3-4(103-104):56-62.
6. Clapa D., A. Fira and N. Joshee. 2013. An Efficient *ex Vitro* Rooting and Acclimatization Method for Horticultural Plants Using Float Hydroculture, *Hortscience* 48(9):1159–1167.
7. da Silva, J. A. T., Hossain, M. M., Sharma, M., Dobránszki, J., Cardoso, J. C., & Songjun, Z. E. N. G. 2017. Acclimatization of *in Vitro*-derived *Dendrobium*. *Horticultural Plant Journal*, 3(3), 110-124.
8. Deb CR, Imchen T. 2010. An efficient *in vitro* hardening of tissue culture raised plants. *Biotechnology* 9:79–83.
9. Fira, A., Clapa, D., Plopa, C. 2010. *In vitro* rooting and ex-vitro acclimation in apple (*Malus domestica*). *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Horticulture*, 67(1):480.
10. Fira A., D. Clapa, L. A. Vescan. 2012. Direct *ex Vitro* Rooting and Acclimation in Blackberry Cultivar 'Loch Ness'. *Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnologies* 69 (1-2):247-254.
11. Fira A., D. Clapa, V. Cristea, C. Plopa. 2014a. *In Vitro* Propagation of *Lonicera kamtschatica*. *Agriculture - Science and Practice* 1- 2(89-90): 90-99.

12. Fira A., Clapa D., M. Simu. 2014b. Studies Regarding the Micropropagation of Some Blackberry Cultivars. *Bulletin UASVM Horticulture* 71(1): 29-37.
13. Fira A., M. Simu, B. Vlaicu, D. Clapa. 2015. Aspects Regarding the *In vitro* Propagation of 'Royal Gala' Apple Cultivar. *Bulletin UASVM Horticulture* 72(2):342-349.
14. Hossain, M.M., 2013. *In vitro* embryo morphogenesis and micropropagation of *Dendrobium aggregatum* Roxb. *Plant Tissue Cult Biotechnol*, 23: 241–249.
15. Lobna, S. T., Taha, M. M., Soad, I., Farahat, M. M. 2008. A Micropropagation Protocol of *Paulownia kowakamii* through *in vitro* culture technique. *Australian Journal of basic and applied sciences*, 2(3), 594-600.
16. Najaf-Abadi, A. J., and Hamidoghli, Y. 2009. Micropropagation of Thornless Trailing Blackberry ('*Rubus* sp.') by Axillary Bud Explants. *Australian Journal of Crop Science*, 3(4):191-194.
17. Pospóšilová, J., Tichá, I., Kadleček, P., Haisel, D., Plzáková, Š. 1999. Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. *Biologia Plantarum*, 42(4): 481-497.
18. Rangsayatorn, N., 2009. Micropropagation of *Dendrobium draconis* Rchb. f. from thin cross-section culture. *Sci Hortic*, 122: 662–665.
19. Roy, A. T., Leggett, G., & Koutoulis, A. 2001. Development of a shoot multiplication system for hop (*Humulus lupulus* L.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 37(1): 79-83.
20. Vijayakumar, S., Rajalkshmi, G., Kalimuthu, K., 2012. Propagation of *Dendrobium aggregatum* through the culture of immature seeds from green capsules. *Lankesteriana*, 12:131–135.



Revendicări

1. Dispozitiv pentru aclimatizarea *ex vitro* **caracterizat prin aceea că** este format dintr-un minibazin din policarbonat sau alt tip de material plastic transparent, având la bază o bandă de culoare neagra de lățime suficientă pentru a împiedica penetrarea luminii și contaminarea cu alge a apei din bazin, prevăzut cu capac detașabil, ferestre pentru aerisire, orificii pentru alimentare cu apa și robinet sau alt sistem pentru evacuarea apei iar în interiorul minibazinului, pe suprafața lichidului se află tava-suport din polistiren pentru vitroplante în 2 variante: tavă de polistiren simplă cu benzi de fitil din bumbac sau alt material cu proprietăți capilare, în care se află un strat de perlit cu grosimea de 2 cm sau tavă de polistiren cu orificii cu diametrul stabilit în funcție de speciile aclimatizate sau în funcție de dimensiunile și particularitățile materialului vegetal transferat *ex vitro* pentru aclimatizare.

2. Dispozitiv pentru aclimatizarea *ex vitro* a lăstarilor neînrădăcinați proveniți din faza de multiplicare sau a vitroplantelor înrădăcinate **caracterizat prin aceea că** substratul folosit pentru aclimatizare este apa, vitroplantele având părțile supraterane (frunzele și tulpinile) în contact cu aerul atmosferic, iar rădăcinile imersate în stratul de apă cu ajutorul unor tăvi-suport din polistiren prevăzute cu orificii și care sunt amplasate într-un minibazin din policarbonat sau alt tip de material plastic transparent, având la bază o bandă de culoare neagra de lățime suficientă pentru a împiedica penetrarea luminii și contaminarea cu alge a apei, prevăzut cu capac detașabil, ferestre pentru aerisire, orificii pentru alimentare cu apa și robinet sau alt sistem pentru evacuarea apei.

3. Dispozitiv pentru aclimatizarea *ex vitro* a lăstarilor neînrădăcinați proveniți din faza de multiplicare sau a vitroplantelor înrădăcinate **caracterizat prin aceea că** aclimatizarea se face în tăvi-suport de polistiren prevăzute cu fitil din bumbac sau alt material cu proprietăți capilare, în care se află un strat de perlit cu grosimea de 2 cm și care sunt amplasate pe suprafața apei într-un minibazin din policarbonat sau alt tip de material plastic transparent, având la bază o bandă de culoare neagra de lățime suficientă pentru a împiedica penetrarea luminii și contaminarea cu alge a apei, prevăzut cu capac detașabil, ferestre pentru aerisire, orificii pentru alimentare cu apa și robinet sau alt sistem pentru evacuarea apei.

4. Metodă de aclimatizare *ex vitro* **caracterizată prin aceea că** aclimatizarea *ex vitro* a lăstarilor neînrădăcinați proveniți din faza de multiplicare sau a vitroplantelor înrădăcinate se face într-un strat de apă de 8-10 cm grosime, în tăvi de polistiren prevăzute cu orificii cu diametrul de 10-15 mm, părțile supraterrane ale sus-numitelor vitroplante aflându-se în contact direct cu aerul atmosferic iar rădăcinile sau, după caz, baza lăstarilor, în contact cu apa, nefiind necesară asigurarea unei umidități ridicate a aerului atmosferic în incinta în care sunt cultivate vitroplantele aflate în curs de aclimatizare.

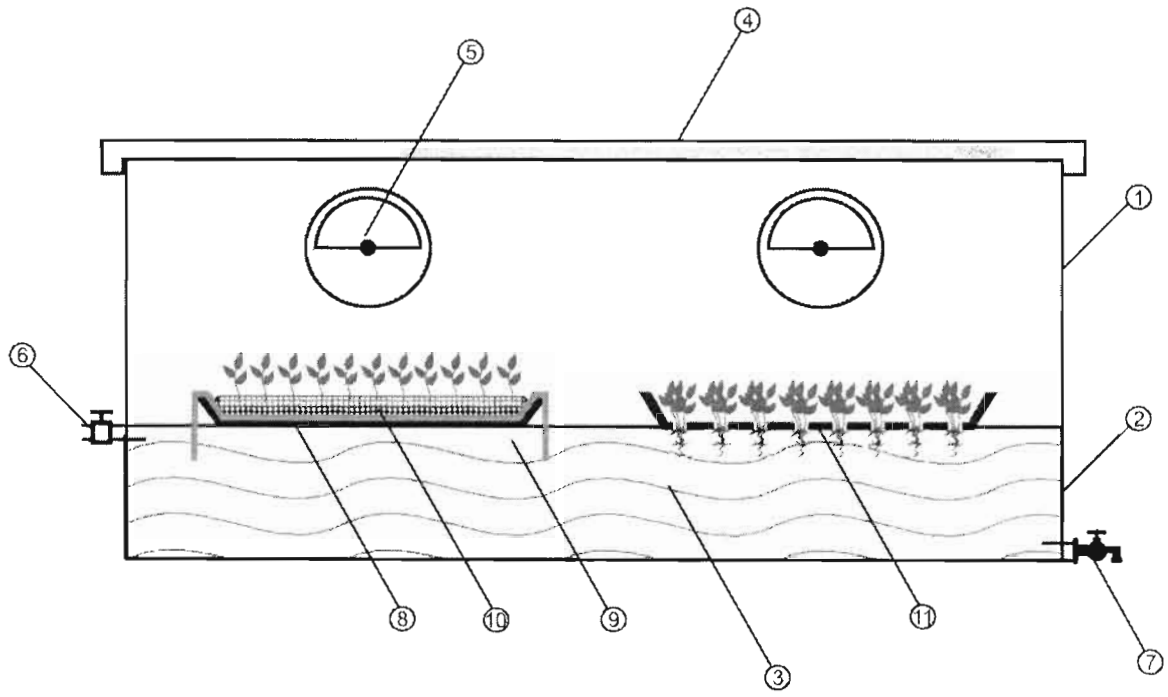


Figura 1.

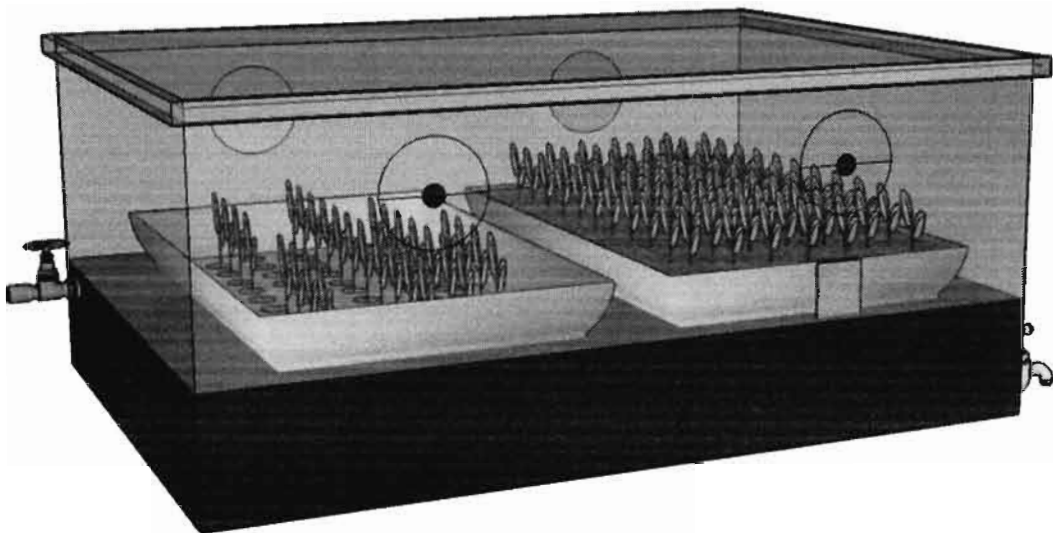


Figura 2.

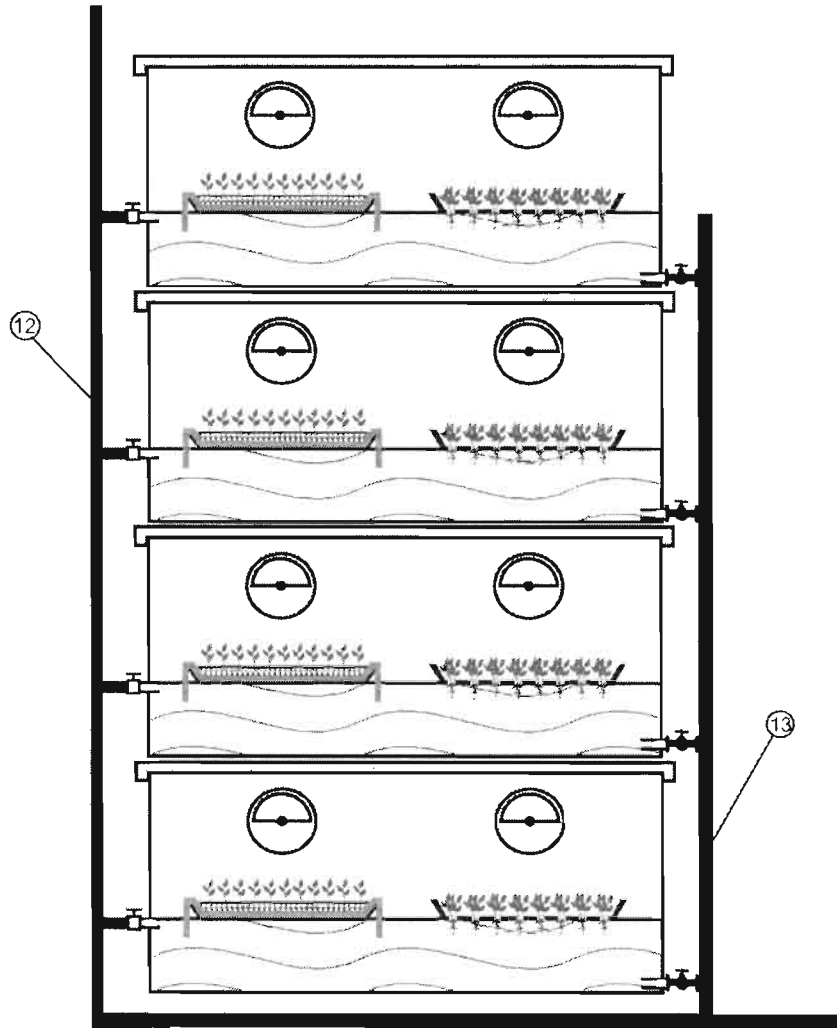


Figura 3.