UNIVERSITATEA PEDAGOGICĂ DE STAT
„ION CREANGĂ" DIN CHIȘINĂU

Facultatea Biologie și Chimie

Mariana LOZINSCHII, Lilia BRÎNZĂ,
Eduard COROPCEANU

Ghid
BIOTEHNOLOGII INOVATIVE ÎN CERCETARE ȘI EDUCAȚIE

Chișinău 2026

CZU 602.6:37.091(075.8)
L 82

Lucrarea a fost aprobată la Senatul Universității Pedagogice de Stat „Ion Creangă" din Chișinău, proces-verbal nr. 12 din 25 iunie 2026

Ghidul este destinat cadrelor didactice, studenților, elevilor din ciclul liceal, cercetătorilor, specialiștilor din domeniul biologiei și biotehnologiei, precum și tuturor celor interesați de perspectivele moderne privind studiul și conservarea lumii vegetale.

Cercetările incluse în ghid au fost realizate în cadrul programului de proiecte comune de colaborare între diaspora științifică și organizațiile din domeniile cercetării și inovării din Republica Moldova (ReBRAIN), titlul proiectului: „Inovații biotehnologice pentru conservarea speciilor vegetale rare în era schimbărilor climatice", cifrul: 25.80013.7007.06RE, finanțate de Agenția Națională pentru Cercetare și Dezvoltare.

Recenzenți:

Tatiana CALALB – doctor habilitat în științe biologice, profesor universitar, șef Catedră Farmacognozie și Botanică Farmaceutică, Facultatea de Farmacie, Coordonator al Laboratorului de Biotehnologii vegetale, Centrul de Dezvoltare al Medicamentului, INCMS, USMF „Nicolae Testemițanu";

Grigorii BATÎRU – doctor în științe biologice, conferențiar universitar, Facultatea Științe Agricole, Silvice și ale Mediului, Universitatea Tehnică a Moldovei;

Sofia GRIGORCEA – doctor în științe biologice, conferențiar universitar, șef Catedră Biologie Vegetală și Animală, Universitatea Pedagogică de Stat „Ion Creangă" din Chișinău.

Concepție grafică:
Ruslan CONDRAT

DESCRIEREA CIP A CAMEREI NAŢIONALE A CĂRŢII DIN REPUBLICA MOLDOVA

Lozinschii, Mariana.
Biotehnologii inovative în cercetare și educație: Ghid / Mariana Lozinschii, Lilia Brînză, Eduard Coropceanu; Universitatea Pedagogică de Stat "Ion Creangă" din Chișinău, Facultatea Biologie și Chimie. – Chișinău: [S. n.], 2026 (Blitz Poligraf). – 211 p. : fig., fot. color, tab.
Ref. bibliogr.: p. 186-195. – [20] ex.
ISBN 978-5-86654-890-3.
Text : nemediat.
602.6:37.091(075.8)
L 82

ISBN 978-5-86654-890-3

CUPRINS

Listă de abrevieri.....5

PREFAȚĂ.....6

1. CONCEPTE GENERALE ALE BIOTEHNOLOGIILOR VEGETALE: ISTORIE, PRINCIPII ȘI METODE DE CONSERVARE A RESURSELOR GENETICE.....8

1.1. Istoria și evoluția biotehnologiilor.....8

1.2. Tipuri de biotehnologii.....13

1.3. Conservarea resurselor genetice vegetale.....19

1.4. Crioconservarea plantelor.....21

1.5. Rolul culturilor *in vitro* în conservarea și multiplicarea plantelor.....24

2. ASPECTE ALE TEHNOLOGIEI CULTIVĂRII PLANTELOR *IN VITRO*.....26

2.1. Noțiuni generale privind cultura *in vitro*.....26

2.2. Etapele micropropagării.....29

2.3. Organizarea unui laborator de cultură in vitro a plantelor.....36

2.4. Mediile de cultură.....56

2.5. Aplicații practice ale culturilor *in vitro*.....87

3. *Mentha spp.*: INIȚIEREA ȘI MULTIPLICAREA *IN VITRO*.....92

3.1. Descrierea botanică a speciei *Mentha citrata* Ehrh.....92

3.2. Importanța biologică, economică și medicinală.....93

3.3. Protocol de micropropagare a speciei *Mentha citrata* Ehrh.....95

3.4. Biotehnologii de multiplicare in vitro a speciei *Mentha x piperita* L.....113

4. *Galanthus plicatus* M. Bieb.: INIȚIEREA ȘI MULTIPLICAREA *IN VITRO*.....129

4.1. Descrierea botanică, răspândirea geografică și statutul de conservare a speciei *Galanthus plicatus* M. Bieb.....129

4.2. Importanță ecologică și medicinală a speciei.....131
4.3. Protocol de micropropagare.....132
4.4. Semnificația rezultatelor pentru conservarea speciei 147

5. VALOAREA EDUCAȚIONALĂ ȘI APLICATIVĂ A GHIDULUI.....150
5.1. Utilizarea ghidului în activități didactice.....150
5.2. Predarea biotehnologiilor în învățământul preuniversitar și universitar.....152
5.3. Formarea competențelor experimentale.....153
5.4. Propuneri de lucrări de laborator și practice cu conținut biotehnologic.....155
5.5. Integrarea ghidului „Biotehnologii inovative în cercetare și educație" în realizarea Curriculumului la disciplina Biologie (treapta liceală).....159
5.6. Corelarea ghidului „Biotehnologii inovative în cercetare și educație" cu competențele specifice disciplinei Biologie (clasele X–XII).....163

6. PRODUSE ARTIZANALE REALIZATE DE ELEVI ȘI STUDENȚI PE BAZĂ DE *Mentha citrata* Ehrh.....170
6.1. Înghețata de mentă bergamotă cu ciocolată.....171
6.2. Săpun natural cu mentă.....173
6.3. Lumânări aromatice cu mentă.....175
6.4. Ciocolată cu mentă.....177
6.5. Băuturi răcoritoare pe bază de mentă.....179
6.6. Zahăr aromatizat cu mentă.....181
6.7. Bomboane de jeleu cu aromă de mentă bergamotă.....182
6.8. Compoziții florale decorative cu mentă.....184

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE.....186

GLOSAR DE TERMENI.....196

ANEXE.....201

LISTĂ DE ABREVIERI

AIA – acid indol-3-acetic
AIB – acid indol-3-butiric
ANA – acid 1-naftalenacetic
BA – 6-benziladenină
BAP – 6-benzilaminopurină
mT – meta-topolină
2iP – 6-(γ,γ-dimetilalilamino) purină
IPA – acid indol-3-propionic
GA_3 – acid giberelic
TDZ – tidiazuron
MS – mediu nutritiv Murashige-Skoog
½ MS – mediu Murashige-Skoog cu cantitatea de săruri minerale înjumătățită
WPM – mediu nutritiv Woody Plant Medium
DKW – mediu nutritiv Driver și Kuniyuki Walnut
pH – potențial de hidrogen; indică aciditatea sau alcalinitatea mediului nutritiv
NaOCl – hipoclorit de sodiu
$KMnO_4$ – permanganat de potasiu
$HgCl_2$ – clorură de mercur
H_2O_2 – peroxid de hidrogen
PVP – polivinilpirolidonă

PREFAȚĂ

Biotehnologiile se numără printre cele mai promițătoare domenii ale științei moderne, combinând cercetarea fundamentală cu soluțiile practice în domeniul biologiei, agriculturii, medicinei și protecției mediului. Un loc special printre acestea îl ocupă biotehnologiile vegetale, care deschid posibilități largi pentru conservarea resurselor genetice, înmulțirea speciilor valoroase de plante și dezvoltarea competențelor de cercetare ale educabililor. În contextul dezvoltării rapide a științei și tehnologiei, metodele de cultivare *in vitro* a țesuturilor și organelor vegetale capătă o importanță deosebită, permițând rezolvarea unui spectru larg de probleme fundamentale și aplicate: de la conservarea diversității genetice a plantelor până la obținerea materialului de plantare de înaltă calitate și dezvoltarea de produse biotehnologice inovatoare.

Ghidul „*Biotehnologii inovative în cercetare și educație*" a fost elaborat cu scopul de a reuni cunoștințele teoretice moderne și experiența practică în domeniul biotehnologiilor vegetale, precum și de a contribui la introducerea metodelor inovatoare de predare în procesul educațional. O atenție specială este acordată cultivării plantelor *in vitro* ca unul dintre cele mai promițătoare instrumente de conservare a biodiversității, de înmulțire a speciilor valoroase de plante și de formare a competențelor de cercetare ale studenților.

Publicația prezintă etapele principale ale formării și dezvoltării biotehnologiilor, descrie direcțiile și tipurile actuale de cercetări biotehnologice și evidențiază rolul metodelor *in vitro* în conservarea resurselor genetice vegetale și în crioconservare. Anumite secțiuni sunt dedicate organizării laboratorului de culturi de țesuturi vegetale, pregătirii mediilor de cultură, precum și aspectelor practice ale micropropagării plantelor.

O valoare deosebită a ghidului o conferă rezultatele cercetărilor prezentate privind introducerea în cultură și micropropagarea speciilor *Mentha citrata* Ehrh., *Mentha x piperita* L. și *Galanthus plicatus* M. Bieb. Protocoalele descrise și observațiile experimentale demonstrează posibilitățile de aplicare a metodelor biotehnologice pentru conservarea, studierea și înmulțirea eficientă a plantelor cu importanță științifică, economică și de protecție a mediului.

O caracteristică importantă a acestei publicații este orientarea sa educațională. Ghidul conține recomandări privind utilizarea metodelor biotehnologice în activitatea didactică, organizarea de cursuri de laborator și practice, elaborarea de proiecte educaționale și formarea abilităților de cercetare la elevi și studenți.

Conținutul ghidului poate fi util cadrelor didactice, studenților (la diverse cursuri de la licență și master), elevilor din ciclul liceal, cercetătorilor, specialiștilor din domeniul biologiei și biotehnologiei, precum și tuturor celor interesați de viziunile moderne privind studiul și conservarea lumii vegetale.

Autorii își exprimă speranța că această publicație va contribui la popularizarea biotehnologiilor, la dezvoltarea activității de cercetare și la implementarea unor practici educaționale inovatoare, orientate către utilizarea durabilă și conservarea resurselor biologice.

1. CONCEPTE GENERALE ALE BIOTEHNOLOGIILOR VEGETALE: ISTORIE, PRINCIPII ȘI METODE DE CONSERVARE A RESURSELOR GENETICE

1.1. Istoria și evoluția biotehnologiilor

Biotehnologia are un caracter interdisciplinar, reunind realizările din domeniul biologiei, chimiei, geneticii, microbiologiei și științelor inginerești. Biotehnologia este știința care folosește organisme vii (bacterii, plante, animale) sau părți ale acestora pentru a obține produse utile omului, cum ar fi alimentele, medicamentele sau diferite substanțe de importanță industrială [Cosmulescu S.N., 2024].

Din cele mai vechi timpuri, omul a folosit metode de sinteză microbiologică în prelucrarea zilnică a produselor agricole, fără să știe de existența lor. Primele forme de biotehnologie au apărut încă din Antichitate, când oamenii au început să folosească fermentația pentru a produce pâine, vin, bere, iaurt etc. Chiar dacă nu știau ce sunt microorganismele și fenomenele în care sunt implicate, ei observau că anumite procese naturale pot transforma alimentele, pot modifica perioada de păstrare, aspectul produselor, caracteristicile gustative etc. Fermentarea – un proces de schimb metabolic în care substratul organic suferă modificări sub acțiunea enzimelor microbiene. Inițiatorii proceselor de fermentare sunt ciupercile, bacteriile și drojdiile. Aceste organisme sunt ușor de cultivat, se înmulțesc rapid în condiții relativ simple și sintetizează enzime care provoacă descompunerea substanțelor organice.

Astfel, în timpul săpăturilor arheologice de la Babilon au fost

descoperite plăci de lemn, vechi de 6000 de ani, cu descrierea procesului de fabricare a berii (conform unor surse chinezii au descoperit procesul de fermentație a berii cu 7000 de ani î.Hr.). Deja cu 6000 de ani î.Hr. erau cunoscute metode de obținere a iaurtului și brânzei cu ajutorul unor bacterii. Cu 4000 de ani î.Hr. egiptenii deja coceau pâine dospită cu drojdii.

Din mileniile III-IV î.Hr., omul utiliza procesele de fermentație pectică, care stau la baza fibrelor plantelor textile, inului, cânepei etc. Popoarele din bazinul mediteranian (grecii, romanii) conservau fructe în miere și murau legume în vase ceramice. Din cele mai vechi timpuri, omenirea s-a confruntat și cu efectele negative ale activității microorganismelor (alterarea produselor, boli infecțioase ale oamenilor și animalelor). Consecința acestui fapt a fost, în primele etape, încercările inconștiente, de a dezvolta metode și mijloace de combatere a acestor fenomene. Astfel au apărut metodele de conservare a produselor. Există informații despre stații de epurare ale apei care funcționau încă în Roma antică.

În a doua jumătate a secolului al XV-lea începe dezvoltarea științelor naturii. Formarea și dezvoltarea biologiei au fost influențate în mod semnificativ de succesele chimiei, care în această perioadă a trecut de la descriptivă la analitică. Au avut loc schimbări în studiul esenței proceselor de fermentare; a apărut termenul **„fermentație”**, iar procesul de fermentare a început să fie asociat cu prezența drojdiei sau a enzimelor în mediu.

În 1665, R. Hooke a introdus noțiunea de „celulă”. Tot atunci, pentru prima dată în istoria științei moderne, au fost descoperite bacteriile. În secolele XVI-XVII, mai întâi în Franța, apoi peste tot, pentru a afâna aluatul, a început utilizarea drojdiei de bere; mai târziu, odată cu schimbarea și perfecționarea tehnologiei de fabricare a berii, pentru aceste scopuri a început utilizarea drojdiei din producția de alcool.

În secolele XVII-XIX au avut loc descoperiri importante. Au apărut metode de cercetare și aparate cu o precizie mai înaltă. Oame-

nii de știință au descoperit existența celulelor și a microorganismelor. Louis Pasteur a demonstrat că fermentația este produsă de bacterii și drojdii, iar Gregor Mendel a pus bazele geneticii prin studiile eredității. Aceste descoperiri au ajutat la înțelegerea modului în care funcționează procesele vitale.

În a doua jumătate a secolului al XVIII-lea, a fost demonstrată capacitatea unei substanțe de a descompune o altă substanță. Acest lucru a marcat începutul studiului experimental al capacității unice a enzimelor de a cataliza reacții chimice specifice. Astfel, dezvoltarea microbiologiei și studiul transformărilor chimice au devenit o premisă importantă pentru apariția microbiologiei și biochimiei.

Medicul englez Edward Jenner descoperă în 1796 primul vaccin, care a început a fi utilizat pentru imunizarea copiilor și adulților împotriva variolei. S-a observat, că persoanele care suportau variola vacilor deveneau imune și la variola umană. Pentru imunizare se utiliza o tulpină slăbită a bolii, care se transmitea de la bovine la oameni.

În 1838 chimistul olandez Gerardus Johannes Mulder a descoperit proteinele. Dar termenul **„proteină”** (din latinul „*proteios*”, însemnând primar) a fost propus în același an de chimistul suedez Jöns Jacob Berzelius. Ulterior, Mulder a obținut unele produse ale degradării proteice, precum aminoacidul leucină.

În perioada anilor 1839-1855 se dezvoltă teoria celulară. În prezent este bine cunoscut că toate organismele vii sunt formate din celule. Totuși, acest fenomen a fost fundamentat teoretic abia în secolul XIX, sub forma teoriei celulare. Matthias Schleiden și Theodor Schwann au formulat teoria celulară în 1839, pe baza a 3 postulate: celula este unitatea de bază, structurală și funcțională a tuturor organismelor vii; toate organismele vii sunt alcătuite din una sau mai multe celule; o celulă provine din altă celulă prin procesul de diviziune.

În secolul al XIX-lea, odată cu dezvoltarea științelor chimice, au fost puse bazele chimiei organice. În această perioadă au fost des-

coperiți acizii organici, glicerina, colesterolul, glucoza, primii aminoacizi și a fost realizată sinteza ureei, care a demonstrat legătura dintre compușii minerali și cei organici. Pentru apariția enzimologiei, a avut o mare importanță studiul procesului de hidroliză a polizaharidelor. Lucrările lui Pasteur au scos în evidență rolul microorganismelor în fermentație și au pus bazele științifice ale vinificației, fabricării berii, producției de alcool și oțet, precum și ale combaterii bolilor infecțioase.

Savantul Gregor Mendel din Brno și-a început în 1856 experimentele cu privire la transmiterea trăsăturilor ereditare de la o generație la alta, hibridând două soiuri diferite de mazăre. Timp de opt ani (până în 1963) el a desfășurat experiențele sale, în baza cărora a demonstrat că genele pot fi dominante sau recesive și a stabilit probabilitatea ca acestea să se manifeste de la o generație la alta. Rezultatele cercetăarilor u fost publicate în 1865, sub titlul „Experimente privind hibridizarea plantelor".

La începutul secolului XX au fost introduși termenii **„mutații"**, **„gen"**, a apărut ipoteza lui Sutton-Boveri, conform căreia cromozomii sunt purtătorii materiali ai trăsăturilor ereditare. În această perioadă, cunoștințele științifice au permis dezvoltarea biotehnologiilor pentru multe procese de producție.

În 1922, savantul canadian Frederick Banting și studentul Charles Best au experimentat tratarea diabetului zaharat cu insulină de origine animală (extract pancreatic de la câini, obținut în 1921, purificat cu ajutorul biochimistului James Collip). Acest fapt prezintă un salt important în dezvoltarea medicinei. Cu toate că metodele utilizate pentru extragerea insulinei la început erau rudimentare, ei au reușit să eficientizeze procesul de extragere a cantităților mari de insulină la necesitate. Inventarea precipitării izoelectrice de către chimistul american George B. Walden a permis purificarea eficientă a extractului de insulină, fapt care a condus la producerea de cantități mari de insulină rafinată.

Un moment foarte important s-a produs în anul 1953, când

Watson și Crick au descoperit structura ADN-ului. Această descoperire a permis dezvoltarea biotehnologiei moderne. În anii 1970 a apărut tehnologia ADN-ului recombinat, care permite modificarea genelor. Astfel, oamenii de știință au reușit să producă insulină utilizând bacterii modificate genetic – un mare progres pentru tratamentul diabetului.

În anii 1990-2000 a fost realizat Proiectul Genomului Uman, care a determinat structura completă a ADN-ului uman. Acest lucru a deschis drumul spre medicina modernă și personalizată.

În 1997 are loc clonarea primului mamifer – oaia Dolly (nucleul unei celule adulte a fost transferat într-o celulă fecundată). Cu scopul de a proteja genomul uman de manipulare, UNESCO a adoptat Declarația Universală privind Genomul Omului și Drepturile Omului.

O descoperire recentă este tehnologia CRISPR-Cas9, care permite modificarea precisă a genelor. Aceasta oferă mari speranțe pentru tratarea unor boli genetice, dar ridică și probleme etice, deoarece implică intervenția directă asupra ADN-ului.

Termenul „**biotehnologie”** a fost inventat de Karl Ereky, un inginer maghiar, în 1919. Termenul „biotehnologie vegetală” se referă la aplicarea tehnicilor de inginerie pentru modificarea plantelor în beneficiul oamenilor. Termenul „**biotehnologie**” provine din cuvintele grecești βίος (bios) – „viață”, τέχνη (techne) – „meșteșug, artă, tehnologie” și λόγος (logos) – „învățătură, știință”. În sens literal, biotehnologia înseamnă utilizarea organismelor vii, a sistemelor acestora sau a proceselor biologice pentru obținerea de produse utile și rezolvarea unor probleme practice.

În prezent, biotehnologia este folosită în diverse domenii:

- ✓ *în medicină*: pentru vaccinuri, terapie genetică și medicamente moderne;
- ✓ *în agricultură*: pentru plante mai rezistente la boli și dăunători;
- ✓ *în industrie*: pentru producerea de enzime, biocombustibili și materiale biodegradabile.

În concluzie, biotehnologia a evoluat de la practici tradiționale simple, cum ar fi fermentația – la tehnologii moderne foarte avansate. Biotehnologiei îi revine un rol important în viața omului și are un impact major asupra medicinii, agriculturii și industriei.

1.2. Tipuri de biotehnologii

Biotehnologia se referă, în sens larg, la dezvoltarea de tehnici pentru aplicarea principiilor biologice în vederea obținerii de produse cu ajutorul agenților biologici. Această știință nouă are scopul de a utiliza în procesele tehnologice microorganismele sau produsele derivate din acestea, culturi de celule vegetale și animale pentru producerea substanțelor utile pentru agricultură, industria alimentară, farmaceutică etc. [Nair A.J., 2008; Tymoszuk A., Kulus, D., 2024].

Biotehnologiile agricole cuprind *biotehnologii vegetale* și *biotehnologii în zootehnie*. Biotehnologiile vegetale includ totalitatea tehnicilor prin care sunt folosite organismele vegetale sau componentele acestora pentru:

- producerea de substanțe cu valoare terapeutică;
- multiplicarea rapidă a plantelor;
- modificarea genetică a materialului vegetal.

Spre deosebire de biotehnologiile microbiene sau animale, biotehnologiile vegetale prezintă un risc biologic mai scăzut și sunt mai bine acceptate din punct de vedere etic. Aceste tehnologii permit obținerea unor produse standardizate, cu o calitate constantă, necesară în domeniul farmaceutic. Cultura de țesuturi vegetale este o tehnică, care constă în creșterea celulelor, țesuturilor sau organelor vegetale pe medii nutritive artificiale, în condiții sterile [Gao J., 2012]. O caracteristică esențială a celulelor vegetale este totipotența, adică capacitatea unei singure celule de a genera o plantă întreagă [Calalb T., Lozinschii M., 2026].

Aceasta este utilizată pentru:

- obținerea rapidă a unui număr mare de plante identice;
- eliminarea agenților patogeni;

• producerea de substanțe biologic active.

Datele statistice arată că rata de multiplicare prin cultura *in vitro* poate fi până la 1000 de ori mai mare decât în condiții naturale.

Biotehnologiile vegetale au ca scop utilizarea culturilor celulare vegetale și a metodelor de inginerie genetică pentru crearea și îmbunătățirea culturilor agricole și forestiere. Scopul principal al acestor tehnici este obținerea de soiuri cu o rezistență sporită la factori biotici, cum ar fi microorganismele patogene, precum și la stresul abiotic, inclusiv temperaturi scăzute și ridicate, secetă și salinitate crescută a solurilor. În plus, aceste tehnologii sunt utilizate pentru formarea și optimizarea interacțiunilor simbiotice la diferite specii de plante, precum și pentru reproducerea eficientă a culturilor horticole și agricole cu caracteristici economice valoroase prestabilite.

O direcție separată de cercetare este legată de selecția și crearea de specii forestiere cu viteză mare de creștere, caracteristici calitative ale lemnului și capacitate regenerativă sporită. Astfel de specii sunt considerate promițătoare pentru refacerea pădurilor în ecosisteme aride, montane și degradate, unde metodele tradiționale de silvicultură sunt limitate.

Biotehnologiile vegetale prezintă un domeniu modern al biologiei care se ocupă cu utilizarea plantelor, celulelor și țesuturilor vegetale în scopul obținerii unor produse utile pentru om și economic avantajoase. Acest domeniu are aplicații importante în agricultură, industria alimentară, protecția mediului și, în mod special, în medicină. Dezvoltarea rapidă a biotehnologiei vegetale a fost posibilă odată cu progresele înregistrate în biologia celulară, genetică moleculară și biochimie [Pierik, R. L. M., 1997].

Pentru domeniul medical, biotehnologiile sunt deosebit de importante pentru că au permis obținerea de substanțe biologic active, medicamente și compuși terapeutici într-un mod controlat, sigur și eficient. Plantele sunt considerate adevărate „fabrici biologice”, capabile să sintetizeze molecule complexe necesare organismului uman.

Biotehnologiile aplicate în zootehnie se referă în special la nutriția animală, creșterea rezistenței animalelor la atacul factorilor patogeni, obținerea de animale cu randament înalt în producția de carne, lapte, ouă, lână etc., de reproducție și de predeterminare a sexului la animale, conservarea resurselor genetice animale.

Biotehnologiile alimentare sunt procedee industriale de prelucrare a legumelor și fructelor, a laptelui și a produselor lactate, a cărnii, axate pe obținerea produselor noi, conservarea lor și îmbunătățirea calității, fiind bazate pe o serie de procese:

- ✓ fermentație – diversificarea gamei de produse obținute prin fermentare (alimente, antibiotice și enzime cu variate aplicații), perfecționarea vechilor procese de fermentație cunoscute și aplicate în industria alimentară;
- ✓ sinteza de proteine microbiene pentru alimentația animalelor și a omului – sursa de energie pentru producerea acestora poate fi mediu special creat, deșeuri organice vegetale sau animale, menajere sau chiar petroliere;
- ✓ acvacultură – cultivarea pe scară largă a algelor unicelulare în scop alimentar și pentru extracția de substanțe chimice.

Pentru domeniul medical, biotehnologiile sunt deosebit de importante pentru că permit obținerea de substanțe biologic active, medicamente și compuși terapeutici într-un mod controlat, sigur și eficient. De exemplu, taxolul este un compus antitumoral utilizat în tratamentul cancerului ovarian și mamar. Inițial, era extras din scoarța tisei (*Taxus brevifolia*), dar metoda era costisitoare și dăunătoare plantelor. În prezent, taxolul se produce prin cultură de celule vegetale, ceea ce permite obținerea unei cantități suficiente fără a distruge tisele.

Specia *Nicotiana benthamiana* este folosită pentru obținerea vaccinurilor și a anticorpilor monoclonali. Aceasta poate produce proteine terapeutice umane într-un timp scurt și cu costuri reduse. În timpul pandemiei de COVID-19, cercetătorii au folosit această plantă pentru prototipuri de vaccinuri experimentale.

Biotehnologiile vegetale contribuie semnificativ la dezvoltarea medicinii moderne. Conform Organizației Mondiale a Sănătății, aproximativ 25% dintre medicamentele utilizate în prezent sunt de origine vegetală sau sunt derivate din compuși vegetali. Printre substanțele obținute se numără compuși antitumorali și antivirali, antibiotice naturale, antioxidanți etc.

Utilizarea biotehnologiilor vegetale ca sursă de substanțe terapeutice oferă soluții neofensive, mai eficiente, inovatoare, cu un tratament mai sigur, compatibile cu sistemele fiziologice etc. Dezvoltarea domeniului contribuie la progresul științific și la calitatea vieții umane, având un rol important în medicina viitorului.

Biotehnologiile medicale veterinare au scopul de a crea sisteme pentru diagnosticul rapid al maladiilor sau dereglărilor funcționale ale animalelor, elaborarea unor produse biologice de combatere a bolilor (anticorpi monoclonali, vaccinuri, sisteme de biocontrol), transferul de embrioni, fertilizarea *in vitro*, clonarea, protecția animalelor prin vaccinare și aplicarea tratamentelor biologice etc. Producerea și sinteza de vaccinuri sunt importante pentru eradicarea unor boli care afectează foarte grav populația umană (poliomielită, rujeolă, gripă, malarie etc.). O mare parte a medicamentelor produse și comercializate sunt obținute într-o formă sau alta prin diverse biotehnologii.

Metodele biologice de protecție a plantelor se bazează pe utilizarea mecanismelor naturale de reglare a populației dăunătorilor. Printre acestea se numără utilizarea dușmanilor naturali ai organismelor dăunătoare, precum prădători, paraziți, fitofagi și antagoniști, precum și utilizarea produselor rezultate din activitatea lor. Ca astfel de factori biologic activi pot acționa antibioticele, feromonii, hormonii juvenili și alte substanțe regulatoare, precum și microorganismele entomopatogene care provoacă boli la dăunători. Aceste metode vizează reducerea numărului de organisme dăunătoare prin perturbarea ciclurilor lor de viață și înrăutățirea condițiilor de dezvoltare a acestora. În același timp, se creează condiții favorabile pentru organismele benefice, ceea ce contribuie la sustenabilitatea ecologică a

agroecosistemelor. La baza acestei abordări stă principiul „viu împotriva viu", care presupune utilizarea interacțiunilor biologice pentru combaterea dăunătorilor și obținerea de produse agricole ecologice.

Un aspect pozitiv al utilizării metodelor biologice este respectul față de mediu. Agenții biologici pot fi utilizați fără limitarea frecvenței de aplicare, în timp ce numărul de tratări ale plantelor cu pesticide chimice este strict reglementat. Protecția biologică a plantelor se bazează pe o abordare sistemică și pe implementarea integrată a două strategii principale: conservarea și promovarea activităților populațiilor naturale de specii benefice (entomofage, microorganisme), autoapărarea plantelor cultivate în agrobiocenoze și reaprovizionarea agrobiocenozelor cu anumite organisme benefice deficitare sau absente. Principala diferență între protecția biologică a plantelor și alte metode constă în punerea în aplicare a primei strategii de protecție, bazată pe utilizarea organismelor vii și a proceselor biologice. Această tehnică se realizează prin utilizarea preparatelor biologice, precum și prin metode de repopulare sezonieră, introducere și aclimatizare a insectelor și microorganismelor benefice. Ca rezultat, se asigură o reglare țintită a populației de organisme dăunătoare prin intermediul interacțiunilor biologice naturale, ceea ce sporește rezistența agroecosistemelor și reduce necesitatea utilizării produselor chimice pentru protecția plantelor.

Creșterea numărului și a eficienței organismelor benefice în agroecosisteme se realizează prin măsuri agrobiotehnice și metode speciale de cultivare, care creează condiții favorabile pentru activitatea speciilor insectivore. Printre aceste măsuri se numără tehnici menite să mențină și să consolideze populațiile de prădători naturali ai dăunătorilor. Cultivarea soiurilor de plante rezistente la dăunători contribuie, de asemenea, la modificarea structurii populațiilor de fitofagi, ducând la formarea unor forme mai adaptate și mai viabile în condiții de presiune selectivă. În acest context, utilizarea soiurilor rezistente necesită o abordare complexă în cadrul unui sistem integrat de protecție a plantelor.

Fiecare dintre principalele metode de protecție biologică a plan-

telor (utilizarea entomofagilor și a microorganismelor utile pentru protecția plantelor) are propriile caracteristici și eficacitate în condiții specifice. Aceste metode se completează reciproc și nu se exclud. În prezent, se acordă o atenție deosebită identificării modalităților de combinare a controlului biologic cu alte metode în sistemele integrate de combatere a dăunătorilor. Obiectivul principal al acestei metode este de a studia condițiile care determină eficacitatea inamicilor naturali ai dăunătorilor și de a dezvolta metode pentru reglarea numărului și a interacțiunilor acestora cu populațiile de dăunători.

Cercetările efectuate în ultimii ani au furnizat noi date privind mecanismele complexe ale proceselor biotehnologice, ceea ce deschide perspective semnificative pentru valorificarea deșeurilor din industria alimentară. Astfel de abordări permit nu doar diversificarea gamei de produse alimentare, ci și reducerea impactului asupra mediului prin utilizarea rațională a subproduselor.

În special, cercetătorii din cadrul Universității Aristotel din Salonic, Grecia, au dezvoltat o tehnologie de obținere a unei băuturi lactate fermentate pe baza prelucrării zerului de brânză. Ca biocatalizator au fost utilizate granule de cultură de kefir, imobilizate pe material celulozic delignificat sau pe suporturi de gluten. Introducerea fructozei în produsul finit a contribuit la îmbunătățirea proprietăților sale gustative, ceea ce a sporit atractivitatea băuturii pentru consumatori. Astfel, a fost demonstrată utilizarea eficientă a unui produs secundar bogat în compuși proteici, care anterior era eliminat sau utilizat în scopuri furajere.

Ingineria genetică vegetală constă în introducerea unei gene specifice într-o plantă, pentru a-i conferi proprietăți noi. În domeniul medical, această tehnică este utilizată pentru a obține plante capabile să producă proteine umane, enzime sau vaccinuri. La nivel global, sunt cultivate anual peste 190 milioane de hectare de plante modificate genetic, majoritatea fiind folosite în scopuri industriale și de cercetare.

Bioreactoarele vegetale reprezintă sisteme controlate de culti-

vare a celulelor vegetale, destinate obținerii industriale a substanțelor biologic active. Utilizarea lor este deosebit de solicitată în industria farmaceutică datorită posibilității de control strict al condițiilor de cultivare și standardizării producției. Printre principalele avantaje ale bioreactoarelor vegetale se numără reducerea riscului de contaminare cu microorganisme patogene, costuri mai mici în comparație cu sistemele de expresie animale, precum și stabilitatea și reproductibilitatea bioproduselor obținute.

1.3. Conservarea resurselor genetice vegetale

Plantele sunt amenințate de o combinație de factori: recoltarea excesivă, practicile agricole și forestiere necorespunzătoare, urbanizarea, poluarea, distrugerea, fragmentarea și degradarea habitatelor, răspândirea speciilor străine invazive (specii neindigene care colonizează intens un anumit habitat) și schimbările climatice [Paunescu A., 2009]. Preocuparea globală cu privire la pierderea resurselor genetice valoroase a stimulat multe programe noi pentru conservarea resurselor genetice vegetale [Radomir A.-M., Stan R., Florea A., Ciobotea C.-M., Bănuță F.M., Negru M., Neblea M.A., Sumedrea D.I., 2023].

Există două strategii de bază pentru conservarea diversității genetice*: in situ* și *ex situ*. Conservarea *ex situ* se bazează pe menținerea componentelor diversității biologice în afara habitatelor naturale, sub formă de plante întregi, semințe, polen, propagule vegetative, culturi de țesuturi sau celule, iar conservarea *in situ* presupune menținerea și refacerea populațiilor și ecosistemelor viabile în habitatele naturale. Tehnicile *ex situ* sunt utilizate în general pentru a completa metodele *in situ*, dar în unele cazuri sunt singurele tehnici posibile pentru conservarea anumitor specii.

Diferența fundamentală între aceste două strategii este evidentă: conservarea *ex situ* implică retragerea taxonului care ne interesează din habitat, transferul și păstrarea în colecții, în timp ce conservarea *in situ* presupune indicarea locului de creștere și monitorizarea

plantei la fața locului [Maxted N. et al., 1997]. Aceste strategii de bază de conservare sunt împărțite în tehnologii specifice (fig. 1.1).

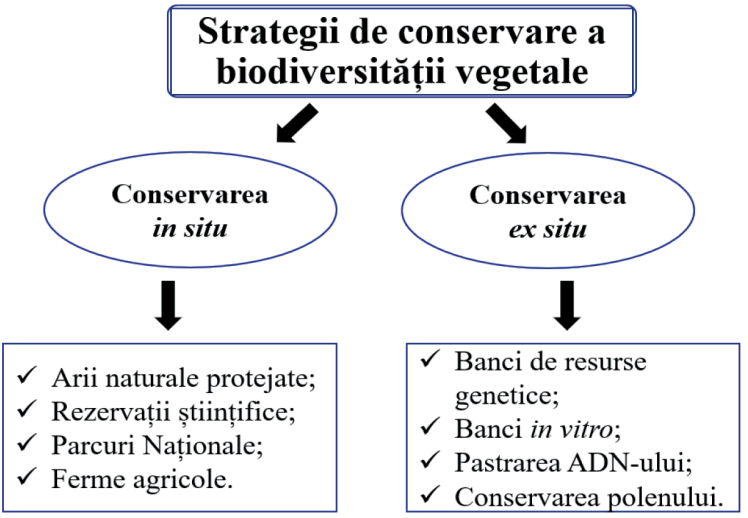


Fig. 1.1. Strategii de conservare a biodiversității vegetale

În ultimul deceniu au fost dezvoltate mai multe strategii de conservare, în principal în ceea ce privește conservarea *in situ* și *ex situ*. Conservarea *ex situ* include păstrarea semințelor, banca de gene sau colecții „vii", bănci *in vitro*, păstrarea ADN-ului și a polenului etc. Strategia de conservare *in situ* implică menținerea componentelor diversității biologice în arii naturale special protejate: rezervații științifice sau naturale, parcuri naționale, monumente naturale și conservarea agrobiodiversității în condițiile fermelor agricole și pe terenurile private. Băncile de resurse genetice reprezintă strategia principală pentru conservarea plantelor perene longevive, a speciilor recalcitrante și a celor care se înmulțesc vegetativ, în special a celor lemnoase.

În unele cazuri, acestea reprezintă singura opțiune disponibilă pentru conservarea plasmei germinative [Ramsay M. M. et al., 2000]. Băncile genetice servesc ca bază pentru efectuarea cercetărilor morfologice, biochimice și ontogenetice ale plantelor sălbatice și cultivate și sunt utilizate pe scară largă în scopuri educative și de informare.

1.4. Crioconservarea plantelor

Tehnologiile de păstrare a culturilor *in vitro* existente în prezent se împart în două grupe. Una dintre aceste grupe se bazează pe păstrarea culturilor fără a perturba procesul de creștere, în timp ce a doua se bazează pe păstrarea culturilor fie cu încetinirea creșterii, fie cu oprirea completă a acesteia – **crioconservare**. Prima abordare este destul de costisitoare, deoarece implică subcultivarea frecventă a materialului vegetal [Novikova T. I., 2013].

Depozitarea în condiții de creștere încetinită permite păstrarea materialului biologic de la câteva luni până la 2-3 ani fără subcultivare, în funcție de tehnologia utilizată și de tipul plantei [Cruz-Cruz C. A. et al., 2013]. Încetinirea creșterii se obține de obicei prin modificarea mediilor sau a condițiilor de cultivare. Modificările mediilor includ diluarea bazei minerale, reducerea conținutului de zaharoză, modificarea concentrațiilor sau combinațiilor de regulatori de creștere, adăugarea de substanțe osmotice active [Engelmann F., 2011]. Dintre factorii fizici de cultivare, se reduce temperatura în combinație cu diminuarea intensității iluminării, iar uneori culturile sunt păstrate în întuneric complet. Temperatura pentru depozitarea pe termen mediu este menținută de obicei între 4 °C și temperatura camerei [Tassy C. et al., 2006]. Cu toate acestea, pentru speciile tropicale, sensibile la temperaturi scăzute, se utilizează un interval de 15-20 °C și chiar mai mult, de aceea, pentru menținerea lor fără subcultivări frecvente, sunt necesare modificări ale compoziției chimice a mediilor nutritive [Paunescu A., 2009].

De asemenea, eficiența depozitării în condiții de creștere lentă este influențată de tipul de explante, starea lor fiziologică, volumul vaselor de cultură etc. La sfârșitul perioadei de depozitare, culturile sunt transferate pe medii proaspete, pentru a stimula creșterea, apoi sunt transferate în condițiile următorului ciclu de depozitare [Engelmann F., 2011]. Tehnologiile de stocare a culturilor *in vitro* în condiții de creștere lentă sunt utilizate în mod curent în multe laboratoare pentru a mări intervalele dintre subcultivări, iar metoda nu necesită echipamente suplimentare.

Cu toate acestea, această abordare nu rezolvă problema principa-

lă – costul ridicat al tehnologiilor, la care se adaugă riscul de variații somaclonale pentru unele specii [Blakesley D. et al., 1996]. Metoda crioconservării, care permite menținerea celulelor, țesuturilor și culturilor vii la temperaturi ultra-scăzute (-196 °C), asigură păstrarea materialelor biologice pe o perioadă lungă de timp, deoarece la temperatura azotului lichid se opresc activitatea metabolică și diviziunea celulară, astfel încât nu au loc modificări genetice. Crioconservarea este singura tehnică disponibilă în prezent pentru a asigura conservarea pe termen lung, în condiții de siguranță și eficiență din punct de vedere al costurilor, a citoplasmei speciilor cu probleme. Crioconservarea nu necesită spații mari, probele nu sunt expuse riscului de contaminare sau de erori ale operatorului, ceea ce este posibil în cazul manipulării frecvente a materialului vegetal [Engelmann F., 2011].

Unele materiale, cum ar fi semințele sau mugurii latenți, prezintă procese naturale de deshidratare și pot fi crioconservate fără niciun tratament prealabil. Cu toate acestea, majoritatea sistemelor experimentale utilizate în crioconservare (suspensii celulare, calusuri, meristeme apicale, embrioni) conțin cantități mari de apă celulară și sunt, prin urmare, extrem de sensibile la leziunile cauzate de îngheț, deoarece majoritatea dintre ele nu sunt în mod inerent tolerante la îngheț. Astfel, celulele necesită deshidratare artificială, pentru a fi protejate de daunele cauzate de cristalizarea apei intracelulare în gheață [Mazur P., 1984]. Tehnicile utilizate și mecanismele fizice pe care se bazează acestea sunt diferite în tehnicile de crioconservare clasice și în cele noi [Engelmann F., 2011]. Tehnicile clasice implică deshidratarea indusă de îngheț, în timp ce tehnicile noi se bazează pe ***vitrificare***. Vitrificarea poate fi definită ca tranziția apei direct din faza lichidă într-o fază amorfă sau sticlă, evitând formarea gheții cristaline [Fahy G. M., MacFarlane D. R., Angell C. A.; Meryman H. T., 1984].

Tehnicile clasice de crioconservare implică răcirea lentă până la o temperatură definită de preînghețare, urmată de imersia rapidă în azot lichid. Odată cu scăderea temperaturii în timpul răcirii lente, celulele și mediul extern se supra-răcesc inițial, urmată de formarea de gheață în mediu [Mazur P., 1984]. Membrana celulară acționează

ca o barieră fizică și împiedică gheața să pătrundă în interiorul celulei, iar celulele rămân neînghețate, dar supra-răcite. Pe măsură ce temperatura scade în continuare, o cantitate din ce în ce mai mare din soluția extracelulară se transformă în gheață, ceea ce duce la concentrarea soluției intracelulare. Deoarece celulele rămân supra-răcite și presiunea vaporilor de apă depășește cea a compartimentului extern înghețat, celulele se echilibrează prin pierderea de apă către gheața externă. În funcție de viteza de răcire și de temperatura de pre-înghețare, cantități diferite de apă vor părăsi celula înainte ca conținutul intracelular să se solidifice. În condiții optime, cea mai mare parte sau toată apa intracelulară care poate fi înghețată este eliminată, reducând sau evitând astfel formarea dăunătoare de gheață intracelulară la imersia ulterioară a mostrei în azot lichid. Cu toate acestea, deshidratarea prea intensă indusă de îngheț poate provoca diferite evenimente dăunătoare datorită concentrației de săruri intracelulare și a modificărilor membranei celulare [Meryman H. T., Williams R. J., Douglas M. S. J., 1977]. Reîncălzirea trebuie să se facă cât mai rapid posibil pentru a evita fenomenul de recristalizare, în care gheața se topește și se reformează la o dimensiune cristalină mai mare și mai dăunătoare din punct de vedere termodinamic [Mazur P., 1984].

Procedurile clasice de congelare includ următoarele etape succesive: precreșterea probelor, crioprotecție, răcire lentă (0,5-2,0 °C/min) până la o temperatură determinată de precongelare (de obicei în jur de -40 °C), imersia rapidă a probelor în azot lichid, depozitare, decongelare rapidă și recuperare.

Tehnicile clasice sunt, în general, complexe din punct de vedere operațional, deoarece necesită utilizarea unor congelatoare programabile sofisticate și costisitoare. În unele cazuri, utilizarea acestora poate fi evitată prin efectuarea etapei de congelare lentă cu un congelator de laborator. Tehnicile clasice de crioconservare au fost aplicate cu succes la sisteme de cultură nediferențiate, cum ar fi suspensiile celulare și calusurile și meristemele apicale ale speciilor tolerante la frig [Reed B.M., Uchendu E., 2008].

Tehnicile noi de crioconservare vizează proceduri bazate pe

vitrificare. Deshidratarea celulelor se realizează înainte de congelare prin expunerea probelor la medii crioprotectoare concentrate și/sau deshidratare cu aer. Aceasta este urmată de răcire rapidă. Ca rezultat, sunt evitați toți factorii care afectează formarea gheții intracelulare. Procedurile bazate pe vitrificare oferă avantaje practice în comparație cu tehnicile clasice de congelare. La fel ca înghețarea ultra-rapidă, acestea sunt mai potrivite pentru organe complexe (meristeme apicale, embrioni), care conțin o varietate de tipuri de celule, fiecare cu cerințe unice în condiții de deshidratare indusă de îngheț. Prin împiedicarea formării gheții în sistem (celulă), procedurile bazate pe vitrificare sunt mai puțin complexe din punct de vedere operațional decât cele clasice (de exemplu, nu necesită utilizarea congelatoarelor controlate) și au un potențial mai mare de aplicabilitate largă, necesitând doar modificări minore pentru diferite tipuri de celule [Engelmann F., 2011].

1.5. Rolul culturilor *in vitro* în conservarea și multiplicarea plantelor

Dezvoltarea durabilă a devenit o prioritate pentru factorii de decizie din întreaga lume. Printre gama largă de tehnologii cu potențialul de a atinge obiectivul durabilității, biotehnologia vegetală ocupă un loc important, în special în domeniile producției alimentare, materiilor prime pentru industria farmaceutică, bioremediere, precum și în conservarea biodiversității vegetale [Badea E., Raicu P., 1984; Badea E., Săndulescu D., 2001; García-Vázquez G., Carrión G., Gutiérrez-Mora A., Mata-Rosas M., 2026; Pawłowska B., Ptak A., 2023].

Tehnica de micropropagare *in vitro* oferă o serie de beneficii strategice și economice net superioare metodelor tradiționale de înmulțire vegetativă, transformând radical procesul de obținere a materialului săditor:

1. *Eficiența utilizării materialului biologic.* Nu este necesar un număr mare de plante-mamă pentru demararea producției, câțiva muguri fiind suficienți pentru inițierea unor culturi viabile.

2. *Productivitate ridicată pe spațiu limitat.* Metoda permite obținerea unui număr masiv de exemplare pe unitatea de suprafață;

de exemplu, pe un singur metru pătrat, în mod etajat, pot fi produse anual aproximativ 35.000 de arbori sau 150.000 de plante de căpșun.

3. *Garanția stării fitosanitare*. Desfășurarea procesului în condiții aseptice riguroase asigură obținerea unui material biologic liber de virusuri și alți agenți patogeni.

4. *Rată accelerată de multiplicare*. Capacitatea mare de multiplicare permite și schimbarea rapidă a sortimentului în funcție de diversificarea vegetală a cerințelor pieței.

5. *Continuitatea procesului de producție*. Controlul condițiilor de mediu (temperatură constantă de 25 °C) face posibilă desfășurarea procesului de producție pe tot timpul sezonului.

6. *Logistică și transport eficient*. Materialul înrădăcinat poate fi transportat facil fără substrat de agar, volumul redus permițând ca 80.000 de plante să cântărească, împreună cu ambalajul, doar 30 kg.

7. *Conservarea resurselor genetice*. Tehnica permite crearea băncilor de gene în spații restrânse; spre exemplu, într-un volum de 200 de litri pot fi conservate mii de clone, asigurând păstrarea biodiversității.

8. *Multiplicarea speciilor dificile*. Facilitează înmulțirea plantelor cu semințe rare, a celor care germinează greu sau a speciilor care nu răspund la tehnicile convenționale.

9. *Potențial de producție nelimitat*. Prin subcultivări succesive, numărul de plante obținute de la o singură plantă-mamă poate crește exponențial [Badea E., Raicu P., 1984; Badea E., Săndulescu D., 2001].

În concluzie, cultura *in vitro* ocupă un loc important în tehnicile moderne privind conservarea și înmulțirea plantelor. Datorită posibilității de cultivare controlată în condiții sterile, acestea asigură o microînmulțire rapidă și eficientă, conservarea speciilor rare și pe cale de dispariție, precum și menținerea stabilității genetice a materialului vegetal. Utilizarea tehnologiilor *in vitro* contribuie la dezvoltarea biotehnologiei vegetale, extinde posibilitățile de selecție și joacă un rol important în rezolvarea problemelor legate de conservarea biodiversității și utilizarea durabilă a resurselor vegetale.

2. ASPECTE ALE TEHNOLOGIEI CULTIVĂRII PLANTELOR *IN VITRO*

2.1. Noțiuni generale privind cultura *in vitro*



Cultura *in vitro* este o metodă de cultivare a celulelor, țesuturilor sau organelor vegetale în condiții create artificial și strict controlate, în afara organismului, de obicei pe medii nutritive într-un mediu de laborator steril. Această abordare se bazează pe capacitatea celulelor vegetale de totipotentă, adică de a regenera un organism întreg dintr-o singură celulă, în prezența factorilor nutritivi și a regulatorilor de creștere necesari.

Metoda de cultură *in vitro* este utilizată pe scară largă în biotehnologia vegetală modernă pentru rezolvarea problemelor legate de micropropagare, obținerea de material de plantare fără viruși, conservarea și menținerea resurselor genetice, precum și pentru efectuarea de cercetări fundamentale în domeniul fiziologiei și geneticii plantelor. Utilizarea sa permite accelerarea proceselor de înmulțire a formelor valoroase de plante și asigură obținerea unui material omogen și stabil din punct de vedere genetic.

Termenul *„cultură in vitro”* cuprinde o gamă largă de tehnici care implică creșterea în condiții sterile a germoplasmei vegetale (în special meristeme apicale, embrioni somatici sau calus embriogen) pe medii de cultură artificiale [Lozinschii M. și al.; 2025; Brînză L. și al., 2025].

Biotehnologia vegetală se bazează în mare măsură pe **totipotența celulară**. Totipotența celulară, proprie plantelor superioare, este definită ca fiind capacitatea unei singure celule somatice a or-

ganismului, de a-și realiza întregul potențial genetic și, în anumite condiții, de a reconstitui un organism multicelular complet. La baza acestui fenomen se află faptul că majoritatea celulelor vegetale, în ciuda specializării lor (de exemplu, celulele frunzei, tulpinii sau rădăcinii), păstrează un set complet de informații genetice. Starea diferențiată a celulei nu este determinată de pierderea genelor, ci de reglarea specifică a expresiei acestora. Prin urmare, odată cu modificarea condițiilor mediului extern și a echilibrului hormonal, este posibilă „reprogramarea" stării celulare [Badea E., Săndulescu D., 2001; Cosmulescu S.N., 2024].

În contextul biotehnologiei, totipotențialitatea se manifestă prin capacitatea celulelor izolate sau a unor fragmente mici de țesut de a parcurge, în condiții *in vitro*, etapele de diferențiere, formarea țesutului calus și regenerarea ulterioară a organelor și a întregii plante. Acest proces este indus pe medii nutritive artificiale cu un raport controlat de fitohormoni, precum auxinele și citokininele. Semnificația practică a acestui principiu constă în faptul că acesta servește drept bază teoretică pentru metodele de cultură celulară și tisulară, înmulțirea microclonală, precum și transformarea genetică a plantelor. De exemplu, celulele din *Nicotiana benthamiana* sunt adesea utilizate ca sistem model datorită capacității ridicate de regenerare și a receptivității la transformarea agrobacteriană.

Astfel, totipotentitatea celulară reprezintă un principiu biologic cheie, care asigură posibilitatea regenerării unor plante întregi din celule individuale și stă la baza tehnologiilor moderne de bioinginerie vegetală [Badea E., Săndulescu D., 2001; Cosmulescu S.N., 2024].

În funcție de părțile plantei utilizate ca explanturi, tehnicile de cultură a țesuturilor vegetale sunt clasificate în următoarele tipuri: cultura meristemului, cultura embrionilor, cultura anterelor, cultura ovulelor etc.

Cercetări aplicând metoda culturii *in vitro* pe o serie de specii de plante, s-au desfășurat în laboratorul de cercetări științifice „Ge-

netică, Fiziologie și Biochimie a Plantelor" (LGFBP) din cadrul Catedrei Biologie Vegetală și Animală a Universității Pedagogice de Stat „Ion Creangă", precum și în Centrul de Cercetare și Extensiune pentru Agricultură, Biodiversitate și Dezvoltare Rurală „GreenTech" al Universității Tehnice din Moldova.

În cadrul cercetărilor au fost analizate diverse specii de plante cultivate prin metoda culturii *in vitro* (fig. 2.1).



Menta bergamotă
(*Mentha citrata* Ehrh.)



Aronia
(*Aronia melanocarpa* L.)



Secvoia
(*Sequoia* sp.)



Dediței mare
(*Pulsatila grandis* Wend)



Mur
(*Rubus fructicosus* L.)



Ghiocel nival
(*Galanthus nivalis* L.)



Oregano (*Origanum vulgare* L.) **Fragi** (*Fragaria vesca* Coville, L.) **Stevia** (*Stevia rebaudiana* Bertoni)

Fig. 2.1. Diferite specii de plante introduse în cultura *in vitro*

Lucrările menționate au avut ca scop studierea particularităților introducerii materialului vegetal în cultura *in vitro*, precum și optimizarea condițiilor de creștere și dezvoltare a acestuia în condiții controlate de laborator. Analiza plantelor cultivate *in vitro* a evidențiat diversitatea caracteristicilor lor morfologice și eficiența ridicată a metodei de înmulțire microclonală. Utilizarea abordărilor biotehnologice deschide perspective largi pentru agricultură, selecție, horticultură ornamentală și conservarea biodiversității [Brînză L., Călugăru-Spătaru T., Lozinschii M., Coropceanu E., Botezatu I., 2025].

Astfel, cultura plantelor *in vitro* reprezintă un instrument modern important al biotehnologiei, care permite rezolvarea atât a problemelor științifice, cât și a celor practice în domeniul horticulturii și al protecției resurselor vegetale.

2.2. Etapele micropropagării

Cultura tisulară a plantelor este o metodă de cultivare a celulelor, țesuturilor sau organelor pe medii nutritive artificiale, în condiții strict controlate și sterile. Unul dintre avantajele acestei tehnici este posibilitatea înmulțirii rapide și în masă a plantelor prin ***clonare***, ceea ce permite obținerea de material de plantare genetic omogen în

termen scurt. Înmulțirea plantelor *in vitro* prin clonare în condiții de cultură tisulară a primit denumirea de ***microînmulțire*** și este utilizată pe scară largă în biotehnologia modernă și în agricultură.

Întregul proces poate fi rezumat în etape (fig. 2.2).

În pofida faptului, că pentru fiecare specie de plante se elaborează protocoale individuale de cultivare, bazate pe particularitățile sale fiziologice și cerințele privind mediul nutritiv, există o serie de etape comune, caracteristice pentru majoritatea sistemelor *in vitro*. Printre acestea se numără introducerea explantului inițial în cultură, sterilizarea și adaptarea acestuia la condițiile artificiale, înmulțirea activă ulterioară a lăstarilor, înrădăcinarea plantelor obținute, precum și etapa de aclimatizare, în cursul căreia plantele sunt transferate treptat din mediul steril în condițiile mediului exterior. Respectarea acestor etape asigură stabilitatea procesului de microînmulțire și obținerea de material de plantare viabil.

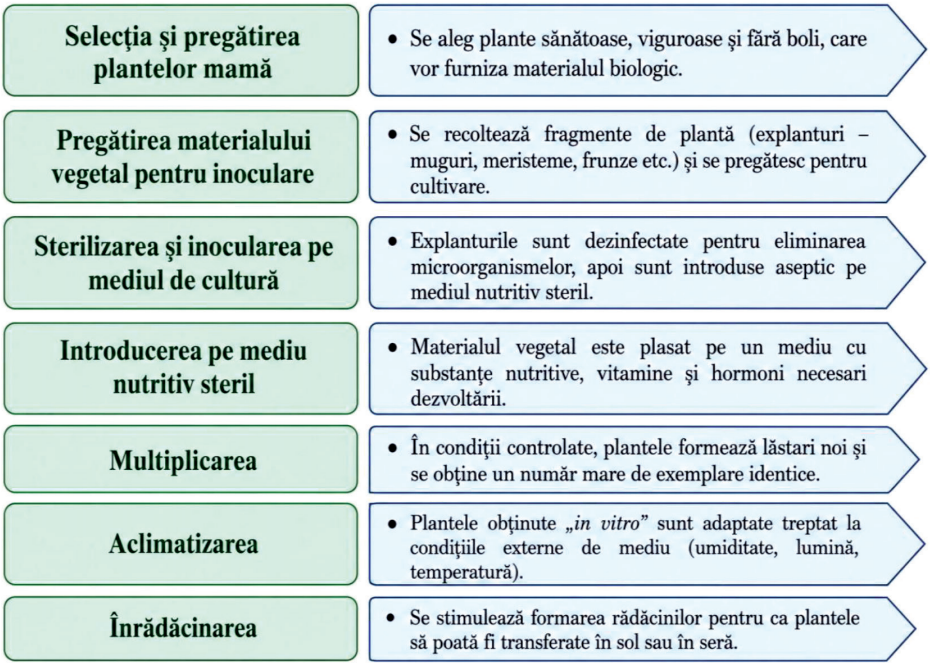


Fig. 2.2. Etapele înmulțirii *in vitro*

Procesul de înmulțire microclonală se împarte, în mod convențional, în următoarele etape:

Etapa I: Inițierea culturii (prelevarea și sterilizarea)

Organizarea activităților în laboratorul de cultivare *in vitro* a plantelor cuprinde o serie de operațiuni tehnologice succesive, care asigură obținerea de material vegetal steril și cultivarea cu succes a acestuia. Unele dintre aceste etape sunt prezentate în figura 2.3.

Alegerea plantei mamă – se selectează plante sănătoase, viguroase și libere de virusuri. Explantul sectorului fragmentului de țesut viu (muguri, porțiuni de tulpină, frunze sau embrioni) care va fi cultivat. Pentru a elimina microorganismele de la suprafața țesuturilor este important de a fi efectuate clătiri repetate cu apă curgătoare. Apoi, explantele sunt spălate preventiv cu apă și detergent, ulterior tratate cu ajutorul unor dezinfectanți ca: hipoclorit de sodiu, hipoclorit de calciu, dicloroizocianurat de potasiu, permanganat de potasiu, etanol sau clorură de mercur, după care – sunt spălate cu apă distilată sterilă (autoclavată).



Fig. 2.3. Unele secvențe din procesul de lucru:
1 – sterilizarea veselei și instrumentelor; **2** – transferarea mediului nutritiv în borcane; **3** – autoclavarea mediului nutritiv; **4** – sterilizarea materialului vegetal; **5** – instrumentele de laborator; **6** – inocularea materialului vegetale pe mediul nutritiv; **7** – camera aseptică

Etapa II: Introducerea pe mediu nutritiv steril

Obiectivul acestei etape constă în stabilitatea unei culturi aseptice care să înceapă să crească. Mediul de cultură de bază Murashige-Skoog (MS) conține macro și microelemente, vitamine, o sursă de carbon (zaharoză) și un agent de solidificare (agar). Inocularea se realizează în hotă cu flux laminar de aer (un spațiu de lucru ultra-curat). Explantul sterilizat este plasat pe mediu de cultură în eprubete sau vase mangenta (fig. 2.4).



Fig. 2.4. Explante introduse pe mediu nutritiv:
1 – paulonia; **2** – laleaua pestriță; **3** – stejar; **4** – stevie; **5** – secvoia;
6 – oregano; **7** – salbă; **8** – mentă turcească

După transferul explantelor pe mediul de cultură, vasele sunt plasate în camere de creștere, unde se mențin condiții de mediu strict controlate (fig. 2.5). Temperatura de 22-25 °C asigură un nivel optim al activității metabolice a celulelor și țesuturilor. Iluminarea reglabilă, cu intensitate și durată prestabilite ale fotoperioadei, stimulează creșterea și dezvoltarea explantelor, precum și procesele de organo-

geneză. Controlul umidității permite prevenirea uscării mediului de cultură și crearea unor condiții favorabile pentru formarea de lăstari și rădăcini noi.



Fig. 2.5. Vase transferate în camera de creștere

Etapa III: Multiplicarea (micropropagarea)

Aceasta este etapa în care se obține un număr mare de plante într-un timp scurt (fig. 2.6).



Fig. 2.6. Microclonarea la plantele de:
1 – dediței mare; **2** – pinguicula; **3** – stevie; **4** – menta bergamotă

Rolul regulatorilor de creștere este esențial în această etapă și se utilizează de regulă citokinine (precum BAP, TDZ, mTP, 2iP, KIN). Acestea rup dominanța apicală și stimulează dezvoltarea mugurilor axilari sau adventivi, formând „tufe" de lăstari multipli.

Subcultivarea reglementar are loc la intervale de 4-6 săptămâni, uneori chiar 8 săptămâni, lăstarii formați sunt separați și transferați pe un mediu proaspăt pentru a continua multiplicarea exponențială sau pentru a fi transferați la etapa de rizogeneză.

***Etapa IV-a:* Înrădăcinarea sau rizogeneza**

Etapa de înrădăcinare reprezintă o etapă importantă a înmulțirii microclonale a plantelor *in vitro*. Un lăstar fără rădăcini este doar o clonă incompletă. În această etapă, se elimină complet citokininele, care blochează rădăcinile și se introduc auxinele, care stimulează formarea rădăcinilor. Astfel, lăstarii formați sunt transferați într-un mediu nutritiv special, ce conține auxine. Cel mai frecvent, pentru inducerea rizogenezei se utilizează auxine, precum acidul indolil-3-butiric, acidul indolil-3-acetic și acidul naftilacetic (fig. 2.7).

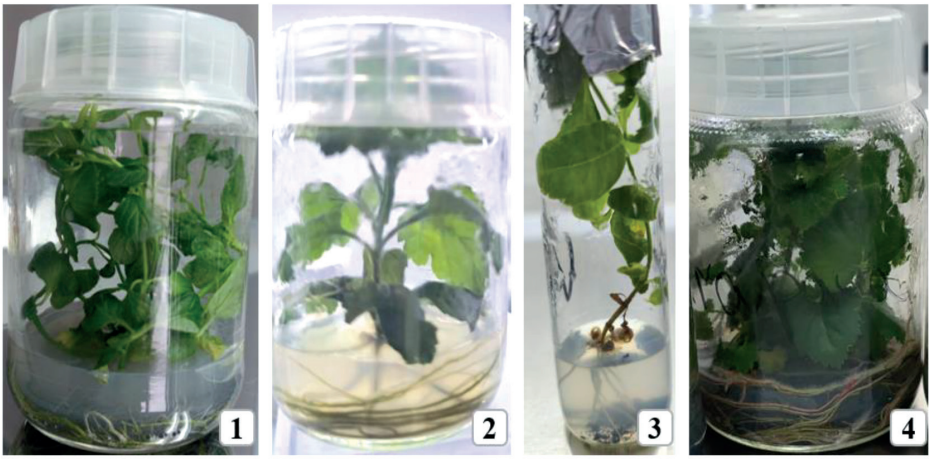


Fig. 2.7. Inducerea rizogenezei la plante *in vitro,* cultivate pe mediul MS suplimentat cu auxine:
1 – mentă bergamotă; **2 –** crizantemă; **3** – lămâiță**; 4** – mur

Sub acțiunea acestor fitohormoni, se activează diviziunea și diferențierea celulară în partea bazală a lăstarului, ceea ce duce la for-

marea primordilor radiculari și la dezvoltarea unui sistem radicular complet.

Concentrația de auxine este stabilită individual pentru fiecare specie de plantă, deoarece un exces al acesteia poate provoca formarea de calus și poate încetini dezvoltarea rădăcinilor. Înrădăcinarea reușită asigură obținerea unor plante regenerate viabile, pregătite pentru adaptarea ulterioară la condiții de cultivare nesterile (fig. 2.8).

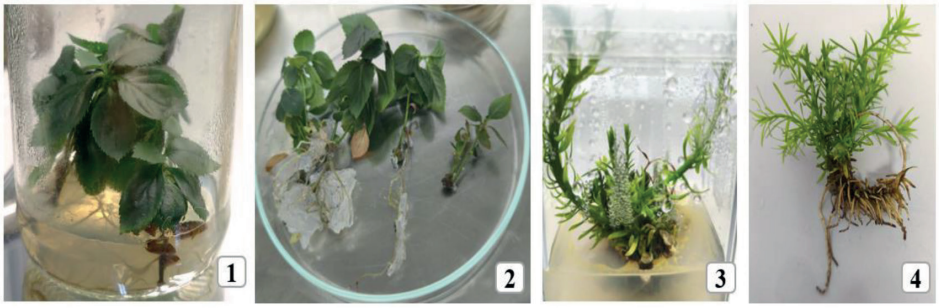


Fig. 2.8. Inducerea rizogenezei la plantele de aronie și secvoia:
1 – aronia pe mediu MS suplimentat cu AIB; **2** – aspectul rădăcinilor de aronia extrase din mediul de cultură; **3** – secvoia pe mediu MS suplimentat cu ANA;
4 – aspectul rădăcinilor de secvoia extrase din mediul de cultură

La culturile erbacee poate fi utilizată varianata înjumătățită, care este și o alternativă mai rentabilă economic. Rădăcinile formate *in vitro* sunt adesea lipsite de perișori absorbanți performanți. De aceea, mediul este adesea diluat (jumătate din concentrația de săruri), forțând planta să „caute" nutrienți și să dezvolte un sistem vascular mai robust între tulpină și rădăcină.

***Etapa V:* Aclimatizarea**

Este etapa ideală de trecere a plantelor din condiții de laborator la mediul extern, unde plantele trebuie să devină autotrofe (să fotosintetizeze singure).

Plantele cultivate *in vitro* au cuticula foarte subțire și stomate care nu funcționează corect, fiind predispuse la deshidratare rapidă. Plantele sunt mutate în amestecuri de sol, perlit sau nisip.

Umiditatea este men-ținută inițial la aproape 100% (sub folie sau prin ceață artificială) sau incubator specializat și scăzută treptat

pe 2-4 săptămâni. Odată ce planta și-a întărit cuticula și a început să crească activ, ea poate fi transferată în seră sau în câmp.

Plantele prezentate în figura 2.9 au fost obținute prin metoda înmulțirii microclonale *in vitro* și transferate pentru aclimatizare în condiții *ex vitro*.



Fig. 2.9. Aclimatizarea plantelor de menta bergamotă, obținute prin metoda *in vitro*

În această etapă se observă o dezvoltare activă a sistemului radicular și a părții aeriene a lăstarilor, ceea ce demonstrează adaptarea cu succes a regeneranților la cultivarea pe substrat. Trecerea la un tip de nutriție autotrofă este însoțită de o reorganizare a proceselor fiziologice, inclusiv formarea unui sistem radicular funcțional și adaptarea aparatului foliar la condițiile de umiditate redusă și iluminare naturală. Diferențele în ceea ce privește gradul de dezvoltare al exemplarelor individuale sunt tipice pentru stadiul de aclimatizare și reflectă particularitățile individuale ale regeneranților.

2.3. Organizarea unui laborator de cultură in vitro a plantelor

Laboratorul de cultură *in vitro* a plantelor este organizat în mai multe compartimente funcționale, care asigură desfășurarea etapizată a operațiunilor tehnologice (fig. 2.10).

Fiecare compartiment are un rol bine definit în asigurarea condițiilor optime de lucru aseptic și de dezvoltare a culturilor vegetale. Organizarea corectă a acestor spații contribuie esențial la prevenirea contaminării și la eficiența procesului de micropropagare.



Fig. 2.10. Reagenți și echipamente prezente în laborator: 1 – dulap cu reagenți chimici; **2** – sterilizator; **3** – instrumente de laborator; **4** – autoclava

O astfel de organizare a laboratorului corespunde abordărilor moderne din biotehnologie și practica culturii țesuturilor vegetale, contribuind la minimizarea riscului de contaminare și la creșterea eficienței obținerii de regeneranți.

Compartimentul de pregătire a mediilor nutritive – este destinat preparării mediilor de cultură, de regulă pe bază de mediu Murashige-Skoog, suplimentat cu regulatorii de creștere. Activități principale includ cântărirea substanțelor chimice, dizolvarea acestora, ajustarea pH-ului și repartizarea.

Compartimentul de inoculare (camera aseptică) – reprezintă zona critică a laboratorului, unde se efectuează inocularea explantelor

pe mediul nutritiv. Lucrările se desfășoară în condiții strict aseptice, în hotă cu flux laminar, care asigură un curent de aer steril (fig. 2.11).



Fig. 2.11. Unele secvențe din lucrărire realizate în condiții aseptice, în **hota cu flux laminar**

Suprafețele și instrumentele sunt dezinfectate periodic, iar accesul este limitat pentru a reduce riscul contaminării.

Organizarea spațiului de lucru în condiții aseptice pentru cultura *in vitro*. Organizarea funcțională a spațiului de lucru în hota cu flux laminar este importantă pentru asigurarea manipulării sterile a culturilor *in vitro*, prevenirea contaminării și desfășurarea eficientă a operațiunilor de subcultivare. Înainte de inițierea lucrului, suprafața hotei cu flux laminar este dezinfectată, iar materialele necesare sunt amplasate rațional pentru a asigura desfășurarea corectă a manipulărilor sterile și pentru a reduce riscul contaminării.

Dispunerea principalelor elemente utilizate în timpul lucrului este prezentată în figura 2.12.



Fig. 2.12. Organizarea spațiului de lucru în condiții aseptice pentru cultura *in vitro*

În mâna dreaptă a operatorului se află instrumentul steril de lucru (foarfecă), utilizat pentru fragmentarea, separarea și transferul materialului vegetal pe mediul nutritive. În fața operatorului, în zona centrală a hotei, se află zona activă de lucru: recipientele cu plante *in vitro*, suprafața sterilă de manipulare și materialul vegetal pregătit pentru subcultivare.

În partea stângă a spațiului de lucru sunt amplasate recipientele sterile cu medii nutritive și culturile vegetale pregătite pentru transfer, astfel încât să fie accesibile fără intersectarea zonei sterile. În partea din fața operatorului a spațiului de lucru sunt amplasate instrumentele sterile (pensete, foarfece, bisturie) și sterilizatorul pentru instrumentar care este amplasat spre dreapta operatorului, în colțul drept al hotei, facilitând sterilizarea repetată în timpul lucrului și accesul liber pentru operator.

Echiparea operatorului pentru lucrul în condiții aseptice. Operatorul este echipat corespunzător cerințelor de lucru în laboratorul de culturi vegetale *in vitro*, utilizând echipament individual de protecție pentru menținerea sterilității și prevenirea contaminării materialului biologic.

- ✓ Halat de laborator curat – protejează zona de lucru și limitează transferul particulelor din mediul extern.
- ✓ Bonetă de protecție pentru păr – acoperă complet părul, prevenind eliberarea particulelor și contaminarea culturilor.

- ✓ Mască de protecție – reduce dispersarea microorganismelor provenite din respirație în timpul manipulărilor sterile.
- ✓ Mănuși sterile de unică folosință – permit manipularea explantelor, recipientelor și instrumentarului în condiții aseptice.
- ✓ Mânecile halatului sunt ajustate corespunzător, iar mâinile sunt poziționate în zona sterilă de lucru pentru a nu perturba fluxul laminar al aerului (fig. 2.12).

Înaintea începerii manipulărilor, mănușile sunt dezinfectate periodic cu alcool etilic 70%, iar operatorul evită mișcările inutile pentru menținerea unui mediu aseptic. Suprafețele și instrumentele sunt dezinfectate periodic, iar accesul este limitat pentru a reduce riscul contaminării.

Compartimentul de creștere și dezvoltare a culturilor este destinat incubării culturilor *in vitro* în condițiile controlate de temperatură, lumină și umiditate. De regulă, temperatura este menținută la 22-25 °C, iar fotoperiodismul este de 16 ore de lumină și 8 ore întuneric. Culturile sunt amplasate pe rafturi iluminate artificial, utilizând lămpi fluorescente sau LED (fig. 2.5).

Compartimentul de aclimatizare ex vitro – destinat transferului de plantulele obținute *in vitro,* în condiții *ex vitro*, fiind adaptate treptat la mediul natural. Se asigură o umiditate ridicată inițială, se urmărește o reducere progresivă, pentru a favoriza dezvoltarea sistemului radicular și adaptarea condițiilor ambientale.

Compartimentele auxiliare – includ spații pentru spălarea și sterilizarea sticlăriei și a ustensilelor; depozitarea reagenților și a materialelor consumabile. Organizarea eficientă a acestor zone contribuie la buna desfășurare a activităților experimentale.

Dotarea tehnică și infrastructura de laborator. Desfășurarea procesului de micropropagare necesită utilizarea unei infrastructuri de laborator specializate, menite să asigure controlul mediului aseptic și precizia dozajelor nutritive.

Echipamente pentru asigurarea sterilității și igienei. Asepsia riguroasă este garantată prin utilizarea hotei cu flux laminar verti-

cal (pentru inoculări sterile) și a autoclavei, esențială pentru sterilizarea umedă a mediilor. Instrumentarul metalic și sticlăria sunt supuse sterilizării la cald în pupinel (dulap de sterilizare uscată), după o curățare prealabilă standardizată în mașina de spălat vesela chimică și uscarea în dulapul termostatat.

Pregătirea și analiza mediilor nutritive. Pentru prepararea soluțiilor se utilizează apă de înaltă puritate obținută cu ajutorul distilatorului și bidistilatorului. Precizia (0,001 g) compoziției este asigurată de balanța analitică și de pH-metrul digital, utilizat pentru calibrarea mediului la valoarea de 5,2-5,8-6,3. Procesul de omogenizare este facilitat de agitatorul magnetic și cuptorul cu microunde (pentru o topire mai rapidă a agarului). Materialele organice sensibile și stocurile de regulatori de creștere necesită conservare la rece în frigider sau chiar în congelator.

Manipularea și incubarea culturilor. Izolarea meristemelor se realizează sub microscopul stereo, asigurând o precizie chirurgicală. Întreg materialul biologic este incubat în camera de creștere (Fitotron) sau în etuvă, unde se mențin parametrii constanți de temperatură și fotoperioadă, necesare dezvoltării optime a explantelor.

- ✓ *Hota cu flux laminar vertical* – asigură steriliatea mediului pentru inoculare prin filtrarea aerului (HEPA).
- ✓ *Autoclava* – utilizată pentru sterilizarea termică a mediilor și instrumentarului (121 °C timp de 20 min).
- ✓ *Microscopul stereo* – indispensabil pentru excizia cu precizie a meristemelor.
- ✓ *Balanța analitică* (cu precizie de 0,001 g) – pentru cântărirea riguroasă a regulatorilor de creștere, vitaminelor, sărurilor.
- ✓ *Camera de creștere* (*Fitotron*) – asigură controlul fotoperioadei (16h L/8h Î) și al temperaturii (25 ± 2 °C).
- ✓ *Frigider* – un echipament necesar pentru conservarea temperaturii scăzute (2-8 °C) a materialelor organice termolabile, a soluțiilor stoc de vitamine și regulatori de creștere, precum și a mediilor de cultură preparate.
- ✓ *Agitator* (magnetic) – instrument ce facilitează omogenizarea

rapidă a soluțiilor nutritive și dizolvarea completă a componentelor solide (săruri, zaharoză) prin agitare mecanică continuă.

- ✓ *Cuptorul cu microunde* – utilizat pentru topirea rapidă și uniformă a mediilor de cultură gelificată anterior sau pentru dizolvarea rapidă a agarului în faza de preparare, înainte de dozare și autoclavare.
- ✓ *Etuva* (inhibitor/incubator) – este utilizată pentru menținerea unei temperaturi constante și controlate, necesară pentru incubarea culturilor în condiții specifice sau pentru realizarea testelor de sterilitate.
- ✓ *Dulapul de uscare a veselei* – destinat eliminării umidității de pe sticlăria de laborator după spălare, prevenind contaminarea cu depuneri de calcar și pregătind instrumentarul pentru sterilizarea uscată sau depozitare.
- ✓ *Distilatorul* – echipament fundamental pentru producerea apei distilate de înaltă puritate, utilizată ca solvent de bază în prepararea mediilor nutritive și în procesul de clătire aseptică a explantelor.
- ✓ *pH-metrul digital* – instrument de precizie utilizat pentru calibrarea aciditații mediului de cultură a valorii optime (5,8), asigurând astfel stabilitatea nutrienților și gelificarea corectă a substratului.
- ✓ *Bidistilatorul* – asigură producerea apei de înaltă puritate (apă bidistilată), lipsită de urme de săruri minerale, compuși organici sau microorganisme. Aceasta este utilizată exclusiv pentru prepararea soluțiilor stoc de mare precizie (vitamine, regulatori de creștere) și pentru clătirea finală a materialului biologic, unde puritatea solventului este critică.
- ✓ *Dulapul pentru sterilizarea veselei* – este utilizat pentru sterilizarea prin căldură uscată a instrumentarului metalic și a sticlăriei de laborator. Procesul se realizează de regulă la temperaturi de 160-180 °C, asigurând distrugerea furnizorilor patogeni pe obiectele care nu necesită cerințe de umiditate (abur).
- ✓ *Mașina de spălat vesela de laborator* – un echipament automa-

tizat care asigură curățarea standardizată și eficientă a sticlăriei. Aceste cicluri de spălare cu detergenți specifici și clătiri repetate, garantează eliminarea reziduurilor chimice care ar putea interfera cu creșterea culturilor *in vitro*.

În laboratorul de biotehnologie vegetală se utilizează instrumente și consumabile sterile, care asigură respectarea condițiilor de asepticitate în timpul lucrului cu culturi *in vitro*. Acest lucru permite prevenirea contaminării culturilor cu microflora străină și menținerea stabilității condițiilor experimentale în toate etapele cultivării (tab. 2.1).

Tabelul 2.1. Instrumente și consumabile sterile utilizate în laboratorul de biotehnologii vegetale

Nr. d/o	Denumire	Observații / Utilizare
1	**Pense anatomice**	Manipularea delicată a explantelor, transfer între medii
2	**Bisturiu cu lame**	Tăierea explantelor și îndepărtarea țesuturilor nedorite
3	**Foarfeci microchirurgicale**	Secționarea precisă a țesuturilor vegetale
4	**Ac de inoculare / ac de transfer**	Transferul explantelor mici pe mediul nutritiv
5	**Spatule sterile**	Plasarea explantelor pe suprafața mediului nutritiv
6	**Pipete automate**	Transfer de lichide sterile, soluții nutritive sau sterilizante
7	**Cutii Petri sterile**	Manipularea explantelor în condiții sterile
8	**Mănuși de unică folosință sterile**	Protecția explantelor și a operatorului împotriva contaminării
9	**Măști faciale**	Reducerea contaminării cu particule și aerosoli
10	**Halat de laborator**	Protecția operatorului și a mediului de lucru
11	**Șervețele sterile / hârtie de filtru sterile / vată sterilă**	Uscarea sau curățarea explantelor după spălare

12	**Flacoane și tuburi sterile**	Păstrarea explantelor și soluțiilor sterile
13	**Folie de parafină (Parafilm)**	Sigilarea recipientelor pentru a preveni contaminarea
14	**Pahare Berzelius și Erlenmeyer**	Pentru prepararea și titrarea mediilor
15	**Recipiente opace (chihlimbar)**	Pentru depozitarea substanțelor fotosensibile (vitamine, regulatori de creștere) și soluțiile stoc a mediilor nutritive
16	**Markere și etichete rezistente la umiditate**	Mijloace de marcare a probelor, rezistente la umiditate
17	**Hârtie de pH sau soluții indicatoare**	Verificarea și ajustarea acidității mediului (5,8)
18	**Baghete din sticlă**	Omogenizarea și dizolvarea substanțelor
19	**Pahare din sticlă**	Vas pentru prepararea și mixarea volumului total
20	**Hârtii de cântărire**	Suport pentru măsurarea precisă a pudrelor pe balanță
21	**Cilindri gradați de 10, 50, 100, 500 ml**	Măsurarea exactă a apei și a soluțiilor stoc
22	**Spatulă**	Prelevarea și manipularea reagenților solizi
23	**Ulcior sau alt dozator**	Repartizarea rapidă a mediului în vasele de cultură
24	**Tuburi de cultură, borcane sau alte vase de cultură dorite**	Vase sterile pentru creșterea explantelor
25	**Suporturi pentru tuburi de testare**	Menținerea stabilității și organizarea eprubetelor
26	**Mop, burete**	Curățarea podelelor
27	**Foi de policarbonat**	Izolarea spațiilor de cultură sau rafturilor
28	**Burete, lavete mediu de uz casnic**	Curățenie generală, curățarea și igienizarea sticlăriei și a suprafețelor
29	**Termometru digital**	Monitorizarea temperaturii în camera de creștere
30	**Cronometru mecanic (60 minute)**	Controlul timpului de sterilizare și al expunerii la dezinfectanți
31	**Clepsidră**	Controlul timpului de sterilizare și al expunerii la dezinfectanți

32	**Lumini de control în camera de creștere**	Asigurarea fotoperioadei necesare pentru procesul de fotosinteză (16h L/8h Î)
33	**Capace**	Închiderea vaselor de cultură pentru menținerea sterilității și a umidității
34	**Prosoape, role de hârtie**	Uscarea mâinilor și curățarea suprafețelor umede
35	**Tavă pentru laborator**	Organizarea și transportul vaselor de cultură
36	**Tăvi alveolare pentru aclimatizarea plantelor**	Suport cu alveole pentru aclimatizarea plantelor la etapa de *ex vitro*
37	**Pisetă**	Recipient flexibil folosit pentru a pulveriza un jet subțire de lichid
38	**Perii**	Curățarea eprubetelor
39	**Sticlă cu pulverizator**	Pulverizare pentru plantele la etapa de *ex vitro*

Noțiuni utilizate în cultura *in vitro.* Asepsia, sterilizarea și dezinfectarea sunt elemente obligatorii ale practicii de laborator în cultivarea plantelor *in vitro* (fig. 2.2). Respectarea acestora asigură eliminarea totală sau parțială a microorganismelor de pe suprafața instrumentelor, a mediilor de cultură și a materialului vegetal, prevenind contaminarea culturilor. Organizarea eficientă a acestor procese constituie baza desfășurării cu succes a cercetărilor biotehnologice și a obținerii de explante vegetale viabile.

Tabelul 2.2. Procedee de igienizare în laborator

Termen	Obiectiv	Rezultat
Asepsie	Prevenirea contaminării	Menținerea curățeniei
Sterilizare	Distrugerea totală (inclusiv a sporilor)	Absența totală a vieții
Dezinfectare	Reducerea numărului de germeni patogeni	Mediu sigur, dar nu absolut steril

Asepsia este un ansamblu de măsuri care au scopul să împiedice pătrunderea microorganismelor în mediul steril, în culturi, echipamente și consumabile. În cazul culturilor *in vitro*, asepsia presupune

lucrul într-o cameră laminară cu aer filtrat, utilizarea instrumentelor sterile, a mănușilor sterile etc. (tab. 2.2).

Sterilizarea constă în distrugerea completă a tuturor formelor de microorganisme, inclusiv spori, viruși și ciuperci. Metodele de sterilizare utilizate sunt: autoclavarea, sterilizarea prin căldura uscată, filtrarea, sterilizarea cu gaz, raze ultraviolete etc.

Dezinfectarea constă în distrugerea sau reducerea numărului de microorganisme patogene la un nivel sigur, dar nu neapărat distrugerea completă a tuturor formelor de viață.

Sterilizarea încăperilor și a suprafețelor. O primă măsură esenţială cu caracter preventiv constă în menținerea unei curățenii exemplare în încăperi (a pardoselilor, meselor de lucru, rafturilor). Recipientele vor fi ferite de praf, iar personalul va avea acces în zona aseptică cu halate, bonete (baticuri) și încălțăminte – toate sterile. Îmbrăcămintea de stradă şi părul constituie surse de infecţii. În cursul nopții perimetrul steril sau chiar întregul spațiu destinat laboratorului de culturi de țesuturi este indicat să fie sub incidența razelor UV.

Sterilizarea recipientelor de cultură. Deoarece o serie de microorganisme prezintă spori rezistenți la temperaturi ridicate și la diferiți agenți dezinfectanți se recomandă presterilizarea acestora la temperaturi uscate (în etuve), prealabil introducerii a mediului de cultură în recipiente. În continuare se va trece la o resterilizare a recipientelor cu medii, prin căldură umedă, respectiv autoclavare. Sterilizarea cu aer cald se face timp de minimum trei ore la 160 °C (deoarece există anumite forme de bacili termorezistenți). Durata expunerii sticlăriei la temperaturi ridicată depinde și de modul în care aceasta a fost spălată, dacă a fost sterilizată prin autoclavare, prealabil deschiderii flacoanelor infectate, precum și în dependență de gradul de infectare al atmosferei din laborator (fig. 2.3).

În funcție de calitatea sticlei folosite, presterilizarea trebuie realizată la o temperatură de aproximativ 180 °C. Fără această procedură, sticla se poate degrada chimic și poate contamina mediile de cultură cu compuși toxici. Pentru preîntâmpinarea infecțiilor se

recomandă, deci în primul rând o curățire corectă a sticlăriei prin menținerea aceasteea (minim patru ore) în amestec cromic [Badea E., Săndulescu D., 2001]. Spălarea sticlăriei se va efectua cu multă responsabilitate, întrucât lavarea incorectă a sticlăriei poate produce perturbări mediului de cultură.

Sterilizarea mediilor de cultură și a apei. După pregătirea mediilor de cultură, acestea trebuie sterilizate cât mai rapid prin autoclavare. Înainte de sterilizare, mediile se porționează în recipiente care se închid, de preferat cu dopuri de vată. Dacă se utilizează capace sau dopuri, acestea nu trebuie închise complet, pentru a permite pătrunderea aburului în interiorul vaselor. Recipientele trebuie să fie așezate în așa mod ca aburul să circule liber printre ele, în caz contrar, sterilizarea poate fi neuniformă. Temperatura ridicată nu este suficientă pentru distrugerea completă a microorganismelor, pe când acțiunea aburului sub presiune este esențială în distrugerea acestora.

Manipularea recipientelor sterile se va face cu multă prudență. Este interzisă prinderea recipientelor din apropierea zonei de obturare, întrucât prin mișcarea capacului sau a dopului se poate provoca un schimb de aer între mediul exterior și atmostera din vas, facilitând astfel accesibilitatea germenilor patogeni în recipientele de cultură și instalarea unor infecții secundare.

Există diferite tipuri de autoclave: electrice sau cu gaz; cu orientare verticală sau orizontală; de capacitate mare sau mică etc. În general, se recomandă autoclavarea mediilor și a apei distilate să se efectueze la temperatura de 121 °C (echivalent cu presiunea de 1 atmosferă), iar durata menținerii recipientelor cu medii în autoclavă depinde de volumul de lichid, respectiv de mediul introdus în flacoane [Lozinschii M. și al., 2013; 2015]. În general, durata minimă de autoclavare este de 15 minute, iar cea mai uzuală este de 20 minute [Cachiță-Cosma D. și al., 2000; Badea E., Săndulescu D., 2001].

Asepsizarea materialului vegetal. Proveniența materialului vegetal constituie un prim reper în alegerea modului de dezinfectare a organelor donatoare de explante. Explantele alese pentru asepsiza-

rea materialului biologic, concentrația acestora și durata dezinfectării vor fi selecționate în funcție de calitatea materialuliui biologic (frăgezimea lui și gradul de penetrare a dezinfectantului în țesuturi). De regulă, rădăcinile sau organele subterane sunt purtătoare de germeni, iar sterilizarea lor deseori ridică probleme deosebite. Mugurii, tulpinile prevăzute cu lenticele și organele cu pilozitate accentuată favorizează aderarea sporilor și a germenilor la nivelul formațiunilor epidermale sau în rugozitățile suprafeței acestora, ceea ce îngreunează semnificativ procesul de sterilizare. Dificultatea este amplificată de faptul că, în momentul imersării în soluția dezinfectantă, între epidermă și lichid se formează o peliculă de aer care împiedică contactul direct al dezinfectantului cu suprafața organelor. Pentru micșorarea tensiunii superficiale în lichidul dezinfectant se adaugă câteva picături de Tween 20 sau 80 [Cachiță-Cosma D. și al., 2000].

Natura organelor, profunzimea țesuturilor ce urmează să constituie explante, finețea tegumentelor sau a epidermei (gradul de cerificare și cutinizare a acestora) constituie tot atâția factori de care trebuie să se țină seama în momentul adoptării unei metode de dezinfectare sau a unui protocol [Cachiță-Cosma D. și al., 2000; Badea E., Săndulescu D., 2001].

Corelația dintre morfologia explantului și eficiența procesului de aseptizare. Aplicarea protocolului de sterilizare la ghiocei (*Galanthus* spp.) prin imersie în hipoclorit de sodiu 2%, pe o durată de 20 de minute, confirmă rezistența ridicată a organelor de rezervă la tratamente chimice drastice. Analiza rezultatelor practice a evidențiat următoarele aspecte fundamentale la etapa de asepsizare: rata de supraviețuire a segementelor inoculate și absența necrozelor la nivelul discului bulbar. Acesta demonstrează că timpul de expunere a fost corect calibrat, păstrând integral viabilitatea celulelor meristematice interne [Badea E., Săndulescu D., 2001].

Protocolul standard sau modificat de dezinfectare în faza critică de inițiere a culturii vizează în principal flora de suprafață și nu se înregistrează manifestări ale unor infecții endofite (bacterii sau fungi localizați intracelular).

Menținerea condițiilor de asepsie pe parcursul primelor două pasaje de multiplicare, fiecare având o durată de patru săptămâni, confirmă eficiența procesului inițial de sterilizare. Acest fapt este esențial, având în vedere că infecțiile latente devin vizibile, de regulă, abia în subculturi ulterioare (2-4 săptămâni) sub stimularea regulatorilor de creștere prezenți în mediul nutritiv.

Succesul inițierii culturilor *in vitro* este strâns legat de capacitatea de a steriliza materialul biologic fără a-i compromite viabilitatea. Permeabilitatea naturală a tegumentelor seminale, a învelișurilor florale sau a mugurilor dictează gradul de dificultate a procesului de sterilizare, iar pentru acest criteriu există o diversitate de agenți dezinfectanți capabili să asigure o rată scăzută de infecție. Totuși, se necesită menținerea unui echilibru riguros, deoarece o sterilizare prea drastică, prin concentrații ridicate sau timpi de expunere prelungiți, provoacă necroze profunde ce afectează iremediabil celulele explantate. Din această perspectivă, organele de rezervă, precum bulbii, rizomii sau tuberculii, oferă un avantaj semnificativ în procesul de lucru, deoarece protejarea țesuturilor interne este mai puțin critică, iar recoltarea explantului se realizează din straturile profunde ferite de acțiunea directă a substanțelor chimice.

O provocare majoră rămân infecțiile endofite cauzate de bacterii, virusuri sau micoplasme localizate profund în celule. Deoarece dezinfectanții de rutină asigură o sterilizare de suprafață, aceste infecții pot rămâne latente timp de câteva subculturi, devenind vizibile abia la pasajul al doilea sau al treilea, moment în care se reduce capacitatea organogenă a țesuturilor. Pentru a minimiza aceste riscuri, este imperativă necesitatea efectuării unui control fitopatologic sever asupra plantelor donatoare. În cazul specificului predispus la infecții persistente, se pot adopta măsuri speciale, precum dezinfectarea rapidă prin flambare (imersie în alcool de 96%, urmată de aprindere și plonjare imediată în apă sterilă) sau adăugarea antibioticelor în mediul de cultură pentru prima proliferare bacteriană. În final, calitatea materialului biologic inițial și precizia tehnicilor de dezinfecție, baza fundamentului unei culturi sănătoase permite o capacitate de dezvoltare viguroasă [Cachiță-Cosma D. și al.,

2000; Badea E., Săndulescu D., 2001; Lozinschii M., 2013].

✓ **Selectarea explanturilor**. Partea plantei utilizată pentru inițierea culturii de țesuturi se numește **explant** (fig. 2.13). Localizarea explantului pe plantă, faza de dezvoltare și starea fiziologică al acestuia influențează semnificativ succesul regenerării. Cel mai frecvent se utilizează explanturi care conțin primordii de lăstari, de exemplu, meristeme apicale, bulbi, muguri de noduri etc .

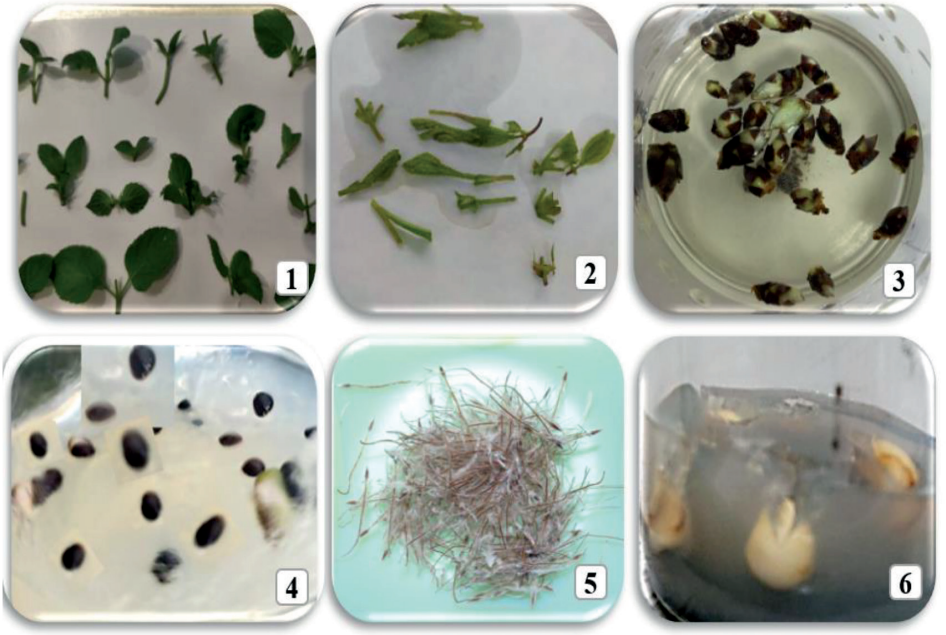


Fig. 2.13. Tipuri de explanturi:
1 – tulpini cu noduri de mentă bergamotă; **2** – tulpini cu noduri de stevie ;
3 – muguri de stejar; 4 – semințe de salvie; **5** – semințe de dediței; **6** – bulbi de lalea pestriță

Explanturile tinere, aflate în fază activă de creștere conțin țesuturi încă nediferențiate complet, cu o capacitate ridicată de reacție la regulatorii de creștere, pe când, țesuturile îmbătrânite sau lignificate își pierd treptat potențialul regenerativ. Tot în acest sens, dimensiunea explantului trebuie să fie redusă de la un centimetru până la aproximativ câțiva milimetri – pentru a facilita penetrarea agenților de sterilizare și pentru a reduce riscul de necroză sau contaminare, care crește în cazul explanturilor prea mari.

Tipul explantului reprezintă un alt factor determinant în reușita culturilor. Meristemele apicale, nodurile, internodurile și frunzele tinere sunt printre cele mai utilizate.

✓ **Inițierea culturii aseptice**. Explantul potențial (țesutul inițial provenit de la planta donatoare) constă în principal din lăstari (vârfuri, segmente nodale), frunze (segmente de limb cu nervuri, pețiol), bucăți de flori, embrioni imaturi, fragmente de hipocotil sau cotiledoane. În general, țesuturile mai tinere, cu creștere mai rapidă sau țesuturile aflate în stadiu incipient de dezvoltare sunt cele mai eficiente. Prin urmare, calitatea inițială a explanturilor va determina succesul procedurii de conservare. Criteriile pentru o bună calitate a explanturilor sunt: plante donatoare normale, viguroase și sănătoase [Brînză L., Călugăru-Spătaru T., Lozinschii M., Coropceanu E., Botezatu I., 2025].

Fragmentele de plante sunt inițiate în cultură prin diverse proceduri de sterilizare, în funcție de țesutul utilizat. Ca regulă generală, țesuturile fragile (meristeme, embrioni imaturi, cotiledoane, hipocotile) necesită o expunere mai redusă la agenții de sterilizare decât semințele sau organele lignificate.

Proceduri de asepsie și pregătirea recipientelor. În laboratorul de biotehnologie vegetală se acordă o atenție deosebită sterilizării spațiului de lucru, a instrumentelor și a mediilor de cultură, precum și utilizarea mănușilor și a echipamentelor sterile în timpul manipulării culturilor *in vitro*.

Dezinfectanți. Succesul inițierii culturilor *in vitro* este în mod direct influențat de eficacitatea dezinfectanților utilizați, aceștia trebuind să îndeplinească dublul rol de eliminare a microflorei epifite și de conservare a viabilității țesuturilor vegetale. Alegerea unor produse precum etanolul, hipocloritul de sodiu și peroxidul de hidrogen se bazează pe proprietățile lor biochimice specifice și pe modul diferențiat de acțiune asupra patogenilor (tab. 2.3).

Etanolul în concentrație de 70% este utilizat ca agent de pre-tratament datorită capacităților sale ridicate de a reduce tensiunea su-

perficială a explantului. Această etapă preliminară este esențială pentru a facilita pătrunderea ulterioară a dezinfectanților apoși în toate asperitățile morfologice ale plantei, asigurând un contact uniform și profund. Deși este un bactericid puternic, etanolul se folosește strict limitat din cauza fitotoxicității ridicate, rolul său fiind în principal de a pregăti suprafața pentru etapa principală de sterilizare chimică.

Hipocloritul de sodiu (NaOCl) este prezent în majoritatea protocoalelor de asepsizare al activității spectrului larg împotriva bacteriilor, fungilor, sporilor.

Tabelul 2.3. Dezinfectanți aplicați în cultura *in vitro*

Nr. d/o	Dezinfectant	Formula chimică	Concentrație	Timp de expunere
1.	**Etanol (alcool etilic)**	C_2H_5OH	70%	30-60 de secunde
2.	**Hipoclorit de sodiu**	NaOCl	1,0%-2,0%	10-20 de minute
3.	**Hipoclorit de calciu**	$Ca(OCl)_2$	3%-10%	5-15 minute
4.	**Clorură de mercur**	$HgCl_2$	0,01%-0,1%	2-10 minute
5.	**Nitrat de argint**	$AgNO_3$	1%	5-20 de minute
6.	**Peroxid de hidrogen**	H_2O_2	3-6%	5-15 minute
7.	**Albastru de metilen**	$C_{16}H_{18}Cl$-N_3S	0,01	20-30 minute
8.	**Permanganat de potasiu**	$KMnO_4$	0,01	20-30 minute

Argumentul principal pentru utilizarea hipocloritului de sodiu, constă în eliberarea clorului activ, care oxidează ireversibil componentele celulare ale microorganismelor. Hipocloritul poate fi relativ

ușor de eliminat prin spălări repetate, iar în cazul organelor de rezervă, precum bulbii, permite timpi de expunere mai prelungiți fără a afecta viabilitatea celulelor meristematice interne, care sunt protejate natural de straturile țesuturilor externe.

Peroxidul de hidrogen (H_2O_2) este apreciat pentru caracterul său ecologic și absența reziduurilor toxice, descompunându-se exclusiv în apă și oxigen. Acționează prin eliberarea radicalilor liberi, distrugând membranele celulare ale agenților patogeni, fiind ideal pentru sterilizarea semințelor sau a țesuturilor delicate, unde riscul de fitotoxicitate trebuie minimizat.

Nitratul de argint ($AgNO_3$) numit și „apa de argint" – ionii de argint posedă proprietăți bactericide și fungicide remarcabile, interferând cu metabolismul respirator al microorganismelor. Utilizarea lor este argumentată în cazul explantelor recalcitrante sau a unor specii care prezintă infecții persistente de suprafață, oferind o alternativă viabilă la dezinfectări pe bază de clor.

Clorura de mercur ($HgCl_2$) – reprezintă cel mai drastic agent de sterilizare, utilizat exclusiv pentru materialul lignificat sau explantele cu un grad extrem de contaminare. Deși este extrem de eficient, utilizarea sa este limitată de toxicitatea ridicată asupra operatorului și a mediului, necesitând clătiri repetate și extrem de riguroase pentru a elimina orice urmă de reziduu toxic.

Hipocloritul de calciu. Spre deosebire de hipocloritul de sodiu, această sare eliberează clorul mai lent, oferind o acțiune mai blândă asupra țesuturilor vegetale. Este utilizat frecvent pentru sterilizarea semințelor de orhidee sau a altor structuri fragile care necesită un timp de expunere prelungit fără degradarea epidermei.

Vasele de cultură pentru micropropagarea (înmulțirea *in vitro*) a plantelor sunt recipiente sterile, concepute pentru a susține creșterea țesuturilor vegetale pe medii nutritive controlate (fig. 2.14).

Pregătirea recipientelor pentru cultivare se realizează prin spălarea prealabilă a acestora și sterilizarea ulterioară (de regulă, prin autoclavare sau tratare cu dezinfectanți corespunzători), ceea ce asi-

gură prevenirea contaminării și crearea condițiilor optime pentru creșterea materialului vegetal.



Fig. 2.14. Aspectul unor vase de cultură:
1 – eprubete; **2** – borcane de sticlă; **3** – vas Erlenmeyer

Aceste vase trebuie să asigure un mediu aseptic, să permită pătrunderea luminii și să faciliteze un schimb minim de gaze. În practica micropropagării plantelor se utilizează o gamă largă de recipiente de cultură de diferite tipuri și modele:

• **Eprubete (Test Tubes)**: utilizate frecvent pentru inițierea culturilor, unde un singur fragment de plantă (explant) este plasat în mediu steril.

• **Vase Erlenmeyer**: servesc ca recipiente de cultură pentru volum mai mare de mediu sau pentru culturi de suspensii celulare, fiind de obicei închise cu dopuri de vată sau folie autoclavabilă.

• **Cutii Petri**: folosite în special pentru germinarea semințelor, cultura de calus sau pentru inducerea organogenezei pe medii solide.

• **Vase GA-7** și **recipiente pătrate** / **rotunde**: recipiente din policarbonat sau polipropilenă (cum sunt cele de la Plant Cell Technology), foarte populare, deoarece sunt autoclavabile reutilizabile și permit o vizibilitate excelentă asupra plantulelor.

• **Containere din plastic**: o opțiune economică, utilizată adesea în laboratoarele DIY sau comerciale. Sunt confecționate din polipropilenă, pot fi sterilizate și sunt ideale pentru etapa de multiplicare în masă.

• **Borcane de sticlă de diferite dimensiuni.** Rolurile principale ale borcanelor de sticlă sunt numeroase:

- ✓ *Asigurarea sterilității*, sticla borosilicată este extrem de rezistentă la temperaturi înalte, permițând autoclavarea repetată (sterilizarea aburului sub presiune) fără a se deforma sau a elibera substanțe toxice în mediul de cultură, țesuturilor vegetale (explante), mai ales în etapele în care sistemul radicular nu este încă dezvoltat.
- ✓ *Transparența superioară a sticlei* permite pătrunderea optimă a luminii necesare pentru procesele fotosintetice și reglarea hormonală a creșterii plantelor sub lumina artificială.
- ✓ *Structura ermetică* (în special atunci când sunt folosite capace cu filtre de 0,22 μm) protejează mediul nutritiv bogat în zaharuri de invazia sporilor de fungi sau a bacteriilor din exterior.

Borcanele de sticlă utilizate prezintă volume variabile, în funcție de scopul experimental.

Borcane de 150 ml prezintă un avantaj – consum minim de mediu nutritiv și regulatori de creștere. Ocupă spațiu foarte mic în camera de creștere și în autoclav. Dacă apare o contaminare, pierderea materialului vegetal este limitată la un recipient mic.

Borcane de 250 ml. Avantajul constă în echilibru optim între spațiul de creștere și volumul de mediu. Ușor de manipulat în hotă cu flux laminar. Permit o bună circulație a aerului în interior, reducând riscul de vitrificare.

Borcane de 500 ml. Sunt utilizate pentru „Etapa IV – Înrădăcinare" sau pentru specii cu creștere rapidă și de talie mare. Oferă înălțimea necesară pentru ca lăstarii să se alungească fără a putea atinge capacitatea (ceea ce poate duce la necrozarea vârfului din cauza condensului). Acestea permit dezvoltarea unui sistem radicular

bine dezvoltat. Sunt ideale pentru plantele care au rămas în borcan o mai lungă durată (6-8 săptămâni), deoarece volumul mai mare de mediu și de spațiu nu se epuizează rapid.

Borcane de 750 ml. Sunt folosite pentru pre-aclimatizare sau pentru specii forestiere / arbuști în faze avansate de creștere. Sunt de asemenea utile pentru culturile de masă (unde se introduc mulți lăstări într-un singur vas pentru eficientizarea muncii). Avantajele acestor vase cu volum mare de aer, ajută la o mai bună respirație a plantelor; la o stabilitate termică mai mare în interiorul vasului; de asmenea, sunt eficiente pentru transportul plantelor la distanțe mari înainte de aclimatizare.

Caracteristici esențiale:

- ✓ *Materialul*: sticla borosilicată este durabilă și rezistă la sterilizări repetate, în timp ce plasticul (polistiren, polipropilenă) este mai ușor alterabil din cauza acțiunii în timpul procesului de sterilizare și adesea sunt de unică folosință.
- ✓ *Capacele*: trebuie să prevină pătrunderea microorganismelor (bacterii, fungi), dar să permită un anumit grad de schimb de gaze pentru a evita acumularea de etilenă, care poate inhiba creșterea plantei.
- ✓ *Transparența*: esențială pentru a permite procesul de fotosinteză sub lumina controlată (LED sau tuburi fluorescente) din camerele de cultură.

2.4. Mediile de cultură

Mediul nutritiv este definit ca soluția nutritivă utilizată pentru a susține creșterea celulelor în cultura tisulară, care poate necesita modificări periodice pentru a menține condiții optime pentru dezvoltarea celulară [Kyte Lydiane, Kleyn John, Scoggins Holly, Bridgen Mark, 2013].

Mediile de cultură a țesuturilor vegetale furnizează apă, minerale, vitamine, regulatori de creștere, compuși organici și alți nutrienți necesari pentru creșterea și dezvoltarea ulterioară a celulelor sau

țesutului în masa nediferențiată a calusului, precum și asigură un pH dorit substratului și acționează ca un loc de depozitare a metaboliților secundari. De asemenea, acestea oferă acces la atmosferă pentru schimbul gazos [Murashige T., Skoog F.A., 1962].

Mediul nutritiv pentru plantele micropropagate este foarte important, așa cum solul este vital pentru plante. Mediul nutritiv, similar solului, furnizează nutrienți esențiali și apă, dar, suplimentar, oferă zaharuri care compensează lipsa fotosintezei și regulatori de creștere vegetală implicați în controlul proceselor de creștere și dezvoltare [Badea M. E., Săndulescu D., 2001].

Mediul nutritiv, împreună cu temperaturile ideale, niveluri optime de lumină și fotoperioade favorabile, oferă medii perfecte pentru creșterea plantelor. Mediile de cultură tisulară combină o listă lungă de minerale anorganice, zaharuri, vitamine, regulatori de creștere a plantelor și ajutor de gelificare într-un substrat conceput pentru a susține și încuraja creșterea plantelor (tab. 2.4). Formulele standard pentru mediile de cultură tisulară au fost inițial derivate din sisteme hidroponice și au fost determinate de cercetători pentru a oferi nutrienți și regulatori de creștere optimi pentru plante specifice [Cachiță-Cosma D., și al., 2000; Badea E., Săndulescu D., 2001; Kyte Lydiane, Kleyn John, Scoggins Holly, Bridgen Mark, 2013].

Tabelul 2.4. Compoziția comparată a unor medii nutritive, utilizate în practica biotehnologică [Bhojwani S. S., Razdan M. K., 1983]

Constituenți	Medii nutritive, mg/L					
	MS	**White**	**Heller**	**ER**	**B5**	**DKW**
NH_4NO_3	1650	-	-	1200	-	1410
KNO_3	1900	80	500	1900	2527,5	2550
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	440	-	75	440	150	
$CaCl_2$	-	-	-	-	166	
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	370	750	500	370	246,5	370

KH_2PO_4	170	-	125	340	-	170
$(NH_4)_2SO_4$	-	-	100	-	134	
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	-	300	500	-	-	556
$NaNO_3$	-	-	-	-	-	
Na_2SO_4	-	200	-	-	-	
$NaH_2PO_4 \cdot 4H_2O$	-	19	100	-	150	
KCl	-	65	750	-	-	
KI	0,83	0,75	1	-	-	0,83
H_3BO_3	6,2	1,5	1	0,63	-	6,2
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	22,3	5	0,1	2,23	-	22,3
$MnSO_4 \cdot H_2O$	-	-	-	-	10	
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	8,6	3	1	-	2	8,6
$ZnSO_4 \cdot 4H_2O$	-	-	-	-	-	
$ZnNa_2$-EDTA	-	-	-	15	-	
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,25	0,01	-	0,025	0,25	
MoO_3	-	0,001	-	-	-	
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,025	0,01	0,03	0,0025	0,025	
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,025	-	-	0,0025	0,025	0,025
$CoSO_4 \cdot 7H_2O$	-	-	-	-	-	
$AlCl_3$	-	-	0,03	-	-	
$NiCl_2 \cdot 6H_2O$	-	-	0,03	-	-	
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	-	-	1	-	-	
$Fe_2(SO_4)_3$	-	2,5	-	-	-	
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	27,8	-	-	27,8	-	27,8
$H_2MoO_4 \cdot 4H_20$						0,25
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	37,3	-	-	37,3	-	37,3
Fe Sequestrene 330 (fier chelat)	-	-	-	-	28	

Inozitol	100	-	-	-	100	100
Acid nicotinic	0,5	0,05	-	0,5	1	1,0
Piridoxină HCl	0,5	0,01	-	0,5	1	1,0
Tiamină HCl	0,1	0,01	-	0,5	10	1,0
Glicină	2	3	-	2	-	-
Zaharoză	3%	2%	-	4%	2%	3%

În practica biotehnologică, compoziția mediilor de cultură utilizate pentru cultivarea țesuturilor vegetale *in vitro* are o importanță deosebită, întrucât compoziția lor influențează în mod direct creșterea, dezvoltarea și morfogeneza explantelor. Compoziția unor medii de cultură utilizate în practica biotehnologică este prezentată în tabelul 2.4.

Formulele dezvoltate de Toshio Murashige și colaboratorii săi, în special cunoscut sub numele de mediu Murashige-Skoog, sunt probabil cele mai cunoscute formule standard și sunt folosite în principal pentru plantele cu frunziș erbaceu.

Mediul pentru plante lemnoase (WPM) dezvoltat de Brent McCown și Greg Lloyd sunt concepute, așa cum sugerează și numele pentru a optimiza cultura țesuturilor anumitor plante lemnoase (tab. 2.5).

Combinarea diferitelor substanțe chimice pentru mediu în care cresc culturile de plante este o artă, similară cu cea a gătitului unei mese – ingredientele și limbajul sunt diferite, iar unele dintre echipamente pot să nu fie familiare, dar rețetele (formulele) trebuie de obicei să urmeze într-o manieră precisă și ordonată. Nutrienții din medii afecteaza sănătatea, vigoarea și creșterea celulelor, țesuturilor și organelor specializate pe măsură ce plantulele se diferențiază și se dezvoltă în cultură [Cachiță-Cosma D. și al., 2000; Badea E., Săndulescu D., 2001; Palii A. și al., 2004].

Tabelul 2.5. Componenţa chimică a mediului Murashige-Skoog [Street H. E., 1977]

Macroelemente, mg/L		1/2	Microelemente, mg/L		1/2	Constituienţi organici, mg/L		1/2
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	370	185	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	27,8	13,9	Mio-inozitol	100	50
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	440	220	$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	37,3	18,65	Acid Nicotinic	0,5	0,25
KNO_3	1900	950	$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	22,3	11,15	Piridoxină HCl	0,5	0,25
NH_4NO_3	1650	825	KI	0,83	0,415	Tiamină HCl	0,1	0,05
KH_2PO_4	170	85	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,025	0,0125	Glicină	2	1
-	-		$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	8,6	4,3	Zaharoză	3%	1,5%
-	-		$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,025	0,0125	-	-	
-	-		H_3BO_3	6,2	3,1	-	-	
-	-		$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,25	0,125	-	-	

Micropropagarea transformă chimia dintr-o disciplină abstractă într-un proces viu și dinamic. Deși pregătirea mediilor de cultură poate părea o sarcină complexă, în esență aceasta reprezintă o formă de interacțiune între cercetător și nevoile fiziologice ale plantei. Indiferent dacă cercetătorul optează pentru utilizarea mediilor bazale standardizate (precum formula Murashige-Skoog) sau elaborează rețete proprii, procesul se fundamentează pe principii riguroase de nutriție minerală și fitohormonologie. Stăpânirea acestor interacțiuni chimice permite controlul fin al organogenezei, transformând rigoarea protocoalelor de laborator într-un instrument esențial pentru multiplicarea clonală de înaltă calitate.

Sistemul metric este sistemul de măsurători utilizat în știință și prin urmare, este utilizat în cultura țesuturilor. Operarea cu sistemul metric permite memorarea mai ușoară și o corelare mai reușită între diferiți termeni.

Iată câteva dintre cele importante: există 1000 de miligrame (mg) în 1 gram (g), 1000 de mililitri (ml) în 1 litru, 10 milimetri (mm) în 1 centimetru (cm) și 1000 de micrometri (μm; numiți anterior microni) în 1 mm.

O altă echivalență importantă este că 1 centimetru cub (cm^3) de apă are un volum de 1 mililitru (ml) și cântărește 1 gram (g). O altă conversie ușor de reținut este că 1% este egal cu 10 grame pe litru.

Majoritatea mediilor bazale (precum MS) tratează concentrații de ordinul miligramelor sau gramelor per litru (mg/L sau g/L).

Precizia volumetrică permite cercetătorului să ajusteze rapid osmolaritatea mediului fără erori de calcul gravimetric [Kyte Lydiane, Kleyn John, Scoggins Holly, Bridgen Mark, 2013].

Macronutrienții sunt principalii compuși minerali ai mediului nutritiv și sunt necesari plantelor în cantități relativ mari. Mediile nutritive conțin de obicei compuși ai azotului, fosforului, potasiului, calciului, magneziului și sulfului. Aceste elemente participă la formarea structurilor celulare, la sinteza proteinelor, a acizilor nucleici și a altor compuși importanți din punct de vedere biologic, asigurând creșterea, dezvoltarea și activitatea metabolică a țesuturilor vegetale în condiții de cultură *in vitro* [Cachiță-Cosma D. și al., 2000].

Azotul (N) influențează rata de creștere a plantelor și este prezent în cel mai mare procent dintre toate elementele esențiale – 1-4%. Este un element esențial în alcătuirea moleculară a acizilor nucleici, proteinelor, clorofilei, aminoacizilor, alcaloizilor și unor regulatori de creștere a plantelor. Deoarece azotul este foarte mobil în cadrul plantei, o deficiență este caracterizată mai întâi prin frunze uniform clorotice urmată de o creștere încetinită. Excesul de azot promovează o creștere viguroasă, dar poate suprima dezvoltarea florilor și a fructelor. Surse comune de azot pentru mediile de cultură de țesuturi sunt compușii de amoniu (NH_4) și nitrați (NO_3).

Fosforul (P) este prezent în cantități importante în țesuturile meristematice și în alte țesuturi cu creștere activă. Fiind component al moleculelor de ADN, ARN și ATP (adenozin trifosfat), fosforul

are un rol esențial în procesele de transfer energetic, fotosinteză, respirație celulară, diviziune celulară, maturarea plantelor și dezvoltarea sistemului radicular. Deși fosforul este un element mobil în interiorul plantei, simptomele deficienței pot fi uneori dificil de observat în fazele inițiale. Deficitul de fosfor se poate manifesta prin încetinirea creșterii, dezvoltarea slabă a rădăcinilor și apariția unei colorații roșiatice-violet a frunzelor, determinată de acumularea antocianilor. În mediile de cultură a țesuturilor vegetale, fosforul este introdus frecvent sub formă de săruri fosfatice, precum fosfatul monopotasic (KH_2PO_4) și fosfatul monosodic monohidrat ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$).

Potasiul (K) este un macroelement esențial pentru creșterea și dezvoltarea plantelor, fiind necesar pentru diviziunea celulară normală și pentru activitatea țesuturilor meristematice. Acesta participă la numeroase procese fiziologice, deși nu intră direct în structura compușilor organici principali, precum proteinele, lipidele sau carbohidrații. Potasiul are rol important în activarea enzimelor, reglarea echilibrului osmotic, sinteza carbohidraților și proteinelor, formarea clorofilei și reducerea nitraților.

Deficiența de potasiu poate determina dezvoltarea unor plantule slabe, cu creștere anormală, iar simptomele apar frecvent pe frunzele mai bătrâne, deoarece potasiul este mobil în plantă. Aceste simptome pot include îngălbenirea, pătarea, ondularea sau necrozarea marginilor frunzelor. În mediile de cultură a țesuturilor vegetale, potasiul este furnizat frecvent sub formă de azotat de potasiu (KNO_3) și fosfat monopotasic (KH_2PO_4), iar clorura de potasiu (KCl) poate fi utilizată ocazional.

Calciul (Ca) este un macroelement esențial pentru creșterea și dezvoltarea plantelor, având un rol important în menținerea integrității pereților celulari și a membranelor celulare. În pereții celulari, calciul se găsește sub formă de pectat de calciu, contribuind la legarea moleculelor de pectină și la coeziunea dintre celule. Prin acest rol structural, calciul influențează fermitatea țesuturilor, stabilitatea pereților celulari și rezistența mecanică a plantelor.

Calciul participă, de asemenea, la reglarea permeabilității membranelor, la diviziunea și elongarea celulară, la dezvoltarea vârfurilor de creștere și a sistemului radicular, precum și la unele procese enzimatice și metabolice. De asemenea, este implicat în asimilarea azotului și în menținerea echilibrului ionic la nivel celular. Sub formă de oxalat de calciu, poate contribui la neutralizarea acidului oxalic, un produs metabolic care, în concentrații ridicate, poate avea efect toxic asupra celulelor.

Calciul are mobilitate redusă în plantă, fiind transportat în principal prin xilem, împreună cu fluxul de apă determinat de transpirație. Din acest motiv, simptomele deficienței apar mai ales în țesuturile tinere și în zonele cu creștere activă, cum ar fi vârfurile lăstarilor și ale rădăcinilor. Deficiența de calciu poate determina deformarea, brunificarea sau necrozarea vârfurilor de creștere, dezvoltarea slabă a rădăcinilor, fragilitatea țesuturilor și apariția unor plantule anormale.

În mediile de cultură a țesuturilor vegetale, calciul este introdus frecvent sub formă de clorură de calciu dihidratată ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$). Alte surse utilizate pot fi nitratul de calciu tetrahidratat [$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$] sau, mai rar, fosfatul tricalcic [$Ca_3(PO_4)_2$]. Deoarece ionii de calciu pot forma precipitate în combinație cu fosfații sau sulfații, prepararea soluțiilor stoc trebuie realizată atent, iar sărurile de calciu sunt de obicei păstrate separat de sărurile care pot provoca precipitare. Din acest motiv, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ este una dintre cele mai utilizate surse de calciu în mediile de cultură *in vitro*.

Magneziul (Mg) este elementul central în moleculele de clorofilă. De asemenea, este important ca activator enzimatic. Magneziul este un element mobil în cadrul plantei și poate fi translocat către noile creșteri. Frunzele mai vechi vor prezenta cloroză intervenală. Majoritatea formulelor de cultură tisulară necesită sulfat de magneziu ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), cunoscut și sub numele de săruri Epsom.

Sulful (S) este prezent în unele proteine. Acesta promovează dezvoltarea sistemului radicular și frunzișul verde închis. Sulful este oarecum mobil în plante, iar o deficiență duce la îngălbenirea gene-

rală a plantei. Carențele sunt rare, însă, deoarece sulful este furnizat în mediile de cultură tisulară împreună cu alte elemente sub formă de diverși compuși sulfat (SO_4^{2-}).

Micronutrienții. Pe lângă macroelementele necesare în cantități mai mari, plantele au nevoie și de o serie de elemente minerale esențiale, dar în concentrații foarte reduse. Acestea sunt numite microelemente, micronutrienți sau oligoelemente. Deși sunt necesare în cantități mici, ele au un rol major în creșterea și dezvoltarea plantelor, participând la activarea enzimelor, sinteza clorofilei, procesele de oxidoreducere, diviziunea celulară și reglarea metabolismului vegetal.

În cultura țesuturilor vegetale, importanța micronutrienților a devenit mai evidentă odată cu utilizarea apei și a substanțelor chimice cu grad înalt de puritate. În trecut, unele microelemente puteau fi prezente accidental în medii, sub formă de impurități din apă, săruri minerale sau alte componente chimice. Pe măsură ce aceste materiale au devenit mai pure, aceste impurități au fost eliminate, iar lipsa anumitor elemente a dus la apariția simptomelor de deficiență în culturile *in vitro*. Astfel s-a demonstrat că microelementele, chiar dacă sunt necesare în cantități foarte mici, sunt indispensabile pentru dezvoltarea normală a plantelor.

Microelementele sunt prezente în mod natural în sol, apă și organismele vii, însă în condiții *in vitro* ele trebuie introduse controlat în mediul nutritiv. Cele mai importante micronutrienți utilizați în mediile de cultură sunt fierul (Fe), manganul (Mn), zincul (Zn), borul (B), cuprul (Cu), molibdenul (Mo), cobaltul (Co), iodul (I), nichelul (Ni) și, în unele formulări, alte elemente în concentrații foarte reduse.

Borul (B) este un micronutrient esențial pentru plante, având rol în transportul zaharurilor, diviziunea celulară, formarea pereților celulari, dezvoltarea meristemelor și procesele de fructificare. De asemenea, participă la metabolismul azotului și la dezvoltarea normală a organelor tinere. Deficiența de bor se manifestă diferit în funcție de specie, dar apare de obicei la țesuturile tinere, deoarece

borul are mobilitate redusă în plantă. Simptomele pot include oprirea creșterii, deformarea sau moartea vârfurilor, frunze groase, fragile, ondulate sau clorotice. La sfecla de zahăr poate apărea „putregaiul inimii", la țelină – frângerea tulpinii, iar la măslin – deformarea fructelor, cunoscută ca „față de maimuță". Excesul de bor este toxic și poate provoca arsuri, necroze sau moartea plantelor. În mediile de cultură *in vitro*, borul se adaugă în cantități mici, de obicei sub formă de acid ortoboric (H_3BO_3).

Clorul (Cl) ajută la stimularea fotosintezei și pare a fi necesar pentru creșterea plantelor. Simptomele deficienței includ frunze ofilite, care devin îngălbenite sau bronzate și, ulterior, mor. Plantele au nevoie de clor doar în cantități foarte mici, însă acesta este inclus în unele medii de cultură tisulară în cantități mai mari, sub formă de clorură de calciu ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$). Aceste cantități par a fi tolerate de majoritatea plantelor, dar unii cercetători recomandă prudență atunci când sunt incluși compuși ai clorului în anumite formule, sugerând obținerea calciului din alte surse decât clorura de calciu [Cachiță-Cosma D. și al., 2000].

Deficiența de **cupru (Cu)** duce la încetinirea creșterii plantulelor, apariția malformațiilor, răsucirea și pătarea frunzelor sau ofilirea lăstarilor tineri. Este cunoscut faptul că cuprul este necesar în procesele de conversie a energiei, deoarece poate alterna între starea cuproasă, monovalentă, și starea cuprică, divalentă. De asemenea, este implicat în sinteza clorofilei și intră în componența unor enzime. Pentru furnizarea cuprului necesar în cultura de țesuturi, la majoritatea plantelor se utilizează aproximativ 0,025 mg de sulfat cupric ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) per litru de mediu.

Fierul (Fe) este implicat în sinteza clorofilei și participă la procesele de conversie a energiei în fotosinteză și respirație, deoarece poate trece de la starea ferică, trivalentă, la cea feroasă, bivalentă. Deoarece fierul este imobil și nu poate fi translocat din frunzele mai vechi, plantele cu deficit de fier prezintă îngălbenirea frunzelor tinere, în special între nervuri, fenomen numit cloroză intervenală. La monocotiledonate, acest simptom poate da frunzelor un aspect dungat.

În mediile de cultură tisulară, sulfatul feros ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) este adesea amestecat cu sarea de sodiu a acidului etilendiaminotetraacetic (Na_2EDTA; $C_{10}H_{16}N_2O_8Na_2 \cdot H_2O$) pentru a sechestra fierul (chelare), făcându-l astfel mai ușor disponibil plantelor. Când se prepară soluții stoc pentru mediile de cultură tisulară, fierul se prepară de obicei ca stoc separat datorită tendinței sale de a precipita din soluție. Sunt necesare grijă și atenție atunci când se prepară soluții stoc de fier.

Deficiența de **mangan (Mn)** este caracterizată prin îngălbenirea pătată a frunzelor. Acest mineral este un element esențial pentru funcționarea cloroplastelor și participă la procesele de fotosinteză. În mediile de cultură a țesuturilor, manganul necesar este furnizat de obicei sub formă de sulfat de mangan ($MnSO_4 \cdot H_2O$).

Molibdenul (Mo) contribuie la transformarea azotului în forme asimilabile de către plante și este implicat în fixarea azotului. Este necesar pentru creșterea normală și sinteza proteinelor. Deficiența de molibden poate fi suspectată atunci când frunzele se îngălbenesc între nervuri. Lipsa molibdenului poate provoca afecțiunea numită „coadă de bici", caracterizată prin frunze înguste, la conopidă (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) sau poate îngreuna creșterea leguminoaselor din familia Fabaceae.

Molibdenul este mai disponibil pentru plante în solurile alcaline decât în cele acide. În mediile de cultură a țesuturilor, acesta se adaugă sub formă de molibdat de sodiu ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$), cunoscut și ca sare de sodiu a acidului molibdic. Cantitățile care depășesc 10 părți per milion pot fi dăunătoare plantelor.

Zincul (Zn) este un activator enzimatic implicat în formarea clorofilei, precum și în producerea auxinei, respectiv a acidului indol-3-acetic (AIA). În lipsa zincului, rădăcinile pot avea o dezvoltare anormală, iar frunzele pot deveni pătate, bronzate, galbene sau deformate. În mediile de cultură tisulară, zincul este inclus în cantități foarte mici, de obicei sub formă de sulfat de zinc ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$). Cantitățile mari de zinc sunt toxice pentru plante.

Iodul (I) este adesea adăugat în mediile de cultură sub formă

de iodură de potasiu (KI). De obicei, nu este considerat un element esențial pentru plante, deși poate fi prezent în unii compuși organici. Iodul pare să aibă un efect nefavorabil asupra culturilor de rododendron, de aceea se recomandă omiterea lui din mediile destinate acestei specii.

Cobaltul (Co) este un element prezent în molecula complexă a vitaminei B_{12} și are rol important în fixarea azotului, proces realizat cu ajutorul bacteriilor fixatoare de azot. Acesta contribuie la conversia azotului atmosferic în forme asimilabile de către plante. În mediile de cultură tisulară, cobaltul este adăugat, de obicei, sub formă de clorură de cobalt ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$), în cantități foarte mici, aproximativ 0,025 mg/L [Cachiță-Cosma D. și al., 2000].

Substanțe chimice organice. În biologie, unele dintre cele mai importante molecule sunt moleculele organice. Acestea conțin cel puțin un atom de carbon, legat de un alt atom de carbon sau de un atom de hidrogen. Exemple de compuși organici sunt carbohidrații, regulatorii de creștere, proteinele și enzimele.

Compușii organici pot fi gaze, lichide sau solide, de obicei cu puncte de topire relativ scăzute, sub 680°F (360°C). Mulți dintre aceștia sunt puțin solubili în apă și nu conduc electricitatea în soluție apoasă. Majoritatea compușilor organici pot arde și, de regulă, reacționează mai lent decât compușii anorganici.

Plantele își produc în mod normal propriii compuși organici. Cu toate acestea, în cultura *in vitro*, plantulele nu pot sintetiza întotdeauna toate substanțele organice necesare pentru creștere și dezvoltare normală. De aceea, anumite substanțe organice sunt adăugate în mediile de cultură a țesuturilor, pentru a completa rezervele proprii ale plantulelor și pentru a susține dezvoltarea acestora [Cachiță-Cosma D. și al., 2000; Badea E., Săndulescu D., 2001].

Carbohidrații includ substanțe organice precum zaharurile, amidonul și celuloza. În cantități și configurații variate, carbonul (C), hidrogenul (H) și oxigenul (O) sunt elementele principale care alcătuiesc moleculele carbohidraților. Aceste elemente sunt furnizate

din abundență sub formă de dioxid de carbon din aer și apă [Cachiță-Cosma D. și al., 2000].

Zaharoza ($C_{12}H_{22}O_{11}$) este un dizaharid și reprezintă unul dintre cei mai comuni carbohidrați întâlniți în țesuturile vegetale, fiind și sursa de carbon preferată pentru prepararea mediilor de cultură. Zaharoza este formată din două monozaharide legate chimic: fructoza ($C_6H_{12}O_6$) și glucoza ($C_6H_{12}O_6$) [Cachiță-Cosma D. și al., 2000] și este un produs indirect al fotosintezei. Plantele crescute în cultură *in vitro* nu pot produce întotdeauna întreaga cantitate de zahăr necesară pentru creștere, de aceea frecvent în mediile nutritive se adaugă zaharoză. Pentru majoritatea formulelor de mediu se recomandă, în general, o concentrație de 30 g/L, adică 3%, iar 20 g/L, adică 2%, este a doua concentrație frecvent recomandată [Murashige T., Skoog F. A., 1962]. Pentru stimularea androgenezei, mediul nutritiv poate fi suplimentat cu o concentrație mai ridicată de zaharoză, de 12-18% [Badea E., Săndulescu D., 2001].

Regulatorii de creștere ai plantelor, sau fitohormonii, nu sunt nutrienți, ci substanțe chimice care influențează creșterea și dezvoltarea plantelor sau a anumitor organe ale acestora. Mulți dintre aceștia sunt regulatori endogeni, produși în mod natural de plante. Totuși, plantele cultivate *in vitro* nu produc întotdeauna cantități suficiente de regulatori de creștere, de aceea aceștia trebuie adăugați selectiv în mediile de cultură.

Auxinele, citokininele, giberelinele, acidul abscisic (ABA) și etilena se numără printre principalele substanțe utilizate ca regulatori de creștere. Dintre acestea, auxinele și citokininele sunt folosite cel mai frecvent în mediile de cultură [George E.F., Hall M.A., Klerk G.J.D, 2007]. În general, auxinele stimulează alungirea celulelor și inițierea rădăcinilor, în timp ce citokininele contribuie la diviziunea celulară și inițierea lăstarilor (tab. 2.6).

Există numeroase interacțiuni între auxine și citokinine. Raportul dintre auxină și citokinină este modificat în condiții *in vitro* pentru a influența formarea lăstarilor și a rădăcinilor. Aceste două

grupe de fitoregulatori interacționează și cu alte substanțe chimice, fiind influențate de factori de mediu precum lumina și temperatura. În anumite condiții, efectele lor pot varia în funcție de specie, soi, tipul de explant și compoziția mediului nutritiv. De aceea, este important ca mediile de cultură tisulară să conțină tipurile potrivite de regulatori de creștere și raportul adecvat pentru fiecare specie sau varietate cultivată.

Auxinele sunt fitoregulatori de creștere care influențează alungirea celulelor, inițierea rădăcinilor și formarea mugurilor adventivi. Acestea induc dominanța apicală și pot suprima inițierea mugurilor laterali.

Tabelul 2.6. Regulatorii de creștere utilizați în culturi vegetale *in vitro*

Grupul regulatorilor de creștere	Fitohormon	Funcția principală	Solubilitatea
Auxine	Acid indol-3-acetic (AIA)	Inducerea formării rădăcinilor, alungirea celulelor	Parțial solubil]n ap[ușor solubil în alcool
	Acid indol-3-butiric (AIB)	Stimularea rizogenezei, stabilizarea rădăcinilor	Partial solubil în apă ușor solubil în alcool
	Acid naftalenacetic (ANA)	Inducerea rădăcinilor și calusului	Insolubil în apă, solubil ușor în acetonă și eteri
	2,4-D (Acid 2,4-diclorfenoxiacetic)	Inducerea calusului, embriogeneză somatică	Insolubil în apă, solubil ușor în acetonă și eteri
Citokinine	Benziladenină (BA)	Stimularea formării lăstarilor, inhibarea rizogenezei	Solubil în NaOH diluat sau HCl
	Kinetină (KIN)	Stimularea diviziunii celulare și a lăstarilor	Solubil în NaOH diluat sau HCl

	Thidiazuron (TDZ)	Stimulează formarea lăstarilor și regenerarea adventivă.	Solubil în apă
	Meta-Topolin (mT)	Stimulează diviziunea celulară, formarea lăstarilor și creșterea generală a plantelor.	Solubil în NaOH diluat sau HCl
	2IP	Stimulează diviziunea celulară și proliferarea lăstarilor.	Solubil în NaOH diluat sau HCl
	Zeatină	Inducerea și creșterea lăstarilor, mai ales la speciile sensibile	Solubil în NaOH diluat sau HCl
Gibereline	Acid giberelic (GA_3)	Stimularea alungirii tulpinilor și germinarea semințelor	Solubil în etanol sau NaOH diluat
Inhibitori de creștere	Acid abscisic (ABA)	Inducerea maturării embrionilor și crește rezistența la stres	Solubil în etanol sau NaOH diluat
Alți regulatori	Jasmonat / Metil jasmonat	Inducerea apărării și a producerii de metaboliți secundari	Solubil în etanol
	Brassinosteroizi	Reglarea creșterii și dezvoltării plantelor	Solubili în etanol

Auxinele sunt utilizate frecvent în mediile de cultură tisulară, fie în combinație cu citokininele în etapa de multiplicare, Etapa II, fie fără citokinine în etapa de înrădăcinare, Etapa III. De asemenea, auxinele sunt utilizate în procesele de embriogeneză somatică.

AIA (acid indol-3-acetic; $C_{10}H_9NO_2$) apare în mod natural în plante. Este cunoscut în practica înmulțirii plantelor pentru rolul său în stimularea înrădăcinării butașilor și este utilizat frecvent și pentru înrădăcinare în mediile de cultură tisulară. AIA este instabil la lumină, de aceea trebuie depozitat la întuneric.

AIB (acid indol-3-butiric; $C_{12}H_{13}NO_2$) este un alt hormon de înrădăcinare utilizat frecvent în propagarea plantelor. Acesta poate fi produs atât în mod natural în plante, cât și sintetic. Fiind mai stabil decât AIA, AIB este adesea preferat pentru inducerea rădăcinilor în cultura de țesuturi.

ANA (acid 1-naftalenacetic; $C_{12}H_{10}O_2$) este un compus sintetic de tip auxinic, utilizat uneori în mediile de cultură pentru inducerea rădăcinilor și, în special, pentru stimularea formării și creșterii calusului.

2,4-D (acid 2,4-diclorofenoxiacetic; $C_8H_6Cl_2O_3$) este o auxină sintetică, cunoscută în principal ca erbicid. În cultura țesuturilor vegetale, 2,4-D a fost utilizat pe scară largă pentru inducerea și creșterea calusului.

Citokininele sunt regulatori de creștere necesari în mediile de cultură tisulară pentru diviziunea celulară, multiplicarea lăstarilor și proliferarea mugurilor axilari. Acestea contribuie la întârzierea senescenței, adică a îmbătrânirii țesuturilor, și pot influența transportul auxinelor. Dacă plantulele sunt prea subțiri, creșterea concentrației de citokinină poate favoriza formarea unor tulpini mai scurte și mai groase.

Citokininele se dizolvă, de obicei, în 1 M acid clorhidric (HCl). În etapa de înrădăcinare, Stadiul III, acestea sunt, de regulă, omise din mediile de cultură. Totuși, pot apărea efecte reziduale din Stadiul II, precum reducerea înrădăcinării și a supraviețuirii plantulelor [Kane et al., 2008], dar și creșterea ramificării atunci când plantele sunt cultivate *ex vitro*, după Stadiul IV.

BA (6-benziladenină; $C_{12}H_9N_5$) și **BAP** (6-benzilaminopurină; $C_{12}H_{11}N_5$) sunt utilizate în mediile de cultură pentru a promova creșterea mugurilor axilari. Acești regulatori sintetici de creștere sunt cel mai frecvent utilizate citokinine. 6-benzilaminopurina ribozidă ($C_{17}H_{19}N_5O_4$) poate fi folosită ca alternativă la BA.

Meta-topolina (mT – 6-(3-hidroxibenzilaminopurină); $C_{12}H_{11}N_5O$) este o citokinină aromatică naturală, utilizată ca regulator de

creștere vegetală. Aceasta este apreciată pentru stimularea eficientă a multiplicării lăstarilor și pentru favorizarea înrădăcinării în cultura de țesuturi. Spre deosebire de citokininele clasice, mT poate reduce inhibarea formării rădăcinilor și poate îmbunătăți aclimatizarea plantelor, fiind utilă în micropropagare.

Meta-topolina este utilizată la diferite grupe de plante, inclusiv orhidee, plante medicinale și aromatice, precum și specii lemnoase, cum ar fi mărul. Aceasta a fost izolată inițial din frunze de plop [Vrundha C.P.K. și al., 2021].

2iP (6-(**γ**,**γ**-dimetilalilamino) purină; $C_{10}H_{13}N_5$) este utilizat frecvent în mediile de cultură a țesuturilor vegetale. Acesta are rol important în diviziunea celulară, respectiv în citochineză, și în dezvoltarea plantelor. La unele specii, precum azaleele, rododendronii (*Rhododendron*) și dafinul de munte (*Kalmia latifolia*), 2iP poate fi mai eficient decât BA. Este produs sintetic, dar a fost identificat și în ARN, precum și la bacteria patogenă *Corynebacterium fascians.* La unele plante superioare poate provoca diviziune celulară rapidă și, ca urmare, creștere neregulată.

Kinetina, KIN (6-furfurilaminopurină; $C_{10}H_9N_5O$) induce diviziunea celulară atunci când este prezentă împreună cu o auxină. Este utilizată frecvent în mediile de cultură a țesuturilor vegetale pentru stimularea formării calusului și proliferarea lăstarilor.

Zeatina [6-(4-hidroxi-3-metilbut-2-enilamino) purină; $C_{10}H_{13}N_5O$] a fost descoperită pentru prima dată în endospermul semințelor de porumb. Este o citokinină naturală și poate fi utilizată în mediile de cultură ca alternativă la 2iP sau BA.

Tidiazuronul (TDZ – 1-fenil-3-(1,2,3-tidiazol-5-il)uree) se numără printre cele mai active substanțe cu efect asemănător citokininelor, utilizate în cultura țesuturilor vegetale, în special la speciile lemnoase. Acesta facilitează micropropagarea multor specii lemnoase recalcitrante. Concentrații foarte scăzute, sub 1 μM, pot induce o proliferare axilară mai intensă decât multe alte citokinine; totuși, TDZ poate inhiba alungirea lăstarilor.

Giberelinele sunt un grup de substanțe naturale care influențează mărirea celulelor și alungirea tulpinii. În anul 1926, Kurosawa a observat că secrețiile ciupercii *Gibberella fujikuroi* determinau o creștere anormal de rapidă a răsadurilor de orez (*Oryza*). Substanța responsabilă era acidul giberelic (GA_3; $C_{19}H_{22}O_6$), care a fost ulterior izolat în stare cristalină atât din ciuperci, cât și din plante superioare. Au fost identificate chimic mai multe gibereline. Unele dintre ele apar în embrioni, unde inițiază producerea enzimei alfa-amilază, care transformă amidonul în zaharuri și stimulează activitatea altor enzime. GA_3 este uneori utilizat ca regulator de creștere pentru a completa efectul auxinelor și citokininelor, în special atunci când se urmărește alungirea plantulelor [Kurosawa E., 1926].

Tabelul 2.7 demonstrează că succesul micropropagării este determinat de calibrarea fină a regulatorilor de creștere, în funcție de genotip, stadiul ontogenetic al plantei și obiectivul morfogenetic urmărit: multiplicare sau maturare.

Datele sistematizate în tabelul 2.7 evidențiază plasticitatea fiziologică a speciilor luate în studiu și importanța echilibrului hormonal în controlul etapelor de micropropagare. Analiza acestor protocoale relevă câteva aspecte fundamentale:

Tabelul 2.7. Protocoale de utilizare a regulatorilor de creștere în multiplicarea și înrădăcinarea *in vitro* a unor specii horticole și medicinale

Nr. d/o	Specie	Regulator de creștere	Etapa de cultură	Concentrație recomandată, mg/L	Rol fiziologic și observații
1.	**Aronia** (*Aronia melanocarpa*)	**BAP TDZ**	Înmulțire	0,3-1,0	Stimulează proliferarea lăstarilor axilari și adventivi
		AIB AIA ANA	Înrădăcinare	0,5-1,0	Induce formarea unui sistem radicular viguros

2.	**Stevia** *(Stevia rebaudiana)*	**BA 2IP TDZ**	Înmulțire	0,1-0,3	Induce regenerarea lăstarilor; dozele mari pot cauza vitrificare
		AIB AIA ANA	Înrădăcinare	0,1-0,2	Favorizează inițierea rădăcinilor fine și aclimatizarea
3.	**Mentha** *(Mentha citrata* Ehrh.)	**BA TDZ**	Înmulțire	0,1-0,5	Accelerează diviziunea celulară și formarea de noi muguri
		AIB AIA ANA	Înrădăcinare	0,1-0,2	Susține dezvoltarea radiculară fără a inhiba tulpina
4.	**Mur** *(Rubus fructicosus* L.)	**BA TDZ**	Înmulțire	0,3-1,0	Stimulează formarea lăstarilor din muguri axilari
		AIB AIA ANA	Înrădăcinare	0,1-0,3	Induce formarea rădăcinilor Contribuie la dezvoltarea lastarului
5.	**Zmeur** *(Rubus idaeus* L.)	**BA TDZ**	Înmulțire	0,3-0,7	Stimulează formarea lăstarilor din muguri axilari
		AIB AIA ANA	Înrădăcinare	0,1-0,3	Induce formarea rădăcinilor în mediu semi-solid
6.	**Ghiocel** (*Galanthus spp.*)	**BA 2IP**	Înmulțire	0,5-2,0	Formarea bulbuților adventivi
		AIB AIA ANA	Înrădăcinare	0,5	

✓ Specificitatea citokininelor în etapa de proliferare. Se observă că, pentru speciile semilemnoase, precum aronia, murul și zmeurul, citokininele de tip BA/BAP și TDZ sunt utilizate în concentrații moderate, de 0,3-1,0 mg/L, pentru a contracara dominanța apicală și a stimula proliferarea lăstarilor. Utilizarea TDZ în doze mici, de 0,1-0,5 mg/L, la *Mentha* și *Rubus* subliniază potența ridicată a acestei citokinine de tip feniluree, capabilă să inducă o rată superioară de multiplicare chiar și la concentrații reduse.

✓ Dinamica rizogenezei sub influența auxinelor. În etapa de înrădăcinare se constată o reducere semnificativă a concentrațiilor hormonale, acestea situându-se, de regulă, între 0,1 și 1,0 mg/L. Utilizarea auxinelor AIB și ANA reflectă necesitatea stimulării diviziunilor celulare implicate în inițierea rădăcinilor adventive. În cazul speciei Stevia rebaudiana, concentrația minimă de auxină, de 0,1 mg/L, este importantă pentru evitarea calusării excesive, care ar putea afecta formarea unei conexiuni vasculare funcționale între lăstar și sistemul radicular.

Particularități fiziologice la speciile cu organe de depozitare. Un caz aparte este reprezentat de *Galanthus* spp. – ghiocelul – unde protocolul hormonal nu vizează doar morfogeneza, ci și maturarea organelor de rezervă. Spre deosebire de speciile de arbuști fructiferi, la care auxinele sunt utilizate în special pentru rizogeneză, la ghiocel, ANA poate acționa sinergic cu stresul osmotic indus de zaharoză, la concentrații de aproximativ 60 g/L, facilitând acumularea carbohidraților și creșterea în diametru a bulbului.

Riscuri morfo-fiziologice. Mențiunea privind riscul de vitrificare, adică apariția țesuturilor cu aspect sticlos, la stevia în prezența dozelor ridicate de citokinine subliniază necesitatea monitorizării riguroase a balanței hormonale. Un exces de citokinine poate perturba dezvoltarea normală a țesuturilor, sinteza ligninei și metabolismul apei în vasele de cultură.

Agenți gelifianți. Sursa agentului de solidificare poate fi importantă și poate influența tipul de răspuns al culturii. Agenții gelifianți diferă în funcție de origine – alge, bacterii sau plante – cantitatea utilizată per litru, cost, caracteristici fizice, precum punctul de topire

și claritatea, comoditatea utilizării și efectele asupra creșterii și dezvoltării culturilor.

Uneori, mediile sunt preparate fără agent gelifiant, rezultând medii lichide, care pot fi mai favorabile pentru creșterea unor plante micropropagate, precum crinul Inca *(Alstroemeria*), zmeurul, murul sau aronia. Multe culturi în medii lichide trebuie plasate pe o masă rotativă sau pe un agitator, pentru a preveni scufundarea și sufocarea plantulelor. Totuși, plantulele care nu sunt complet scufundate pot crește bine și fără agitarea mediului.

Agarul, cunoscut și sub denumirea de agar-agar sau gumă de agar, este un amestec de polizaharide obținut din extracte ale unor specii de alge roșii. În mediile de cultură tisulară, agarul acționează ca agent gelifiant, fiind suficient de ferm pentru a susține cultura, dar suficient de permeabil pentru a permite difuzia aerului și a nutrienților către plantule.

Agarul nu reacționează, în general, cu componentele mediului și nu este digerat de enzimele plantelor. Deși este considerat un material relativ inert, agarul utilizat în cultura tisulară poate conține urme de alte elemente. Deoarece nu este complet definit chimic, orice mediu care conține agar natural, spre deosebire de agarul sintetic, trebuie considerat un mediu parțial definit. Concentrația impurităților din agar poate varia în funcție de sursă și gradul de puritate.

De obicei, 6-8 g de agar per litru de mediu sunt suficiente, însă rezistența gelului poate varia în funcție de formula mediului, sursa și calitatea agarului. Gelul trebuie să fie suficient de ferm pentru ca mediul din eprubete să mențină o înclinare uniformă, dar și suficient de moale pentru ca materialul vegetal să poată fi presat ușor, asigurând un contact bun cu suprafața agarului.

Mediile cu un conținut scăzut de săruri sau regulatori de creștere tind să formeze geluri mai ferme decât cele cu un conținut ridicat de săruri și fitoregulatori. De asemenea, mediile cu pH scăzut, în jur de 4,5, tind să fie mai moi sau chiar lichide, comparativ cu mediile cu pH mai ridicat, de aproximativ 5,7.

În funcție de specie, rezistența gelului poate influența performanța plantelor. Un agar prea dur poate încetini difuzia nutrienților prin mediu, iar un agar prea moale poate favoriza vitrificarea, cunoscută și ca hiperhidratare.

Guma gellan – denumiri comerciale Gelrite, Gelzan, AppliedGel, Phytagel – este un substitut al agarului, fiind un heteropolizaharid anionic foarte rafinat, alcătuit din mai multe tipuri de monozaharide. Mediul preparat cu gumă gellan formează, după autoclavizare și solidificare, un gel foarte transparent.

O diferență importantă față de agar este că pentru obținerea unei consistențe echivalente este necesară o cantitate mai mică de gumă gellan, de obicei aproximativ 2,5 g/L. Din punct de vedere practic, la prepararea mediului, soluția apoasă trebuie să fie rece pentru ca guma să se disperseze și să se dizolve corespunzător. De asemenea, pentru solidificarea mediului este necesară prezența cationilor divalenți, precum calciul (Ca^{2+}) și magneziul (Mg^{2+}). Textura și calitatea finală a mediului sunt influențate de concentrația și tipul cationilor divalenți prezenți în formulă.

Prepararea mediilor nutritive. Succesul culturilor *in vitro* este determinat, în mod fundamental, de respectarea strictă a protocoalelor de laborator în etapa de preparare a mediilor nutritive. Această procedură necesită o abordare sistematică și o cunoaștere aprofundată a proprietăților reactivilor, deoarece erorile de dozare sau de manipulare pot compromite iremediabil viabilitatea explantelor [Cachiță-Cosma D. și al., 2000; Badea E., Săndulescu D., 2001].

Familiarizarea cu utilizarea echipamentelor de precizie și dezvoltarea unei rigori metodologice permit cercetătorului să transforme suportul nutritiv dintr-un simplu substrat într-un instrument activ de control al morfogenezei [Cachiță-Cosma D. și al., 2000; Kyte Lydiane și al., 2013].

Un parametru critic în performanța culturii este reprezentat de concentrația totală a sărurilor minerale, cu accent deosebit pe balanța formelor de azot. Deși mediul Murashige-Skoog constituie un stan-

dard larg utilizat datorită conținutului său bogat în nutrienți, literatura de specialitate indică faptul că nivelurile ridicate de amoniu (NH_4^+) pot exercita efecte importante asupra dezvoltării anumitor taxoni. Pentru speciile sensibile, precum *Pseudotsuga menziesii*, *Rhododendron* sau *Arabidopsis*, poate fi necesară reducerea concentrației de azotat de amoniu și de azotat de potasiu (KNO_3) până la o pătrime (1/4) din doza standard.

Eficacitatea acestui suport mineral poate fi sporită prin includerea unui complex specific de componente organice, esențiale pentru stabilitatea fiziologică a țesuturilor. Mio-inozitolul (100,0 mg/L) este utilizat pentru rolul său important în biogeneza peretelui celular și în procesele de semnalizare intracelulară, facilitând răspunsul rapid al celulelor la stimulii hormonali [Kyte Lydiane și al., 2013].

Glicina și prepararea mediilor din soluții stoc. Glicina (2,0 mg/L) este un aminoacid cu rol de sursă de azot organic direct asimilabil, contribuind la reducerea stresului metabolic indus de condițiile de cultură [Cachiță-Cosma D. și al., 2000; Badea E., Săndulescu D., 2001].

Sinergia dintre concentrația completă a sărurilor MS și suplimentarea cu aceste vitamine și aminoacizi a asigurat suportul ionic necesar pentru susținerea metabolismului intens în fazele de multiplicare și creștere. Această stabilitate nutritivă a constituit fundamentul necesar pentru acumularea optimă a substanțelor de rezervă în solzii bulbari, demonstrând că formula MS standard satisface cerințele nutriționale ale ghiocelului, fără a induce fenomene de fitotoxicitate [Kyte Lydiane și al., 2013].

Prepararea mediilor din soluții stoc. Soluțiile stoc sunt soluții chimice concentrate, preparate în avans și utilizate pentru realizarea mai multor loturi de medii. Acestea pot fi preparate în volume de ordinul litrilor, având concentrații de 10, 100 sau 1000 de ori mai mari decât concentrația necesară în formula finală. În exemplul de mai jos sunt utilizate soluții stoc concentrate de 100 de ori.

Soluțiile stoc pentru macronutrienți, micronutrienți și vitamine sunt disponibile și comercial, sub formă de amestecuri preformulate,

la concentrații cuprinse între ×10 și ×1000. Utilizarea soluțiilor stoc elimină necesitatea cântăririi repetate a mai multor substanțe chimice de fiecare dată când se prepară un lot de mediu. În plus, măsurătorile sunt mai precise, deoarece cantitățile utilizate sunt mai mari decât cele necesare pentru un singur lot, iar eventualele inexactități minore au un impact redus.

Unele ingrediente ale mediilor pot precipita, adică pot forma compuși insolubili și pot ieși din soluție, dacă sunt amestecate în formă concentrată. Din acest motiv, fiecare grup de soluții stoc este alcătuit din substanțe chimice care, de regulă, nu precipită la concentrația respectivă. Pentru a evita precipitarea, se recomandă ca, la prepararea soluțiilor stoc, să se adauge întotdeauna mai întâi o cantitate mică de apă în balon, înainte de introducerea substanțelor chimice.

Metodologia preparării și standardizării soluțiilor stoc în micropropagare. Eficiența procesului de preparare a mediilor nutritive depinde de utilizarea unor soluții stoc concentrate, riguros preparate, care permit dozarea precisă și reproductibilă a componentelor chimice.

1. Clasificarea soluțiilor stoc în funcție de natura constituenților

Pentru a evita interacțiunile chimice nedorite și formarea precipitatelor, componentele mediului sunt grupate în soluții concentrate specifice:

- ✓ Soluții stoc de macroelemente – includ sărurile minerale necesare în cantități mari. Acestea se prepară, de regulă, la concentrații de 10× sau 20× față de mediul final și furnizează baza minerală necesară dezvoltării explantelor.
- ✓ Soluții stoc de microelemente – cuprind oligoelementele necesare în cantități foarte mici și se prepară, de obicei, la concentrații de 100×. Acestea au rol de cofactori enzimatici esențiali.
- ✓ Sursa de fier / chelatul de fier – se prepară obligatoriu separat, din cauza tendinței fierului de a precipita în combinație cu alte componente ale mediului. Chelatarea fierului asigură menținerea acestuia într-o formă mai stabilă și mai ușor

accesibilă plantelor.

- ✓ Complexul vitaminic și aminoacizii – furnizează cofactori organici indispensabili, precum tiamina, acidul nicotinic, piridoxina, mio-inozitolul și glicina. Din cauza sensibilității ridicate a unor compuși, aceste soluții necesită condiții specifice de preparare și conservare.
- ✓ Regulatorii de creștere / fitoregulatorii – sunt soluții de înaltă precizie, de exemplu BAP, ANA sau AIB, preparate de regulă la concentrația de 1 mg/mL. Acestea controlează direcția morfogenetică a culturii, influențând multiplicarea lăstarilor sau rizogeneza.
- ✓ Sursele de carbon și aditivii organici – sunt reprezentate în principal de zaharoză sau polialcooli și sunt integrate în mediu pentru a asigura suportul energetic și controlul potențialului osmotic.

2. Rigori tehnice de preparare, conservare și stabilitate

Pentru a garanta integritatea biochimică a soluțiilor stoc, se impune respectarea următoarelor norme de laborator:

- ✓ Se folosește exclusiv apă deionizată sau distilată, cu conductivitate minimă, pentru a preveni introducerea ionilor interferenți.
- ✓ Dizolvarea substanțelor se realizează secvențial, în apă distilată de înaltă puritate, sub agitare continuă. Fiecare component trebuie dizolvat complet înainte de adăugarea următorului, pentru a preveni precipitarea. În cazul macroelementelor, sărurile de calciu și magneziu trebuie manipulate cu prudență, deoarece pot reacționa cu ionii fosfat sau sulfat la concentrații ridicate.

Sărurile minerale sunt, în general, termostabile și pot fi autoclavate împreună cu mediul, la 121 °C. În schimb, mulți regulatori de creștere și unele vitamine sunt termolabile. Aceste componente se sterilizează prin filtrare sterilizantă, folosind filtre cu porozitatea de 0,22 μm, și se adaugă în mediul autoclavat după răcirea acestuia la aproximativ 45-50 °C.

Managementul conservării. Soluțiile stoc se păstrează în recipiente de sticlă borosilicată sau polietilenă de înaltă densitate, la temperatura de 4 °C. Soluțiile sensibile la fotodegradare, precum cele de vitamine sau anumiți regulatori de creștere, trebuie depozitate în flacoane opace sau protejate de lumină.

Trasabilitate. Fiecare flacon trebuie să prezinte o etichetă care să conțină: denumirea soluției, factorul de concentrație (10×, 100×), pH-ul inițial, data preparării și inițialele operatorului (fig. 2.15).

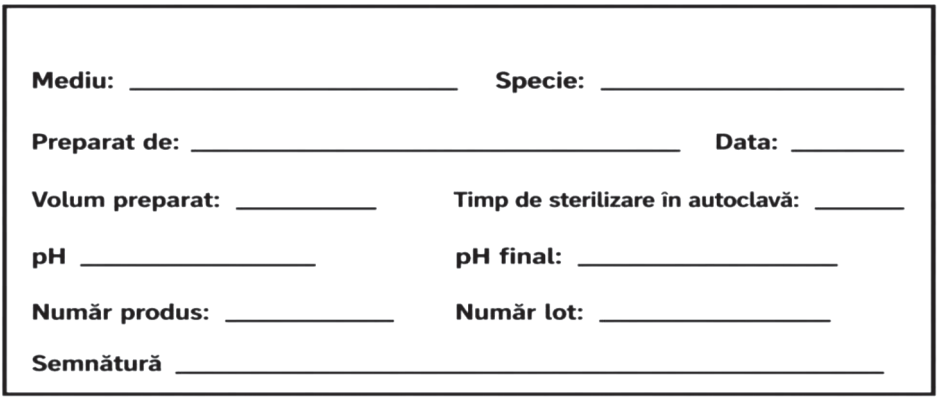


Fig. 2.15. Instrucțiune de marcare a soluției stoc sau a mediului nutritiv

Protocoale de preparare și optimizare volumetrică a soluțiilor

În cele ce urmează sunt prezentate tabele și scheme orientative privind prepararea soluțiilor stoc de macroelemente, microelemente, vitamine și regulatori de creștere, utilizate la elaborarea mediilor nutritive pentru culturile vegetale *in vitro*.

Tabelele includ exemple de pregătire a diferitelor soluții stoc, pentru volume variate, necesare în procesul de formulare a mediilor nutritive destinate culturilor vegetale. Aceste exemple au rol orientativ și pot fi adaptate în funcție de tipul mediului, concentrația soluției stoc și necesitățile specifice ale speciei cultivate.

Mod de preparare a soluției stoc de macroelemente pentru mediul MS (tab. 2.8).

Tabelul 2.8. Soluții stoc de macroelemente pentru mediul MS [Street H. E., 1977]

Macroelemente	Cantități pentru diferite volume, mg/L			
	1 L	5 L	10 L	100 L
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	370	1850	3700	37000
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	440	2200	4400	44000
KNO_3	1900	9500	19000	190000
NH_4NO_3	1650	8250	16500	165000
KH_2PO_4	170	850	1700	17000

Pentru exemplificare, se prezintă modul de preparare a soluției stoc pentru 10 L de mediu, care se prepară într-un vas de 500 mL, de culoare închisă, și se păstrează la frigider. Pentru prepararea unui litru de mediu se vor utiliza 50 mL soluție stoc de macroelemente.

Metoda descrisă pas cu pas: Se cântăresc nitrații, NH_4NO_3 și KNO_3, și se introduc împreună într-un vas de sticlă. Aceștia se dizolvă în aproximativ 50 mL apă deionizată sterilă, deoarece nu reacționează între ei și nu formează precipitat. Restul macroelementelor se cântăresc separat și se introduc în trei vase de sticlă diferite. Fiecare component se dizolvă separat în aproximativ 50 mL apă deionizată sterilă.

Pentru a evita precipitarea, soluțiile de săruri se adaugă într-un pahar gradat în următoarea ordine:

- soluția de sulfat;
- soluția de fosfat;
- soluția de nitrați;
- soluția de clorură de calciu.

Se amestecă bine, apoi se completează cu apă deionizată sterilă până la volumul final de 0,5 L. Soluția obținută se păstrează la frigider, în recipient închis la culoare.

Se prezintă modul de preparare a soluției stoc de microelemente pentru 100 L de mediu, care se prepară într-un vas de 100 mL și se păstrează la frigider. Pentru prepararea unui litru de mediu se utilizează 1 mL soluție stoc de microelemente. Această soluție poate fi

păstrată la frigider timp de până la 3 luni sau, pentru o perioadă mai îndelungată, la congelator.

Pentru preparare, fiecare component se dizolvă separat în aproximativ 10 mL apă deionizată, apoi soluțiile se combină în ordinea prezentată în tabelul 2.9.

Pentru exemplificare, se prezintă modul de preparare a soluției stoc de Fe și Na_2EDTA pentru 20 L de mediu, care se prepară într-un vas de 200 mL și se păstrează la frigider. Pentru prepararea unui litru de mediu se utilizează 10 mL soluție stoc de Fe și Na_2EDTA. Această soluție poate fi păstrată la frigider timp de maximum 3 luni.

Tabelul 2.9. Compoziția soluțiilor stoc de microelemente pentru mediul MS [Street H. E., 1977]

Microelemente	Cantități pentru diferite volume, mg/L			
	1 L	5 L	10 L	100 L
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	16,9	84,5	169	1690
KI	0,83	4,15	8,30	83
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,025	0,125	0,25	2,5
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	8,6	43	86	860
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,025	0,125	0,25	2,5
H_3BO_3	6,2	31	62	620
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,25	1,25	2,5	25

Soluția se prepară prin dizolvarea separată a fiecărui component în aproximativ 50 mL apă deionizată, apoi componentele se combină conform ordinii prezentate în tabelul 2.10.

Tabelul 2.10. Soluții stoc de Fe și Na2EDTA pentru mediul MS

Microelemente	Cantități pentru diferite volume, mg/L			
	1 litru	5 litri	10 litri	20 litri
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	27,8	139	278	556
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	37,3	186,5	373	746

Nu se recomandă prepararea soluțiilor stoc pentru mio-inozitol și glicină; aceste componente se cântăresc de fiecare dată când se prepară un mediu nutritiv.

Vitaminele sunt componente importante ale mediului de cultură MS și îndeplinesc rolul de coenzime în diverse procese metabolice ale celulei vegetale. Complexul vitaminic al mediului MS conține de obicei tiamină (vitamina B_1), acid nicotinic (vitamina B_3), piridoxină (vitamina B_6) și glicină. Soluțiile stoc se recomandă doar pentru acid nicotinic, piridoxină și tiamină (tab. 2.11).

Tabelul 2.11. Compoziția soluțiilor stoc de vitamine pentru mediul MS

Vitamine	Cantități pentru diferite volume, mg/L			
	1 litru	2 litri	10 litri	100 litri
Mio-inozitol	100	200	1000	10000
Glicină	2	4	20	200
Acid nicotinic	0,5	1	5	50
Pirodoxină HCl	0,5	1	5	50
Tiamină HCl	0,1	0,2	1	10

Prepararea mediului nutritiv MS utilizând soluțiile stoc preparate anterior s-a realizează conform următoarei proceduri:

1. ***Calcularea volumului necesar***. Se stabilește volumul final de mediu care urmează să fie preparat (de exemplu, 1 L).

2. ***Adăugarea apei distilate***. Într-un balon Erlenmeyer sau pahar Berzelius se introduc aproximativ 70-80% din volumul final de apă distilată sau deionizată sterilă.

3. ***Adăugarea soluțiilor stoc.*** Se adaugă succesiv, sub agitare continuă:

- soluția stoc de macroelemente;
- soluția stoc de microelemente;
- soluția stoc de fier (Fe-EDTA);
- soluția stoc de regulatori de creștere (auxine și/sau citokinine), dacă protocolul experimental o prevede;

• soluția stoc de vitamine.

• adăugarea sursei de carbon. Se adaugă zaharoza, în concentrația stabilită prin protocol (în mod obișnuit 30 g/L), și se amestecă până la dizolvarea completă. Se completează cu apă distilată până la volumul final dorit.

• Ajustarea pH-ului. pH-ul mediului se ajustează, de regulă, la 5,7-5,8, utilizând soluție de NaOH 1 N sau HCl 1 N.

• Adăugarea agentului de gelificare (pentru medii solide). Se adaugă agar (6,5-8,0 g/L, în funcție de tipul agarului utilizat) sau alt agent de gelificare și se omogenizează.

Topirea și dizolvarea agarului. După ajustarea pH-ului mediului nutritiv la 5,7-5,8, se adaugă cantitatea necesară de agar (6,5–8,0 g/L, în funcție de tipul agarului utilizat). Amestecul se omogenizează și se încălzește treptat pe o plită magnetică cu agitare continuă, până la atingerea punctului de fierbere, asigurând astfel dizolvarea completă a agarului și obținerea unui mediu omogen, limpede, lipsit de particule nedizolvate.

Fierberea prelungită este evitată, deoarece poate determina evaporarea apei, modificarea volumului final al mediului și afectarea stabilității unor componente termolabile.

Repartizarea mediului nutritiv. După dizolvarea completă a agarului, mediul nutritiv se distribuie în recipientele de cultură (eprubete, borcane sau flacoane), în volume corespunzătoare fiecărei variante experimentale.

Sterilizarea. Recipientele cu mediu se sterilizează în autoclav la 121°C, sub o presiune de 1,05 kg/cm² (15 psi), timp de 15-20 minute.

Răcirea și solidificarea. După sterilizare, recipientele se lasă să se răcească și să se solidifice în condiții aseptice, evitând orice sursă de contaminare.

Depozitarea. Mediul nutritiv preparat se păstrează la temperatura de 4-8 °C, în condiții de protecție față de lumină, până la utilizare.

Deși fiecare specie vegetală necesită un protocol specific pentru optimizarea randamentului, procesul tehnologic reprezintă o succesiu-

ne de etape standardizate, menite să asigure trecerea materialului biologic din mediul natural către plante viabile și aclimatizate (fig. 2.16).

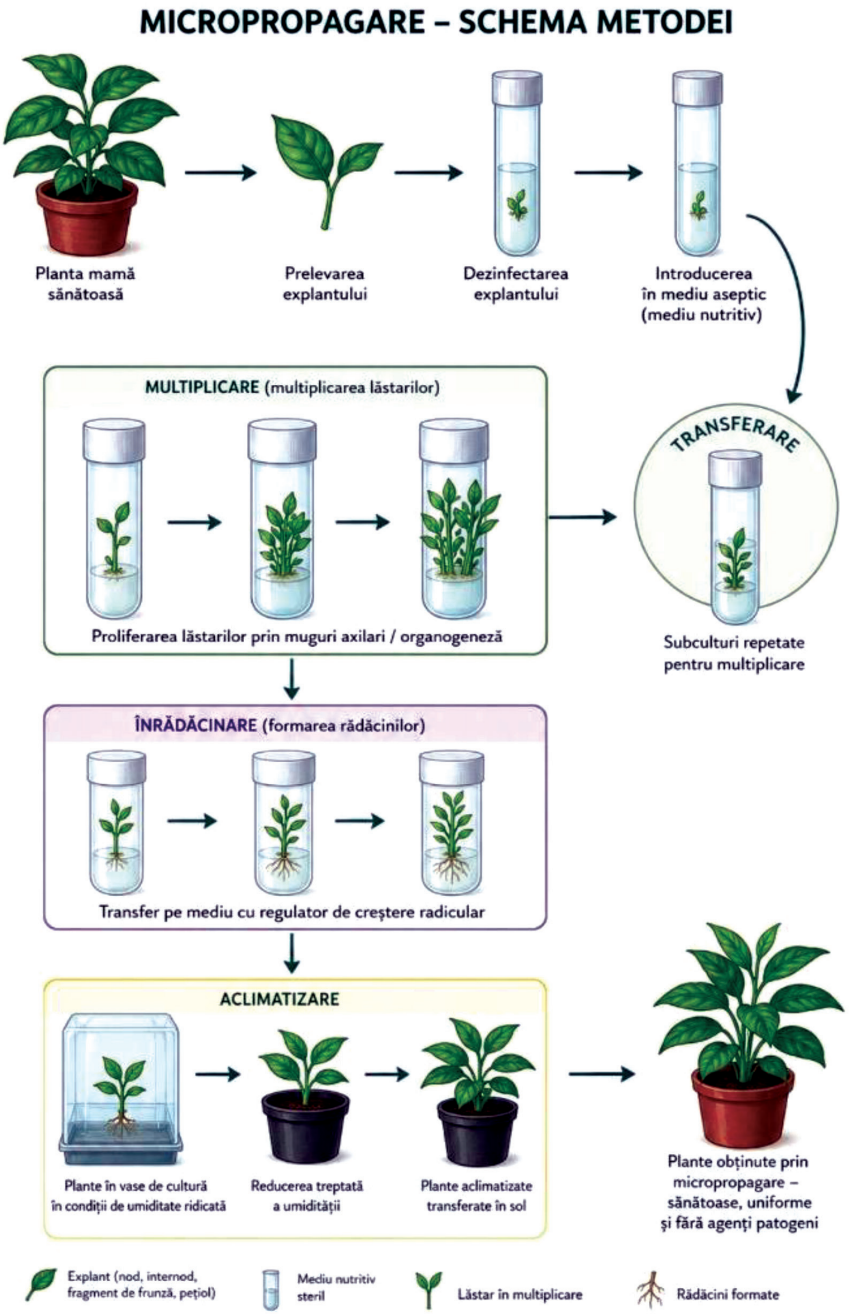


Fig. 2.16. Schema metodei de micropropagare

Schema de micropropagare cuprinde câteva etape succesive: selectarea și introducerea materialului vegetal de pornire în cultură, sterilizarea explantului, inducerea și multiplicarea lăstarilor pe mediu nutritiv, înrădăcinarea plantelor regenerate și adaptarea ulterioară a acestora la condițiile mediului exterior. Metoda permite obținerea unei cantități mari de material săditor genetic omogen și sănătos, într-o perioadă relativ scurtă de timp.

Micropropagarea este utilizată pe scară largă în agricultură, ameliorare, conservarea speciilor rare de plante și cercetare științifică, deoarece asigură o rată ridicată de multiplicare și posibilitatea obținerii plantelor pe tot parcursul anului, indiferent de condițiile sezoniere.

2.5. Aplicații practice ale culturilor *in vitro*

Importanța practică a culturilor *in vitro* constă în posibilitatea de a obține pe tot parcursul anului material vegetal de calitate, indiferent de factorii sezonieri. Aceste tehnologii sunt utilizate pe scară largă pentru microînmulțirea plantelor, conservarea speciilor rare și pe cale de dispariție, crearea de colecții de resurse genetice, desfășurarea de cercetări științifice și pregătirea specialiștilor în domeniul biotehnologiei.

Producția comercială de plante. Industria horticolă utilizează pe scară largă culturile *in vitro* pentru producția comercială a unei game diverse de plante ornamentale, plante medicinale și aromatice, precum și culturi agricole importante. Orhideele, bromeliaceele, plantele carnivore și alte specii ornamentale rare sau valoroase sunt produse în cantități mari prin micropropagare. Această tehnologie permite obținerea rapidă a materialului săditor uniform, de înaltă calitate și liber de patogeni [Lozinschi M. și al., 2015].

În cadrul programelor de ameliorare genetică, culturile *in vitro* accelerează semnificativ procesul de obținere și testare a unor soiuri noi. Prin combinarea cu tehnici de mutageneză *in vitro* sau inginerie genetică, se pot genera rapid cantități mari de plante cu caracteristici stabile. De asemenea, salvarea embrionilor prin cultură *in vitro* per-

mite obținerea de hibrizi viabili din încrucișări incompatibile, extinzând astfel posibilitățile de ameliorare.

Producerea de plante libere de virusuri. Una dintre cele mai importante aplicații ale culturilor *in vitro* este obținerea de plante libere de virusuri și alți patogeni sistemici. Cultura de meristeme, combinată cu termoterapia și chimioterapia, permite eliminarea virusurilor din materialul vegetal infectat. Meristemele apicale, datorită diviziunii celulare rapide și lipsei conexiunilor vasculare dezvoltate, conțin de obicei concentrații foarte scăzute de particule virale sau nu conțin deloc virusuri.

Procesul de însănătoșire constă în izolarea unor meristeme foarte mici, de 0,1-0,5 mm, de la plantele infectate, cultivarea lor *in vitro* și testarea ulterioară a plantelor regenerate pentru confirmarea absenței virusurilor, prin metode serologice sau moleculare. Această tehnică este esențială pentru menținerea stocurilor de plante-mamă certificate în pepiniere și pentru reabilitarea soiurilor valoroase infectate. Plantele libere de virusuri prezintă, de regulă, vigoare superioară, productivitate crescută și calitate mai bună a produselor.

Conservarea germoplasmei. Culturile *in vitro* oferă metode eficiente pentru conservarea pe termen mediu și lung a resurselor genetice vegetale. Conservarea în creștere lentă implică modificarea condițiilor de cultură, cum ar fi temperatura scăzută, concentrația crescută de agenți osmotici sau utilizarea inhibitorilor de creștere, pentru a reduce rata de creștere și a extinde intervalul dintre subculturi. Această metodă este utilizată pentru conservarea pe termen mediu, reducând costurile de întreținere și riscurile de contaminare sau pierdere a materialului vegetal.

Crioconservarea reprezintă soluția optimă pentru conservarea pe termen lung a materialului vegetal. La această temperatură, toate procesele metabolice sunt suspendate, iar materialul poate fi păstrat teoretic pe termen nelimitat, fără modificări genetice semnificative. Tehnicile de crioconservare includ îngheț lent controlat, vitrificarea, encapsulare-deshidratare și droplet-vitrification, fiecare fiind optimizată pentru diferite tipuri de explante și specii.

Culturile *in vitro* reprezintă una dintre cele mai importante direcții ale biotehnologiei vegetale, bazată pe cultivarea celulelor, țesuturilor și organelor vegetale în condiții sterile și controlate. În funcție de materialul biologic utilizat și de obiectivele urmărite, au fost dezvoltate diferite tipuri de culturi *in vitro*, fiecare având un rol specific în multiplicarea plantelor, regenerarea acestora, ameliorarea genetică, conservarea resurselor genetice și cercetarea proceselor fiziologice [Andronic L., Smerea S., Călugăru-Spătaru T., Dascaliuc A., 2026].

Cunoașterea particularităților și a aplicațiilor fiecărui tip de cultură este esențială pentru valorificarea eficientă a potențialului biotehnologiilor vegetale moderne (fig. 2.17).

Fig. 2.17. Tipuri de culturi *in vitro* și scopul lor

1. Cultura embrionilor		
• scurtarea ciclului de ameliorare prevenirea avortării embrionilor depășirea obținerea haploizilor • sursă de explante pentru calus • incompatibilității postzigotice		***Pomi fructiferi:*** Cireș, piersic, cais, prun (soiurile cu coacere timpurie). ***Cereale:*** Hibrizi de grâu × secară (*Triticale*), porumb, orz. *Plante horticole*: Orhidee, trandafir, liliac. ***Leguminoase:*** Tomate sălbatice, ardei, fasole (pentru hibrizi interspecifici). ***Plante tropicale:*** Bananier, citrice, bumbac
2. Cultura de calus / celule în suspensie		
• regenerare prin muguri sau embrioni • variabilitate somaclonală • selecția mutanților • producerea metaboliților secundari • biotransformare		***Cultura de calus***: tutun, morcov, cartof, orez, viță-de-vie, lucernă garoafă, crizantemă. ***Cultura de celule în suspensie***: tisa (taxus), ginseng, degețelul lânos (digitalis), sfeclă roșie, cafea, roibă (rubia).

3. Cultura de meristeme		
• eliminarea patogenilor (virusuri, bacterii, ciuperci); • clonarea plantelor; • conservarea germoplasmei; • obținerea plantelor libere de virusuri.		Cartof (*Solanum tuberosum*) Căpșun (*Fragaria x ananassa*) Bananier (*Musa spp*.) Trestie de zahăr (*Saccharum officinarum*) Usturoi și Ceapă (*Allium spp*.) Viță-de-vie (*Vitis vinifera*) Orhidee (*Phalenopsis, Orchis*) Garoafă (*Dianthus caryophyllus*) Crizantemă (*Chrysanthemum spp.*) Cartof dulce (*Ipomoea batatas*)
4. Cultura de antere și microspori		
• obținerea haploizilor și liniilor homozigote • plante supermascule • selecția mutanților		Tutun (*Nicotiana tabacum*) Orez (*Oryza sativa*) Grâu (*Triticum aestivum*) Orz (*Hordeum vulgare*) Răpiță (*Brassica napus*) Conopidă (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) Porumb (*Zea mays*)
5. Cultura de apexuri și noduri		
• lăstărire axilară (clonare) • crioconservare		Mentă (*Mentha* spp.) Viță-de-vie (*Vitis vinifera*) Cartof (*Solanum tuberosum*) Stevia (*Stevia rebaudiana*) Mur și Zmeur (*Rubus* spp.) Eucalipt (*Eucalyptus* spp.) Trandafir (*Rosa* spp.) Piersic și cireș (portaltoi)
6. Cultura de protoplaști		
• hibridare somatică • crearea cibrizilor		Tutun (*Nicotiana tabacum*) Cartof (*Solanum tuberosum*) Roșii (*Lycopersicon esculentum*) Petunia (*Petunia hybrida*)

• transfer de genă • variabilitate somaclonală		Morcov (*Daucus carota*) Orez (*Oryza sativa*) Porumb (*Zea mays*) Răpiță (*Brassica napus*) Citrice (*Citrus* spp.) Măr (*Malus domestica*) Păpădie (*Taraxacum officinale*) Gâscăriță (*Arabidopsis thaliana)*

Schemele prezentate evidențiază diversitatea tehnicilor de cultură *in vitro* și importanța acestora în biotehnologiile vegetale moderne. Fiecare tip de cultură (cultura de calus, celule în suspensie, meristeme, antere și microspori, apexuri și noduri, protoplaști) prezintă aplicații specifice, fiind utilizată pentru multiplicarea rapidă a plantelor, obținerea materialului vegetal sănătos, conservarea germoplasmei, ameliorarea genetică și crearea unor noi forme vegetale. Integrarea acestor metode permite valorificarea potențialului regenerativ al celulelor vegetale și oferă soluții eficiente pentru cercetare, agricultură durabilă și conservarea resurselor genetice vegetale.

În concluzie, diversele tipuri de culturi *in vitro* constituie instrumente eficiente ale biotehnologiei vegetale moderne, destinate rezolvării unei game largi de probleme științifice și practice cu aplicabilitate în micropropagare, ameliorare, obținerea plantelor libere de agenți patogeni și conservarea biodiversității. Utilizarea lor permite microînmulțirea plantelor, conservarea resurselor genetice, obținerea de material de plantare fără viruși, efectuarea de cercetări de selecție, studierea proceselor fiziologice și obținerea de compuși biologic activi valoroși. Diversitatea culturilor *in vitro* oferă posibilități largi pentru dezvoltarea cercetărilor fundamentale și implementarea biotehnologiilor inovatoare în practică.

3. *Mentha spp.*: INIȚIEREA ȘI MULTIPLICAREA *IN VITRO*

3.1. Descrierea botanică a speciei Mentha citrata Ehrh.

Genul Mentha cuprinde plante perene aromatice din familia Lamiaceae, fiind răspândit predominant în zonele cu climă temperată globului. Din punct de vedere etimologic, denumirea genului provine de la personajul legendar grec „*Minthe*”, fapt ce reflectă importanța culturală și simbolică a acestei plante încă din cele mai vechi timpuri. Menta are o istorie documentată de utilizare de peste 2000 de ani, fiind considerată un simbol al ospitalității în numeroase culturi și fiind utilizată pe scară largă în civilizațiile antice – nu doar în scopuri medicinale tradiționale, ci și în aromaterapie, gastronomie și ritualuri domestice. În medicina tradițională chineză, menta a fost valorificată pentru proprietățile sale terapeutice, fiind considerată un remediu esențial în tratamentele naturale. În prezent, metaboliții secundari extrași din diverse specii ale genului Mentha sunt utilizați extensiv în obținerea produselor cosmetice, analgezicelor, în tratamentul febrei, cefaleei, răcelilor, dar și ca agenți de aromă în industria alimentară [Yousefian S., Esmaeili F.; Lohrasebi T.A., 2023].

Anumite specii din acest gen sunt valorificate ca plante industriale datorită conținutului ridicat de uleiuri esențiale bogate în monoterpene, compuși intens utilizați în domeniile alimentar, al aromelor, cosmetic și farmaceutic. Diversitatea speciilor de Mentha este considerabilă, acestea prezentând variații semnificative atât în ceea ce privește trăsăturile morfologice, cât și nivelurile de poliploidie [Bhat S., Maheshwari P., Kumar, S., Kumar A., 2002].

Mentha citrata Ehrh., cunoscută sub denumirile comune de mentă de bergamotă sau mentă de lămâie, prezintă o taxonomie și o morfologie care au generat, de-a lungul timpului, controverse și interpretări variate în ceea ce privește clasificarea sa botanică. Potrivit unor autori, M. citrata, este considerată o varietate a speciei Mentha aquatica L. [Bhat S., Maheshwari P., Kumar S., Kumar A., 2002]. Pe de altă parte, alte surse din literatura de specialitate susțin că această specie ar fi, de fapt, un hibrid rezultat din încrucișarea dintre Mentha viridis L. și Mentha aquatica L. [Mastelic J., Milos M.; Kustrak D., 2000].

M. citrata are frunzele ovate, de un verde strălucitor, opuse și încrucișate, cu suprafețe netede și margini ușor tocite și zimțate, ceea ce face ca frunzele să fie moi la atingere. Menta de bergamotă este o plantă versatilă, apreciată pentru numeroasele sale utilizări în aromaterapie, arte culinare, medicină naturală și produse de curățare. Aroma sa unică și beneficiile pentru sănătate o fac o alegere populară pentru oricine este interesat de remedii naturale, medicină pe bază de plante și bunăstare holistică.

3.2. Importanța biologică, economică și medicinală

Speciile din genul *Mentha,* conțin ca principali constituenți, compuși precum mentolul, acetatul de mentil, mentona, pulegona, mentofuranul și alți derivați ai structurii p-mentanice. Dintre aceștia, mentolul reprezintă un constituent chimic terpenoid specific și caracteristic reprezentanților genului *Mentha*. Totuși, M. citrata se distinge de alte specii din genul Mentha prin absența mentolului sau, în unele cazuri, prin prezența acestuia doar în cantități foarte reduse [Mastelic J., Milos M.; Kustrak D., 2000; Ouakouak H., Benchikha A., Hassani A., Ashour M., 2019; Pragadheesh V.S., Yadav A., Chanotiya C.S.; 2020]. În compoziția uleiului esențial, compușii majoritari sunt acetatul de linalil și linalool, care conferă plantei un profil aromatic specific, diferit de cel al speciilor bogate în mentol [Cappellari, L.R. Santoro M.V., Schmidt A., Gershenzon J., Banchio E., 2019]. Această specie prezintă o adaptabilitate ridicată la condiții

de cultivare diverse, și poate fi crescută atât în spații exterioare (grădini), cât și în recipiente (ghivece), în mod similar altor specii din același gen.

Speciile de *Mentha (Mentha* spp.*)* sunt recunoscute pentru importanța lor în industria farmaceutică, în principal datorită conținutului ridicat de uleiuri esențiale cu efecte biologice active. În acest context, dezvoltarea unor metode eficiente de multiplicare și ameliorare a caracteristicilor morfo-fiziologice devine esențială pentru creșterea productivității și optimizarea calității materiei prime. Cercetările efectuate asupra a șase varietăți de selecție ucraineană au demonstrat faptul că tehnicile moderne de micropropagare clonală și ameliorare *in vitro* influențează semnificativ dezvoltarea anatomică și fiziologică a plantelor [Talankova-Sereda T.E., Kolomiets J.V., Holubenko A.V., Nuzhyna N.V., 2019]. Aceste intervenții biotehnologice au favorizat formarea țesuturilor conducătoare, creșterea acumulării de biomasă, precum și sporirea productivității în condiții *in vivo*, aspecte evidențiate prin indicatori agronomici precum acoperirea foliară, randamentul de frunze uscate și dezvoltarea rizomilor. De asemenea, s-a constatat o creștere semnificativă a conținutului de ulei esențial, ajungând până la 28,6 kg/ha.

Studii complementare au analizat influența regulatorilor de creștere asupra dezvoltării și compoziției chimice a mentei, subliniind rolul acestora în optimizarea calității fitoproduselor [Santoro M.V., Nievas F., Zygadlo J., Giordano W., Banchio E., 2013]. Organogeneza *in vitro* a fost obținută cu succes la speciile *M. x piperita* și *M. spicata*, pornind de la discuri foliare, cu regenerare observată după șase săptămâni de cultură. Protocolul optimizat a implicat o etapă inițială de două săptămâni pe mediu Murashige-Skoog suplimentat cu manitol și fitoregulatori de creștere (6-benziladenină și acid indol-3-butiric), urmată de transferul explantelor pe un mediu fără manitol, îmbogățit cu acid α-naftalenacetic, 6-benziladenină și tidiazuron. În aceste condiții, au fost obținute rate de regenerare de 78% pentru *M. x piperita* și 49% pentru *M. spicata*, demonstrând eficiența metodei pentru aplicații precum transformarea genetică asista-

tă de *Agrobacterium tumefaciens* [Jullien F. și al., 1998; Samantaray A., Sial P., Kar M., 2012].

În cazul speciei *M. citrata*, literatura de specialitate menționează utilizarea culturilor transformate genetic în scopul producerii de monoterpene în condiții *in vitro*. Aceste culturi au reprodus profilul chimic al uleiului esențial caracteristic plantei-mamă, dominat de linalool și acetat de linalil, subliniind aplicabilitatea biotehnologiei în îmbunătățirea calității plantelor aromatice [Mastelic J., Milos M., Kustrak D., 2000; Santoro M.V.; Nievas F.; Zygadlo J.; Giordano W.; Banchio E., 2013].

3.3. Protocol de micropropagare a speciei *Mentha citrata* Ehrh.

În contextul agriculturii durabile și al industriei farmaceutice, multiplicarea *in vitro* a plantelor medicinale precum M. citrata devine o tehnologie esențială. Această metodă biotehnologică permite obținerea materialului săditor omogen și avirotic, facilitând conservarea genetică, standardizarea producției și protecția resurselor naturale. În plus, propagarea *in vitro*, în special din vârfuri meristematice, contribuie la eliminarea patogenilor (virusuri, bacterii, fungi) care afectează frecvent culturile repetate, ceea ce o face ideală pentru agricultura ecologică și pentru producția de materie primă destinată industriei farmaceutice.

Cercetările au fost realizate în laboratorul de cercetări științifice *„Genetică, Fiziologie și Biochimie a Plantelor”* din cadrul Universității Pedagogice de Stat „Ion Creangă” din Chișinău. Explanturile de *M. citrata* au fost prelevate de la plante-mamă sănătoase, crescute în condiții controlate, pe terenuri necontaminate, fără expunere anterioară la agenți patogeni și tratate preventiv cu fungicide (fig. 3.1 A, B).



Fig. 3.1. Aspectul morfologic al *M. citrata* Ehrh.:
A – plante-mamă cultivate în condiții de seră; **B** – explanturi

La mentă, se preferă fragmentele de lăstari tineri datorită ratei mari de regenerare și expunerii reduse la agenți patogeni. În cazul *M. citrata*, rezultate foarte bune au fost obținute folosind explanturi bine diferențiate, precum meristeme apicale, muguri, noduri sau segmente de tulpină. Dintre acestea, segmentele nodale și vârfurile de lăstari care conțin meristeme apicale sau axilare sunt cele mai frecvent utilizate, datorită potențialului lor ridicat de regenerare și riscului scăzut de contaminare.

Nu în ultimul rând, explanturile trebuie să prezinte o capacitate intrinsecă ridicată de regenerare, conținând celule meristematice sau celule cu potențial de totipotență, precum apexurile de lăstari. Acestea răspund eficient la regulatorii de creștere incluși în mediile de cultură, cum ar fi BA sau IBA, facilitând obținerea regenerării plantelor în condiții controlate.

Pentru inițierea culturilor *in vitro* de *M. spicata*, fragmentele vegetale au fost supuse unui proces riguros de asepsizare. În prima etapă, explantele au fost imersate în etanol 70%, urmat de 3-4 spălări succesive cu apă distilată sterilă. Ulterior, s-a aplicat tratamentul cu clorură de mercur ($HgCl_2$ 0,1%) în prezența surfactantului Tween-20, timp de 5 minute, pentru reducerea încărcăturii microbiene. După acest pas, explantele au fost clătite de 3-4 ori cu apă distilată sterilă, pentru îndepărtarea reziduurilor toxice. Explantele sterilizate au fost transferate pe mediu nutritiv de tip Murashige-Skoog (MS), supli-

mentat cu 6-benzilaminopurină în concentrații cuprinse între 1,0 și 2,5 mg/L și acid indolbutiric la 0,5-1,5 mg/L [Sayed Shaqur Ahmed, Homayra Huq, Farhana Afrin Vabna, Fahima Khatun, 2024].

Elaborarea protocolului optim de sterilizare a presupus testarea comparativă a mai multor agenți dezinfectanți, în scopul identificării combinațiilor care asigură o decontaminare eficientă fără a compromite viabilitatea explanturilor.

Agenți sterilizanți utilizați la asepsizarea materialului biologic. Analiza comparativă a celor 8 variante de agenți de sterilizare testate în cadrul laboratorului evidențiază că succesul dezvoltării culturilor in vitro pentru specia studiată este strâns legat de alegerea unui protocol de decontaminare adecvat (fig. 3.2; tab. 3.1).

Eficiența unui agent sterilizant este determinată de mai mulți factori critici, printre care se numără: concentrația soluției, durata de expunere, tipul explantului și gradul de fitotoxicitate al substanței utilizate. În acest context, s-a urmărit selectarea unei variante care să combine o activitate antimicrobiană ridicată cu un impact fitotoxic minim, astfel încât să fie favorizată regenerarea explanturilor (tab. 3.1).

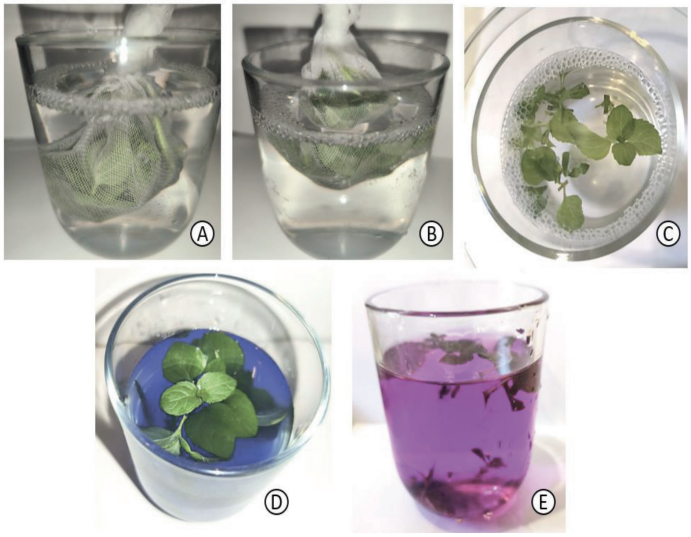


Fig. 3.2. Agenți sterilizanți utilizați la asepsizarea materialului biologic prelevat din M. citrata:
A – hipoclorit de de sodiu (1%); **B** – hipoclorit de de sodiu (5%); **C** – clorura de hidrargium; **D** – albastrul de metilen; **E** – permanganatul de potasiu

Nu s-a recurs la un singur agent de sterilizare, ci s-a elaborat un protocol complex, ce implică o succesiune de agenți sterilizanți, utilizați în concentrații și timpi de expunere diferiți. Această abordare a permis minimizarea riscului de contaminare, asigurând în același timp o rată crescută de regenerare și dezvoltare a plantulelor obținute in vitro.

Tabelul 3.1. Agenți sterilizanți utilizați la asepsizarea materialului biologic

Nr. d/o	Sterilizant	Concentrație	Timp de expunere	Efect	Observații
1.	**NaOCl**	1%	30 minute	++	Utilizat pentru meristeme și frunze. Clătire abundentă.
2.	**NaOCl**	5%	15 minute	+	Utilizat pentru meristeme și frunze, semințe. Clătire abundentă.
3.	**C_2H_5OH**	70%	30 sec-1 minut	++	În combinație cu alți sterilizanți. Evaporare rapidă.
4.	**H_2O_2**	3%	5-15 minute	++	Pentru explante delicate. În combinație cu alți sterilizanți.
5.	**$HgCl_2$**	0,1-0,2%	1-7 minute	+++++	Eficient, dar toxic și poluant. Cu precauții.
6.	**Albastru de metilen**	10-50 ppm	10-20 minute	++	Alternativ natural, antibacterian și antifungic. În combinație cu alți sterilizanți.

7.	**$KMnO_4$**	0,001%	15 minute	+	Alternativ natural, antibacterian și antifungic. În combinație cu alți sterilizanți.
8.	**Fungicide**	0,1-0,2%	30-60 minute	++	Contra contaminărilor fungice externe. În combinație cu alți sterilizanți.

Legendă: **+ = satisfăcător (~10%); ++ = bun (~30%); ++++ = foarte bun (~70%); +++++ = excelent (~90%)**

Hipocloritul de sodiu (NaOCl), în concentrații de 1-5%, este utilizat frecvent pentru sterilizarea meristemelor și frunzelor, având o eficiență de la satisfăcătoare (+) până la bună (++) pentru menta de bergamotă. Cu toate acestea, necesită clătire riguroasă, deoarece la concentrații mai mari poate produce leziuni țesuturilor vegetale și chiar necroze.

Etanolul (C_2H_5OH) de 70%, deși are o acțiune rapidă și eficientă (++), nu poate fi utilizat ca agent unic, ci doar în complementaritate cu alți dezinfectanți, datorită evaporării rapide și eficienței limitate pe microorganismele persistente, cu o durată de expunere maiximal 1 minut sau 30 secunde.

Peroxidul de hidrogen (H_2O_2) este versatil și aplicabil pe explantele delicate, însă eficiența sa este moderată (++) și depinde de concentrație și durată. Nu poate fi utilizat unic, este adesea folosit în combinație cu alți agenți pentru rezultate optime.

Clorura de hidrargium ($HgCl_2$), în concentrații de 0,1-0,2%, a demonstrat cea mai ridicată eficiență (+++++), asigurând un grad de decontaminare de până la 90%. Totuși, toxicitatea ridicată și riscul major de poluare fac ca utilizarea sa să fie limitată, fiind aplicabilă doar în condiții stricte de siguranță.

În categoria agenților naturali, ***albastrul de metilen*** și ***perman-***

ganatul de potasiu ($KMnO_4$) oferă o eficiență moderată (+/++), însă reprezintă alternative ecologice promițătoare, mai ales în combinație cu alți sterilizanți chimici.

În ceea ce privește combaterea contaminărilor persistente, ***fungicidele comerciale (Bavistin, Benomil)*** sunt esențiale pentru menținerea asepsiei mediului de cultură. Acestea oferă o eficiență bună (++) și sunt indispensabile în cazul prezenței microorganismelor endofite sau a celor fungice rezistente.

Interpretarea scorului de eficiență (+ până la +++++) din tabel arată că doar câteva variante ating nivelul de „excelent" ($HgCl_2$), în timp ce celelalte oferă un compromis între eficiență și toleranță biologică. Astfel, se impune adaptarea protocolului de sterilizare în funcție de particularitățile fiecărei specii, de tipul explantului și de condițiile experimentale.

Observații: Toate soluțiile utilizate în proces trebuie preparate proaspăt și menținute la temperatura camerei, pentru a-și păstra eficiența. Întreaga procedură se desfășoară sub hotă cu flux laminar sau într-un spațiu steril, astfel încât riscul de contaminare să fie minim. Manipularea explanturilor se realizează preferabil cu pensete sterile, pentru a menține asepsia pe tot parcursul lucrului. De asemenea, etapele de clătire cu apă autoclavată sunt esențiale, deoarece previn apariția fitotoxicității care ar putea afecta ulterior dezvoltarea explantelor.

În baza rezultatelor obținute în urma testării mai multor agenți de sterilizare, a fost inițiată cultura *in vitro* a speciei M. citrata, utilizând trei protocoale distincte de asepsizare. Ulterior, a fost evaluat impactul fiecărei metode asupra eficienței inițierii proceselor de micropropagare.

I. Protocol de sterilizare utilizând fungicid și hipoclorit de sodiu de 5%

Pentru inițierea culturilor *in vitro*, materialul vegetal a fost supus unui protocol de sterilizare ce a inclus tratamente cu fungicid

și soluție de hipoclorit de sodiu. Ulterior, acesta a fost secționat în meristeme apicale, meristeme ale lăstarilor laterali, internoduri și frunze. Fiecare explant a fost transferat individual în pahare sterile, acoperite cu cutii Petri, pentru a preveni contaminarea și a asigura condiții optime de cultură.

Etapele pregătirii și sterilizării au inclus:

1. Spălarea preliminară – explanturile au fost clătite de 4-5 ori sub jet de apă de la rețea, în vederea îndepărtării impurităților mecanice.

2. Tratarea cu detergent – materialul a fost imersat într-o soluție diluată de detergent, urmată de clătiri repetate până la eliminarea completă a reziduurilor.

3. Decontaminarea fungică – probele au fost tratate timp de 30 minute cu o soluție fungicidă 0,1%.

4. Dezinfectarea primară – s-au adăugat patru picături de permanganat de potasiu ($KMnO_4$), urmate de 2-3 spălări cu apă distilată.

5. Sterilizarea chimică – explanturile au fost imersate timp de 10 minute într-o soluție de hipoclorit de sodiu (NaOCl) de 5%, în combinație cu apă distilată și 2-3 picături de $KMnO_4$. Transferul ulterior s-a realizat în condiții aseptice, într-o boxă laminară.

6. Tratament suplimentar – pentru sporirea eficienței sterilizării, explanturile au fost expuse la peroxid de hidrogen (H_2O_2) de 3% timp de 5 minute, apoi clătite cu apă distilată sterilă (autoclavată).

II. Protocol de sterilizare utilizând hipocloritul de sodiu de 5%

Pentru inițierea culturilor *in vitro*, materialul vegetal a fost supus unui protocol de sterilizare ce a inclus tratamente cu soluție de hipoclorit de sodiu. În etapa următoare, materialul vegetal intact a fost divizat în meristeme apicale, meristeme provenite din lăstarii laterali, internoduri și frunze.

Etapele pregătirii și sterilizării materialului vegetal au inclus:

1. Spălarea preliminară – explanturile au fost clătite timp de 20 minute sub jet de apă de la rețea, în vederea îndepărtării impurități-

lor mecanice.

2. Tratarea cu detergent – materialul a fost imersat într-o soluție de detergent (câteva picături de detergent Fairy), urmată de clătiri repetate până la eliminarea completă a reziduurilor.

3. Dezinfectarea primară – s-au adăugat patru picături de permanganat de potasiu (KMnO4), urmate de 2-3 spălări cu apă distilată.

4. Sterilizarea chimică – explanturile au fost imersate timp de 10 minute într-o soluție de hipoclorit de sodiu (NaOCl) de 10%, în combinație cu apă distilată și 2-3 picături de KMnO4. Transferul ulterior s-a realizat în condiții aseptice, într-o boxă laminară.

5. Dezinfectare rapidă cu etanol – În hotă au fost scufundate explanturile timp de 20-30 sec în etanol de 70%, după care au fost clătite cu apă autoclavată.

6. Tratament suplimentar – pentru sporirea eficienței sterilizării, explanturile au fost expuse unei soluții cu albastru de metilen timp de 5 minute, apoi clătite cu apă distilată sterilă (autoclavată).

III. Protocol de sterilizare utilizând clorura de mercur de 0,1%

Pentru inițierea culturilor *in vitro*, materialul vegetal a fost supus unui protocol de sterilizare ce a inclus tratamente cu clorura de mercur. Ulterior, explanturile sănătoase au fost fragmentate în meristeme apicale, meristeme ale lăstarilor laterali, internoduri și frunze.

Etapele pregătirii și sterilizării materialului vegetal au inclus:

1. **Spălarea preliminară** – materialul vegetal a fost supus unei spălări inițiale sub jet de apă de la rețea, repetată de 4-5 ori, în vederea îndepărtării impurităților mecanice. Ulterior, explanturile au fost tratate cu o soluție de detergent (Tween-20), urmată de clătiri succesive până la eliminarea completă a spumei reziduale.

2. **Pre-dezinfectare cu etanol (opțional) –** pentru o dezinfectare inițială, explanturile au fost imersate timp de 20-30 de secunde într-o soluție de etanol 70%, fiind apoi transferate imediat în etapa următoare a protocolului.

3. **Dezinfectare cu clorură de mercur** – pentru sterilizarea profundă, s-a utilizat o soluție de clorură de mercur de 0,1%, în care explanturile au fost imersate timp de 7 minute.

4. **Clătire** – după tratamentul cu $HgCl_2$, explanturile au fost spălate de 3-5 ori cu apă distilată sterilă, pentru a îndepărta complet reziduurile toxice ale substanței.

5. **Tratament suplimentar (opțional)** – pentru sporirea eficienței sterilizării, în unele cazuri, s-a aplicat un tratament complementar cu peroxid de hidrogen (H_2O_2) de 3%, timp de 5 minute, urmat de trei clătiri finale cu apă distilată sterilizată prin autoclavare.

Inocularea pe medii nutritive. În etapa finală, explanturile sterilizate au fost inoculate pe medii nutritive variate, cu sau fără suplimentarea cu regulatori de creștere, în vederea inițierii proceselor de micropropagare. Explanturile sterile au fost transferat în boxa laminară pe medii nutritive Murashige-Skoog [Murashige T., Skoog F.A., 1962], cu sau fără regulatori de creștere, în funcție de scopul experimentului.

Pentru a evalua eficiența metodelor de sterilizare aplicate, a fost realizată o analiză comparativă a procentului de explanturi viabile obținute în urma inoculării, prezentată în tabelul 3.2.

Tabelul 3.2. Rezultatele sterilizării materialului vegetal de *M. citrata* Ehrh.

Nr. d/o	Protocol de sterilizare	Nr. de probe inoculate	Nr. de probe finale	%
1.	**Metoda 1.** NaOCl de 5% + fungicid	30	15	50
2.	**Metoda 2.** NaOCl de 5%	30	8	24
3.	**Metoda 3.** $HgCl_2$ de 0,1%	30	20	60

Protocolul cu $HgCl_2$ de 0,1% a asigurat cel mai ridicat procent de supraviețuire (60%), dar necesită măsuri stricte de protecție da-

torită toxicității substanței. Asocierea NaOCl de 5% cu fungicid a condus la o eficiență medie (50%), însă mai sigură pentru manipulare. Utilizarea exclusivă a NaOCl a generat cel mai redus procent de probe viabile (24%), indicând o eficiență scăzută a metodei.

Deși rezultatele prezentate în tabelul 3.2 arată că tratamentul cu $HgCl_2$ de 0,1% a asigurat cel mai ridicat procent de supraviețuire al explanturilor (60%), trebuie luată în considerare toxicitatea ridicată a acestei substanțe. Clorura de mercur este un agent extrem de agresiv asupra țesuturilor vegetale, iar expunerea prelungită poate provoca brunificări, necroze și inhibarea regenerării pe termen lung. În plus, utilizarea $HgCl_2$ implică riscuri majore pentru sănătatea operatorului și necesită condiții speciale de manipulare și neutralizare a deșeurilor.

Prin comparație, metodele 1 și 2 (tab. 4.2), chiar dacă au condus la procente mai reduse de supraviețuire (50% și respectiv 24%), pot fi considerate mai puțin fitotoxice pentru că:

- Hipocloritul de sodiu este un agent oxidant moderat, utilizat frecvent în sterilizarea materialului vegetal, iar efectele sale sunt în general reversibile atunci când timpul de expunere este controlat.
- NaOCl nu are efecte cumulative toxice în țesuturi, spre deosebire de sărurile de mercur care se fixează și afectează metabolismul celular.
- Asocierea NaOCl cu un fungicid (metoda 1) a redus contaminările fără a compromite semnificativ viabilitatea, ceea ce arată o compatibilitate mai bună cu țesuturile vegetale.
- În plus, manipularea NaOCl este mai sigură, iar eliminarea soluțiilor reziduale nu ridică aceleași probleme de toxicitate și poluare ca $HgCl_2$.
- Astfel, chiar dacă procentul de explanturi viabile a fost mai mic în cazul metodelor 1 și 2, aceste protocoale pot fi considerate mai puțin fitotoxice și mai sustenabile pentru lucrări de rutină, în special atunci când se urmărește obținerea de culturi pe termen lung și în condiții de siguranță pentru operator.

În procesul de sterilizare a materialului vegetal, componentele plantei au fost separate în meristeme apicale, meristeme ale lăstarilor laterali, fragmente de internoduri și frunze, fiecare fiind plasată individual în pahare sterile, acoperite cu cutii Petri. Materialul biologic a fost spălat de 4-5 ori sub jet de apă de la rețea pentru îndepărtarea impurităților, urmat de un tratament cu o soluție de detergent și clătiri repetate până la eliminarea completă a detergentului. Tratarea cu fungicid timp de 30 minute cu o concentrație de 0,1%. Etapa de dezinfectare a inclus aplicarea a patru picături de permanganat de potasiu ($KMnO_4$), după care probele au fost spălate de 2-3 ori cu apă distilată. Apoi, explanturile au fost imersate timp de 10 minute într-o soluție de hipoclorit de sodiu de 5%, în amestec cu apă distilată și 2-3 picături de $KMnO_4$, fiind ulterior transferate în condiții de sterilitate, într-o boxă laminară.

Pentru sporirea eficienței sterilizării, s-a aplicat și un tratament suplimentar cu peroxid de hidrogen (H_2O_2) de 3% timp de 5 minute, urmat de o clătire finală cu apă distilată autoclavată. În etapa finală, explanturile dezinfectate au fost cultivate pe medii nutritive variate, cu sau fără adăugarea de regulatori de creștere.

În figura 3.3 sunt prezentate etapele principale ale inițierii culturii *in vitro* realizate pentru specia *M. citrata*.

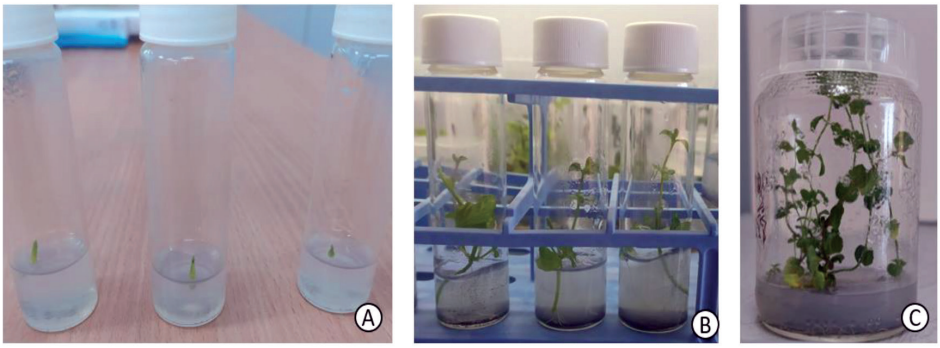


Fig. 3.3. Etapele principale ale culturii *in vitro* la *M. citrata* Ehrh.:
A – de inițiere a culturii; **B –** de dezvoltare a explantelor; **C –** de multiplicare

În prima etapă, de inițiere, explantatele de mentă au fost introduse pe mediu nutritiv steril pentru a stimula regenerarea. În etapa a

doua, explantatele au început să formeze lăstari, cu creștere vizibilă a masei vegetative. Urmată de etapa de multiplicare, în care lăstarii s-au dezvoltat mai puternic și s-au format mai multe plante, pregătite pentru faza de înrădăcinare.

Prezentarea acestor etape evidențiază importanța condițiilor controlate și a mediilor adecvate în succesul micropropagării plantelor de mentă. Observarea evoluției plantulelor pe parcursul etapelor de inițiere, dezvoltare și multiplicare oferă o imagine clară asupra eficienței protocolului utilizat.

În concluzie, au fost elaborate trei protocoale pentru inițierea culturilor *in vitro* la *M. citrata*. Alegerea protocolului optim de sterilizare a explanturilor este esențială pentru reducerea pierderilor și pentru obținerea unui procent ridicat de regenerare. Protocolul elaborat oferă o bază practică pentru extinderea culturilor de *M. citrata in vitro* și pentru viitoare studii privind producția de metaboliți secundari valoroși.

În cercetări ulterioare, au fost testați o serie de agenți de sterilizare, inclusiv substanțe chimice clasice (NaOCl, $HgCl_2$, H_2O_2, etanol), agenți naturali (albastru de metilen, $KMnO_4$) și fungicide comerciale, în vederea identificării celui mai eficient protocol de asepsizare a explanturilor de M. citrata pentru inițierea culturilor *in vitro*. Protocolul de sterilizare cu clorură de mercur de 0,1% a fost cel mai eficient, obținându-se o rată de supraviețuire a explanturilor de 60%. Totuși, utilizarea acestei substanțe implică riscuri majore, datorită toxicității ridicate atât pentru țesuturi, cât și pentru operator, necesitând măsuri speciale de siguranță. Protocolul combinat NaOCl de 5% + fungicid a reprezentat un compromis eficient între siguranță și eficiență (50% viabilitate), constituind o alternativă mai sustenabilă și cu efect fitotoxic redus, recomandată pentru lucrări de rutină sau pe termen lung. Hipocloritul de sodiu, aplicat în concentrații de 5%, s-a dovedit eficient pentru majoritatea explanturilor, însă expunerea prelungită a determinat brunificarea țesuturilor.

Utilizarea diferitelor surse de explant (meristeme apicale, frag-

mente de lăstari, frunze) a permis evaluarea capacității de regenerare și stabilirea etapelor cheie ale micropropagării. Creșterea și dezvoltarea plantelor de mentă în condiții de cultură *in vitro* sunt determinate în mare măsură de compoziția și concentrația regulatorilor de creștere a plantelor. Raportul dintre auxine și citokinine joacă un rol important în reglarea proceselor morfogenetice, precum dezvoltarea lăstarilor și înrădăcinarea. Este importantă selectarea concentrațiilor optime de fitohormoni ce permit creșterea eficienței micropropagării și obținerea unui material vegetal viabil și morfologic omogen. Mediul de cultură de bază Murashige-Skoog a fost suplimentat cu diferite concentrații de regulatori de creștere, în vederea stimulării efciente a proliferării lăstarilor și formarea de microcloni viabili (tab. 3.3).

Tabelul 3.3. Mediul nutritiv de bază MS suplimentat cu doze de regulatori de creștere pentru inducerea microclonilor la *M. citrata* Ehrh.

Nr.	Mediul nutritiv	BAP	2iP	AIA	ANA	AIB
1.	**MS**	0,20	-	0,1	-	-
2.	**MS**	0,50	-	0,1	-	-
3.	**MS**	0,70	-	0,1	-	-
4.	**MS**	-	-	0,3	-	-
5.	**MS**	-	-	-	0.3	-
6.	**MS**	-	-	-	-	0,3
7.	**MS**	-	0,1	-	-	-
8.	**MS**	-	0,3	-	-	-
9.	**MS 100%**					
10.	**MS 50 %**		-	-	-	-

Tabelul 3.4 prezintă efectele combinației hormonale BAP 0,3 mg/L și AIA 0,1 mg/L; BAP 0,5 + AIB 0,1 mg/L; BAP 0,7+ AIB 0,1 mg/L asupra parametrilor de creștere ai plantelor de mentă obținute *in vitro*. Din analiza datelor se observă variații în ceea ce privește numărul de lăstari, elongarea acestora, dezvoltarea masei vegetative,

precum și formarea frunzelor, internodurilor și a sistemului radicular. Per ansamblu, combinația hormonală utilizată favorizează o regenerare bună, însă răspunsul plantelor variază în funcție de explant și cantitatea de regulatori de creștere adugat în mediul nutritiv.

Tabelul 3.4. Creșterea și dezvoltarea plantelor de mentă pe diferite concentrații de regulatori de creștere vegetali (mg/L)

Nr. crt.	Variante	Nr. de lăstari per explant	Lungimea lăstarului, cm	Greutatea lăstarului, g	Numărul de frunze, unit.	Numărul de internoduri, unit.	Lungimea rădăcinilor, cm
1.	**BAP 0,3 + IAA**	4,67± 0,11	18,5±0,20	0,54± 0,012	24,7± 0,31	12,7± 0,13	7,82± 0,16
2.	**BAP 0,5 + IAA 0,1**	7,60± 0,15	19,6±0,19	0,44± 0,008	22,8± 0,26	13,7± 0,10	7,66± 0,22
3.	**BAP 0,7 + IAA 0,1**	10,00± 0,23	20,0±0,17	0,56±0,07	27,8± 0,12	14,2± 0,09	9,22± 0,19

Din datele prezentate în tabelul 3.4, se observă că suplimentarea mediului de cultură cu un amestec de citokinine (BAP) și auxine (AIA) a stimulat semnificativ regenerarea plantelor de mentă. Varianta nr. 3 (BAP 0,7 mg/L + AIA 0,1 mg/L) s-a dovedit a fi optimă, generând un număr maxim de 10 lăstari per explant, cu o creștere de peste 100% față de varianta martor (varianta nr. 1).

Un aspect remarcabil este corelația pozitivă între concentrația de BAP și dezvoltarea în lungime a plantelor. Deși în mod frecvent concentrațiile ridicate de citokinine pot cauza vitrificarea sau scurtarea internodurilor, în experimentul de față, plantele din varianta nr. 3 au atins cea mai mare lungime medie (20,04 cm) și cel mai mare număr de frunze (27,78).

Sistemul radicular a beneficiat, de asemenea, de echilibrul hormonal din varianta nr. 3, atingând o lungime medie de 9,22 cm. Această dezvoltare viguroasă a rădăcinilor este un indicator critic

pentru succesul etapei de *ex-vitro* (aclimatizarea în sol), garantând rata ridicată de supraviețuire.

Se recomandă utilizarea mediului îmbogățit cu BAP 0,7 mg/L și AIA 0,1 mg/L pentru protocoalele de micropropagare rapidă a mentei, datorită eficienței maxime în multiplicare și mențiune unei vigori superioare a plantelor.

Cea mai eficientă variantă pentru micropropagarea mentei este varianta nr. 3 (BAP 0,7 mg/L+AIA 0,1 mg/L). Aceasta asigură nu doar cea mai mare rată de multiplicare, ci și cele mai robuste plantule, fiind recomandată pentru optimizarea procesului de cultură *in vitro*.

Concentrația crescută de BAP (0,7 mg/L), asociată cu un nivel constant de auxină (AIA 0,1 mg/L), influențează creșterea și dezvoltarea plantelor de mentă în cultură *in vitro*. Această concentrație hormonală cu un nivel relativ ridicat de citokinine, care, în literatură, sunt cunoscute pentru stimularea puternică a multiplicării lăstarilor, dar și pentru potențiale efecte negative asupra elongării și rădăcinării atunci când sunt prezente în exces [Calalb T., Lozinschii M., 2026].

Per ansamblu, sistemul radicular este funcțional, dar variabil, ceea ce confirmă competiția hormonală dintre BAP și AIA la această concentrație. Mediul cu BAP 0,7 mg/L + AIA 0,1 mg/L induce o proliferare puternică a lăstarilor, rezultând cel mai mare număr de lăstari per explant comparativ cu concentrațiile anterioare (0,3 și 0,5 mg/L).

Această combinație hormonală este foarte eficientă pentru multiplicare rapidă, însă mai puțin optimă pentru alungirea lăstarilor și înrădăcinare uniformă. Este recomandabil ca lăstarii obținuți la 0,7 mg/L BAP să fie transferați ulterior pe medii cu mai multă auxină pentru stimularea rizogenezei și elongării.

Tabelul 3.5 prezintă variante ale mediului nutritiv de bază MS suplimentate cu diferite doze și combinații de regulatori de creștere a utilizării pentru inducerea microclonilor la *Mentha citrata* Ehrh.

În cadrul experimentului au fost testate citokininele BAP (6-benzilaminopurină) și 2iP (izopenteniladenină), care stimulează formarea și proliferarea lăstarilor în alături de auxinele AIA (acid

indol-3-acetic), ANA (acid naftalenacetic) și AIB (acid indol-3-butiric), regenerate și implicate vegetale.

Primele trei variante conțin concentrații crescătoare de BAP (0,2-0,5 mg/L), asociate cu doze reduse de AIA sau ANA, având ca scop stimularea creșterii și diferențierii lăstarilor.

Tabel 3.5. Influența auxinelor asupra creșterii lungimii plantulelor la mentă

Explant	ANA	AIB	AIA
Utilizarea *in vitro*	Inducerea calusului, organogeneză indirectă, rădăcini la unele specii	Inducerea rădăcinilor la explante, micropropagare	Inducerea rădăcinilor, formarea calusului (limitat)
Efecte principale	Stimulează calusul; rădăcini groase, uneori deformate	Rizogeneză foarte eficientă; induce rădăcini fine și numeroase	Stimulează alungirea celulelor, rizogeneză slabă

Variantele nr. 7-9 includ 2iP în concentrații de 0,1-0,5 mg/L, pentru a evalua efectul acestei citokinine asupra multiplicării microclonilor. În mediile din variantele nr. 4-6 sunt testate diferite combinații de auxine (AIA, ANA și AIB), fie singure, fie în asociere, pentru a favoriza formarea rădăcinilor și echilibrarea raportului de creștere–diferențiere. Variantele nr. 9 și 10, care nu conțin regulatori de creștere, servesc drept martori, permițând compararea răspunsului hormonal cu dezvoltarea naturală a plantelor.

În concluzie, rezultatele obținute evidențiază o abordare experimentală sistematică, prin care se testează efectul sinergic al diferitelor combinații de fitoreglatori asupra proceselor de regenerare *in vitro* la *Mentha citrata*. Scopul final al acestor variante este identificarea compoziției hormonale optime care să asigure o multiplicare eficientă și o dezvoltare morfologică echilibrată a microclonilor.

În condiții *in vitro*, comportamentul auxinelor AIA, AIB și

ANA diferă semnificativ stabilitatea chimice și vitezei de degradare în mediile MS. AIA, deși este auxina naturală, s-a dovedit a fi cea mai puțin eficientă în inducerea rădăcinilor, ceea ce este în concordanță cu literatura care raportează o degradare accelerată sub influența luminii și a pH-ului. În schimb, I a prezentat cea mai ridicată rizogenetică, generând rădăcini multe și considerate bine formate, fiindu-i un standard pentru micropropagare. ANA, caracterizată printr-o stabilitate ridicată în mediu, a favorizat formarea calusului și organogeneza indirectă; însă, la concentrații mari, a indus rădăcini hipertrofiate și o inhibare generală a creșterii. Rezultatele indică faptul că AIB este cea mai performantă auxină pentru rizogeneză *in vitro*, în timp ce ANA este mai potrivită pentru inducerea calusului, iar AIA are o utilizare limitată din cauza stabilității scăzute.

Aclimatizarea plantulelor de *Mentha citrata* Ehrh. Aclimatizarea plantulelor de mentă obținute *in vitro* a fost realizată gradual, în trei etape, cu control strict al umidității și temperaturii, pentru a reduce stresul post-transplant și a asigura adaptarea la mediu *ex vitro* (fig. 3.4).



Fig. 3.4. Etapele de aclimatizare a *Mentei citrata* Ehrh.:
1 – plante extrase din borcane; **2** – etapa inițială de aclimatizare; **3** – plante aclimatizate

Etapa 1 – adaptarea inițială la umiditate ridicată (2-3 săptămâni). Plantulele au fost transferate în vase cu substrat steril și acoperite cu folie transparentă pentru a menține sau umiditate relativă de 85-95%, necesită limitări transpirației în primele zile. Temperatura a fost menținută constant la 22-24 °C, condiții similare din cultura *in vitro*. Vaselor li s-a realizat aerisire și ventilare periodică pentru reducerea condensului și pentru inițierea adaptării treptate la aerul exterior.

***Etapa 2* – creșterea în umbră, fără folie.** După stabilizarea plantulelor, folia a fost complet îndepărtată. Plantele au fost plasate într-un mediu cu umbră sau lumină difuză (30-40% intensitate luminoasă), cu o umiditate moderată de 60-70%. Temperatura a fost menținută la 22-25 °C, evitând oscilațiile bruște. Această etapă a permis adaptarea stomatelor la transpirația normală și evitarea stresului luminos, favorizând întărirea țesuturilor și dezvoltarea rădăcinilor.

***Etapa 3* – transferul în ghivece, în semi-umbră și apoi la soare.** Plantele bine dezvoltate au fost transplantate în ghivece mai mari și plasate inițial în semi-umbră, cu o umiditate ambientală de 50-60% și temperaturi cuprinse între 20-28 °C. Ulterior, expunerea la soare a fost crescută treptat pentru a stimula fotosinteza și robustețea plantelor. Această etapă a finalizat adaptarea condițiilor *ex vitro*, pregătind plantele pentru creșterea în condiții standard de seră sau câmp.

Controlul treptat al umidității (de la 90% la 50%), al temperaturii (22-28 °C) și al intensității luminii a fost esențial pentru prevenirea șocului de transplant și pentru asigurarea unei rate ridicate de supraviețuire a plantulelor de mentă. Aclimatizarea a permis dezvoltarea completă a stomatelor, creșterea capacității fotosintetice și formarea unui sistem radicular funcțional, garantând stabilitatea plantelor în mediu *ex vitro*.

În concluzie, rezultatele obținute evidențiază importanța adaptării protocolului de sterilizare în funcție de particularitățile biologice ale explantelor de *Mentha citrata* Ehrh. Dintre agenții testați, combinațiile care au inclus hipoclorit de sodiu (1-5%) și etanol de 70% au demonstrat o eficiență ridicată în eliminarea contaminărilor, concomitent cu menținerea viabilității materialului vegetal. Utilizarea clorurii de mercur, deși eficientă, necesită o atenție deosebită din cauza potențialului fitotoxic, fiind recomandată doar în cazurile în care alte tratamente nu asigură un nivel satisfăcător de asepsie.

Tratamentul preliminar cu fungicide și agenți oxidativi (H_2O_2, $KMnO_4$) a contribuit la reducerea incidenței infecțiilor fungice, mai ales la explantele provenite din plante-mamă expuse la condiții de umiditate ridicată.

Rezultatele obținute evidențiază importanța optimizării etapelor de sterilizare și selecție a explantelor pentru dezvoltarea unor protocoale reproductibile și eficiente, aplicabile atât în conservarea și multiplicarea *in vitro* a speciilor de mentă cu valoare economică, cât și în direcții viitoare de cercetare privind biosinteza metaboliților secundari.

3.4. Biotehnologii de multiplicare *in vitro* a speciei *Mentha x piperita* L.

Izma de grădină (*Mentha x piperita* L.) este o plantă medicinală aromată erbacee perenă, din familia *Lamiaceae*, cunoscută sub mai multe denumiri populare: izmă de grădină, izmă bună, izmă de les, mintă, mintă de grădină, mintă de câmp, minta calului, mintă sălbatică. Este o plantă meliferă valoroasă ce produce nectar [Teleuţă A., Colţun M., Mihăilescu C., Ciocârlan N., 2008]. Mierea are o culoare chihlimbarie și o aromă plăcută de mentă. Nu există în sălbăticie. Este un hibrid dezvoltat în Anglia prin încrucișarea mentei de apă (*M. aquatica* L.) cu menta creață (*M. spicata* L.) [Mahdavikia F., Saharkhiz M.J., 2015].

Mentha x piperita L. este o plantă perenă cu rizom orizontal, ramificat și rădăcini subțiri, fibroase. Tulpina este erectă, înaltă de 30-100 cm, goală, tetraedrică, dreaptă, ramificată, dens foliată, glabră sau cu peri rari, scurți, presați. Frunzele sunt opuse, oblong-ovate, scurt pețiolate, acuminate, cu baza cordată și marginea ascuțit zimțată. Florile sunt mici, bisexuale sau pistilate, de culoare violet deschis, adunate la vârfurile lăstarilor în semi-verticiuri, formând inflorescențe în formă de spice (tirs). Corola este pentameră, ușor neregulată (bilabiată), rozalie sau violet pal. Înflorește de la sfârșitul lunii iunie până în septembrie [Akter K., Hoque M., 2018].

M. x piperita, este folosită încă din cele mai vechi timpuri datorită proprietăților sale aromatice. În Roma Antică era utilizată pentru a parfuma încăperile și a crea o atmosferă plăcută. În prezent, menta este utilizată pe scară largă în bucătăria diferitelor țări: în bucătăria

engleză – în sosurile pentru carne de miel; în cea americană – în băuturi și salate; iar în cea arabă, spaniolă și italiană – ca condiment. Ea intensifică gustul preparatelor din carne și legume, rămânând o componentă importantă a culturii gastronomice [Łyczko J. et al., 2020; Teixeira L.F. et al., 2026].

În medicină, frunzele de mentă sunt incluse în ceaiuri stomahice, carminative, sedative și coleretice, precum și în picături de mentă pentru greață, ca stimulent al poftei de mâncare și ca remediu antispastic pentru stomac. Din materia primă medicinală se obțin o tinctură și „apă de mentă". Principalul ingredient activ din preparatele de mentă este mentolul, care se găsește în uleiul esențial al plantei. Planta poate conține aproximativ 300 de constituenți volatili diferiți, în principal esteri, cetone și oxizi de terpene [Mahdavikia F., Saharkhiz M.J., 2015; Łyczko J. et al., 2020; Teixeira L.F. et al., 2026], dar cel mai important este mentolul [Łyczko J. et al., 2020], care aparține alcoolilor ciclici monoterpenici.

Pe lângă uleiul esențial, menta conține terpenoide (limonene, cineol, dipentenă), caroten, rutină, acizi ascorbic, ursolic și oleanolic, flavonoide, taninuri și oligoelemente. Este utilizată pentru boli inflamatorii ale tractului respirator superior, calmează durerile de cap și îmbunătățește pofta de mâncare [Łyczko J. et al., 2020]. Frunzele de mentă sunt populare în medicina populară. Sunt utilizate extern pentru nevralgie, ca antiseptic pentru inflamații, arsuri, afecțiuni ale tractului respirator superior, răgușeală, bronșită și bronșiectazie și dureri de dinți. De asemenea, sunt administrate intern pentru colici gastrointestinale și hepatice, ca astringent, antitusiv, greață și arsuri la stomac și ca sedativ pentru tensiunea nervoasă în timpul menopauzei [Sharan A.K. et al., 2014].

Mentolul, extras din uleiul esențial de *M. x piperita* L., este utilizat pe scară largă în medicină datorită proprietăților sale farmacologice. Acesta este folosit în tratarea flatulenței și a stenocardiei, face parte din compoziția medicamentelor pentru tratarea rinitei și a migrenelor și este, de asemenea, un component al unei serii de medicamente. Aceste preparate sunt utilizate în afecțiuni însoțite de spasme ale vaselor coronare și ale musculaturii netede [Mahdavikia F., Saharkhiz

M.J., 2015; Łyczko J. et al., 2020; Teixeira L.F. et al., 2026].

M. x piperita este una dintre cele mai căutate culturi medicinale din lume, utilizată pentru obținerea frunzelor de mentă și a uleiului esențial, precum și pentru producția de ceaiuri din plante, domeniu în care produsele ecologice ocupă un segment distinct. În etapa actuală a dezvoltării științelor biologice, se acordă o atenție deosebită elaborării unor abordări inovatoare pentru obținerea de material vegetal de calitate [Lozinschii M., Brînză L., Calalb T., Coropceanu E., 2025; Lozinschii M., Brînză L., Coropceanu E., Botezatu I., 2025; Lozinschii M., Brinza L., Mocreac N. și al., 2026].

În acest context, scopul prezentei lucrări a constat în elaborarea unui protocol eficient de înmulțire microclonală a speciei *Mentha* × *piperita* L., care să includă toate etapele cultivării *in vitro* (sterilizarea materialului vegetal, inițierea culturii pe diferite medii de cultură, microclonare, precum și aclimatizarea ulterioară a plantelor în condiții *ex vitro*).

Ca material biologic pentru micropropagare au fost utilizate noduri, meristeme apicale și laterale (fig. 3.5).



Figura 3.5. *Mentha x piperita* L.:
1 – explante; **2** – borcan cu explanturi de mentă

În calitate de explante pentru inoculare s-au utilizat segmentele de tulpină cu nod, mugurii adventivi și apicali. Explantele au fost

cultuvate în borcane de sticlă cu capacitatea de 250 ml și mangenta GA07. Inițierea culturilor *in vitro* a fost realizată în condiții aseptice, în hotă cu flux laminar de aer steril. După sterilizare, explanții de mentă au fost inoculați pe mediu nutritiv de bază Murashige-Skoog.

Tehnica de înmulțire microclonală a speciei *M. x piperita* în condiții *in vitro* a inclus mai multe etape succesive. Prima etapă a constat în sterilizarea materialului vegetal inițial. Sterilizarea explantelor a reprezentat o etapă critică, având în vedere originea naturală a materialului vegetal, care prezintă o încărcătură microbiană epifită ridicată (bacterii și fungi).

Protocolul de sterilizare a inclus următoarele etape: spălarea preliminară a materialului vegetal cu Fairy, pentru îndepărtarea impurităților și a grăsimilor de pe suprafața explantelor; menținerea sub jet de apă curentă timp de 20 minute; menținerea în diclorizocianurat de potasiu de 3% timp de 15 minute și adăugarea a 2 picături de Tween 20, agitare coninuă, 3 clătiri succesive cu apă autoclavată, tratament cu soluție de permanganat de potasiu timp de 30 minute trei clătiri succesive cu apă autoclavată. Agenții de sterilizare utilizați și efectele acestora sunt prezentați în tabelul 3.6.

Tabelul 3.6. Agenți chimici de sterilizare utilizați pentru explantele de mentă

Nr. d/o	Agentul de sterilizare	Durata, min	Efectul
1.	Detetergent Fairy	10	Îndepărtează impuritățile și grăsimile de pe suprafața explantelor.
2.	Tween 20	30	Acționează ca agent tensioactiv (surfactant), facilitând contactul dezinfectantului cu țesutul prin reducerea tensiunii superficiale.
3.	Dicloroizocianurat de potasiu (3%)	30	Agent bactericid și fungicid cu spectru larg, eliberează clor activ pentru eliminarea microorganismelor profunde.

5.	Permanganat de potasiu (0,005%)	30	Are efect oxidant, contribuind la sterilizarea suprafeței explantelor.
6.	Apă autoclavată	5	Elimină reziduurile chimice și reduce riscul de efecte toxice asupra explantelor.

Explantele inoculate au fost cultivate în camera de creștere, în condiții controlate de mediu. Temperatura de incubare a fost menținută la 23 °C, interval considerat favorabil pentru dezvoltarea culturilor. Regimul de iluminare a fost de 16 ore lumină și 8 ore întuneric.

Respectarea acestor parametri a fost esențială pentru evitarea stresului fiziologic, prevenirea necrozei țesuturilor și stimularea creșterii uniforme a explantelor. În plus, aceste condiții favorizează dezvoltarea organelor vegetative [Lozinschii M., Brinza L., Mocreac N. și al., 2026].

Pentru inițierea culturilor *in vitro* au fost testate trei variante de mediu nutritiv pe bază de MS: un mediu standard și două variante modificate. Compoziția mediilor este prezentată în tabelul 3.7.

Tabelul 3.7. Compoziția mediilor nutritive standard și modificate pentru inițierea culturilor in vitro de mentă

Nr. d/o	Componentul	MS standard	MS modificat (I)
1.	**MS: macro-, microelemente, Fe chelat, vitamine**	100%	100%
2.	**Mio-inositol (mg/L)**	100	50,0
3.	**Glicină (mg/L)**	2,0	2,0
4.	**BAP (mg/L)**	-	0,5
5.	**Zaharoză (mg/L)**	30 000	30 000
6.	**Agar (mg/L)**	6000	6000
	pH-ul	5,8	5,8

pH-ul mediilor a fost ajustat înainte de sterilizare. În variantele mo-

dificate, reducerea concentrației sărurilor minerale la ½ MS a urmărit diminuarea stresului osmotic asupra explantelor, iar suplimentarea cu BAP a avut rolul de a stimula diviziunea celulară și inițierea microbulbilor. Concentrația sporită de zaharoză a asigurat un aport energetic mai ridicat, iar cărbunele activ a contribuit la adsorbția compușilor fenolici și a excesului de regulatori de creștere, reducând brunificarea țesuturilor.

Pentru inducerea organogenezei au fost testate nouă variante experimentale ale mediului MS, diferențiate prin tipul și concentrația citokininei, prezența auxinei AIA, concentrația zaharozei și adaosul de cărbune activ (tab. 3.8).

Tabelul 3.8. Mediul nutritiv de bază MS suplimentat cu regulatori de creștere pentru inducerea și dezvoltarea organogenezei la mentă

Nr. d/o	Nr. mediului nutritiv	MS	BA, mg/L	AIA, mg/L	Cărbune activ, mg/L	Efecte
1.	**Nr. 1**	100	-	-	-	Creștere liniară, înrădăcinare spontană
2.	**Nr. 2**	1	-	-	250	Creștere viguroasă, înrădăcinare, colorație violacee
3.	**Nr. 3**	1/2	-	-	-	Creștere lentă, favorizează rizogeneza
4.	**Nr. 4**	1/2	-	-	250	Conservare, înrădăcinare, absența oxidării
5.	**Nr. 5**	1	0,3	-	-	Lăstărire multiplă moderată
6.	**Nr. 6**	1	0,5	-	-	Multiplicare optimă
7.	**Nr. 7**	1	0,7	-	-	Proliferare intensă

8.	**Nr. 8**	1	-	0,1	-	Înrădăcinare inițială, creștere echilibrată
9.	**Nr. 9**	1	-	0,3		Rizogeneză intensă, lăstari foarte viguroși

A fost utilizată citokinine: 6-benzilaminopurină în concentrații de 0,3; 0,5; 0,7 mg/L. Auxina AIA a fost adăugată în concentrație de 0,1-0,3 mg/L. Această schemă experimentală a permis evaluarea comparativă a efectului celor doi regulatori de creștere [Lozinschii M., Brinza L., Mocreac N., Bădulescu L., Batiru G., 2026].

Procesul de sterilizare a explantelor de *Mentha x piperita* L. a reprezentat o etapă critică, succesul poate fi determinat de utilizarea combinată a agenților antiseptici. Utilizarea dicloroizocianuratului de potasiu (3%) timp de 15 minute, suplimentat cu Tween 20, a asigurat o decontaminare eficientă a suprafețelor vegetale fără a compromite viabilitatea meristemelor. Tratamentul complementar cu permanganat de potasiu (30 min) a acționat ca un oxidant suplimentar, reducând drastic incidența infecțiilor fungice și bacteriene la momentul inoculării.

Literatura de specialitate reflectă un interes vast pentru optimizarea procesului de regenerare a speciei *Mentha x piperita* L., numeroase studii investigând eficiența diverselor tipuri și doze de regulatori de creștere de la 1,0-5,0 mg/L) [Akter K., Hoque M., 2018; Faure O., Diemer F., Moja S., Jullien F., 1998; Łyczko J. et al., 2020; Teixeira L. F. et al., 2026], demonstrându-se că fiecare combinație exercită efecte distincte asupra morfo- și organogenezei Aplicarea acestor regulatori, inclusiv în variante optimizate precum 0,5 mg·dm^{-3} BA sau asocieri de 0,5 mg·dm^{-3}. 2-iP cu 0,1 mg·dm^{-3} AIA, a confirmat rolul lor major în reducerea timpului de multiplicare și în direcția precisă a proceselor fiziologice necesare obținerii unor plante viabile [Łyczko J. et al., 2020].

În cadrul cercetărilor noastre, un obiectiv prioritar a fost optimizarea unor protocoale de multiplicare care să combine eficiența biologică cu sustenabilitatea economică. Astfel, ne-am propus eva-

luarea unor medii nutritional lipsite de regulatori de creștere, bazându-ne pe potențialul regenerativ endogen al plantei, precum și testarea unor variante suplimentate cu doze minime de fitoregulatori de creștere. Această strategie vizează reducerea semnificativă a costurilor de producție prin minimizarea consumului de reacții scumpi, asigurând în același timp obținerea unui material vegetal viguros și reducerea timpului de multiplicare necesar în condițiile de laborator.

Comportamentul explantelor pe mediile martor (nr. 1-4). Analiza dezvoltării pe variantele lipsite de regulatori de creștere a scos în evidență potențialul endogen de regenerare al speciei (tab. 3.9; fig. 3.6).

Tabelul 3.9. Dezvoltarea lăstarilor de mentă pe diferite variante de medii nutritive

Nr. d/o	Nr. mediului	Înălțimea lăstarului, cm	Numărul de lăstari per explant	Numărul de lăstari per borcan	Efectele
1.	Nr. 1	6,02±0,14	1	6	Creștere, înrădăcinare
2.	Nr. 2	7,11±0,18	1	6	Creștere, înrădăcinare
3.	Nr. 3	4,01±0,07	1	6	Creștere moderată, înrădăcinare
4.	Nr. 4	4,50±0,09	1	6	Creștere moderată, înrădăcinare
5.	Nr. 5	3,05±0,05	3-4	15-20	Proliferare de lăstari
6.	Nr. 6	9,10±0,23	5	30	Lăstărire multiplă
7.	Nr. 7	10,00±0,14	6	36	Lăstărire multiplă
8.	Nr. 8	8,20±0,11	1	6	Creștere viguroasă, formarea sistemului radicular puternic
9.	Nr. 9	10,17±0,22	1	6	Creștere viguroasă, formarea sistemului radicular puternic

Pe mediul nr. 1 (MS 100%), s-a observat menținerea dominanței apicale, lăstarii atingând o înălțime de 6-7 cm, cu o rată de multiplicare redusă (6 lăstari per recipient).

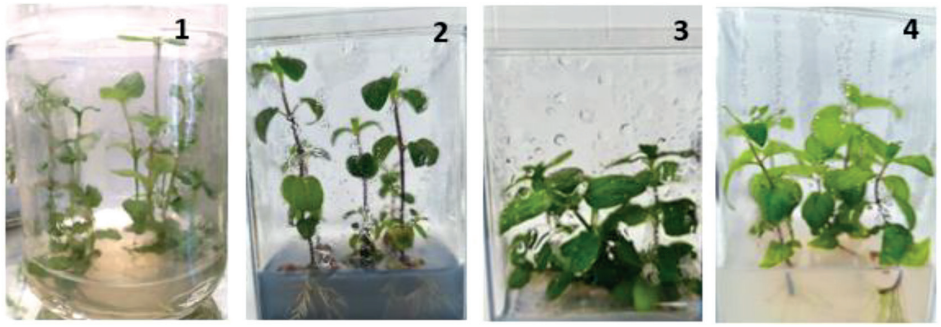


Fig. 3.6. Aspectul morfologic al explantelor de *M. x piperita* din variantele 1-4

Utilizarea mediilor de bază MS lipsite de regulatori de creștere a demonstrat că potențialul regenerativ al mentei permite o dezvoltare liniară sănătoasă, fiind o strategie ideală pentru menținerea vitalității și conservarea pe termen lung a culturii. Introducerea cărbunelui activ (250 mg/L) în varianta nr. 2 a generat un efect vizual și fiziologic distinct: lăstarii au prezentat o dinamică de creștere superioară și o colorație violacee intensă, semn al unui metabolism robust și al adaptării optime la condițiile *in vitro*.

În ceea ce privește varianta nr. 3 și nr. 4 (1/2 MS), reducerea concentrației de săruri minerale a diminuat stresul osmotic, aceste medii dovedindu-se ideale pentru conservarea pe termen lung a genofondului și pentru menținerea vigorii plantelor după perioade de stres hormonal.

Optimizarea ratei de multiplicare sub influența citokininelor (nr. 5-7). Suplimentarea mediului cu 6-benzilaminopurină a modificat radical procesul de organogeneză, rata de multiplicare fiind strâns corelată cu concentrația fitohormonului: La 0,3 mg/L BAP (nr. 5), s-a obținut o producție de 15-20 lăstari per borcan, însă talia acestora a fost redusă, având o medie de 3 cm (fig. 3.7).

Varianta nr. 6, suplimentată cu 0,5 mg/L BAP a reprezentat rezultatul optim al experimentului. S-a obținut un număr de 30 lăs-

tari per borcan, caracterizați printr-o vigoare excelentă și o lungime medie de 9 cm. Absența fenomenelor de vitrificare confirmă faptul că această concentrație este pragul fiziologic optim pentru mentă.

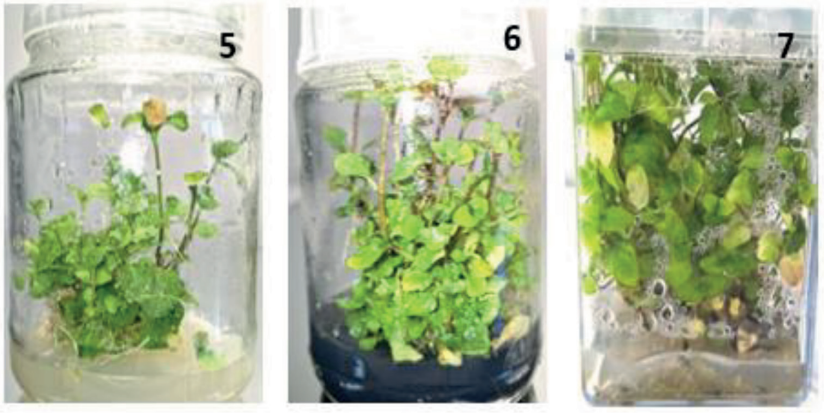


Fig. 3.7. Aspectul morfologic al explantelor de *Mentha x piperita* L. din variantele nr. 5-7

În varianta nr. 7, cu ados de 0,7 mg/L BAP, s-a înregistrat cel mai mare număr de lăstari (36 per borcan), calitatea biologică a acestora a scăzut vizibil, observându-se tulpini subțiri și frunze reduse dimensionale, semne ale unui început de stres hormonal.

Inducerea rizogenezei și pregătirea pentru aclimatizare aplantelor de *M. x piperita* din variantele 8-9. Etapa de înrădăcinare a fost maximizată pe mediile suplimentate cu auxine (fig. 3.8).

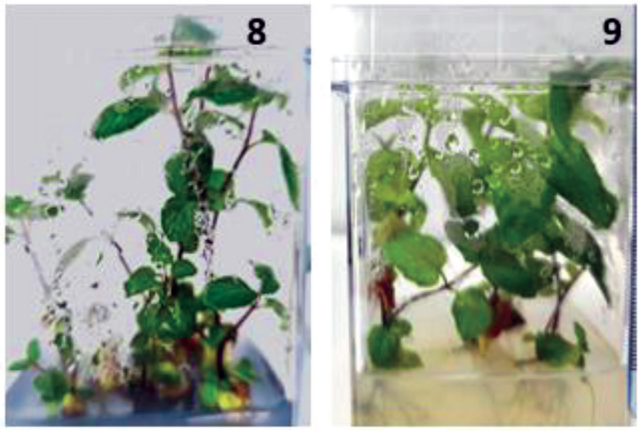


Fig. 3.8. Aspectul morfologic al explantelor de *Mentha x piperita* L. din variantele nr. 8-9

Varianta nr. 9 (0,3 mg/L AIA) a demonstrat cea mai mare eficiență, inducând formarea unor rădăcini adventive puternice, lungi și bine ramificate. Dezvoltarea unui sistem radicular robust în această fază este esențială, deoarece acesta va asigura suportul nutritiv necesar trecerii plantelor de la mediul heterotrof de laborator la cel autotrof, în etapa de aclimatizare [Lozinschii M., Brinza L., Mocreac N.; Badulescu L.; Batiru G., 2026].

În etapa de înrădăcinare, prezența auxinelor în variantele experimentale nr. 8 și nr. 9 a avut o influență semnificativă. Introducerea acidului indolilacetic în mediul nutritiv a devenit un factor determinant pentru desfășurarea cu succes a proceselor de rizogeneză. S-a stabilit că adăugarea acestui regulator de creștere nu doar că a stimulat formarea sistemului radicular, dar a contribuit și la dezvoltarea activă a părții aeriene a plantelor în comparație cu variantele fără utilizarea auxinelor.

Sistemul radicular format s-a remarcat prin vitalitate ridicată, ramificare bună și prezența numeroșilor perișori radiculari, care joacă un rol important în absorbția apei și a substanțelor minerale. Acest lucru a asigurat un metabolism mai eficient și a sporit potențialul de adaptare al plantelor în etapa de aclimatizare la condiții *ex vitro*.

Așadar, plantele tratate cu 0,3 mg/L AIA au prezentat o dezvoltare mai robustă a tulpinii și a aparatului foliar, asigurând astfel o bază biologică rezistentă pentru transferul din mediul steril în substratul *ex vitro.*

Adaptarea plantelor *Mentha x piperita* la condițiile *ex vitro.* Plantele microclonate de *M. x piperita*, după cultivarea *in vitro*, necesită o etapă de aclimatizare la condițiile *ex vitro*, întrucât se formează într-un mediu cu umiditate ridicată, schimb de gaze redus și iluminare scăzută. În acest context, plantele prezintă caracteristici anatomico-morfologice, precum cuticula subțire, dezvoltarea slabă a aparatului stomatal și capacitatea redusă de transpirație, ceea ce le face sensibile la stresul provocat de transferul în condiții nesterile.

Trecerea plantelor din mediul *in vitro* în mediul exterior repre-

zintă o etapă critică, care trebuie realizată treptat pentru a asigura adaptarea lor fiziologică.

Procesul de aclimatizare s-a desfășurat în câteva etape:

✓ **Transferul în substrat și adaptarea inițială.** Plantulele au fost extrase din recipientele de cultură, iar resturile de mediu agarizat au fost îndepărtate prin spălare atentă pentru a preveni dezvoltarea fungilor. Ulterior, acestea au fost transferate în tăvițe alveolare cu celule de volum redus (25-50 ml), utilizând-se un amestec de sol optimizat din comert cu pH de 5,5 (fig. 3.9).



Fig. 3.9. Adaptarea *M. citrata* Ehrh. în condiții *ex vitro*

În primele două săptămâni, plantele au fost menținute în camera climatică sub un regim strict controlat:

• **Umiditate relativă**: Menține la aproximativ 90% pentru a preveni deshidratarea lăstărilor care nu au încă o cuticulă completă dezvoltată.

• **Irigare și pulverizare**: Substratul a fost irigat moderat la un interval de 2-3 zile. Esențială a fost pulverizarea zilnică a plantelor

cu o peliculă fină de apă (pufuri), procedură necesară pentru a reduce stresul de transfer și a menține turgescența țesuturilor.

✓ **Adaptarea la condițiile camerei de creștere.** După primele 14 zile, plantele au fost scoase din incubator (camera climatică) și transferați într-o cameră specială amenajată (fig. 3.10).

În această fază, factorii fizici (intensitatea luminoasă, temperatura și umiditatea) au fost ajustați treptat pentru a stimula activitatea fotosintetică și întărirea țesuturilor protectoare. Această etapă permite plantelor să devină complet autotrofe și să se pregătească pentru transferul final în condițiile serii sau câmpului (fig. 3.10).



Fig. 3.10. Plante *M. x piperita* L. aclimatizate

Plantele prezintă o densitate mare de lăstari, cu tije erecte și internoduri bine dezvoltate. Frunzele au o colorație verde-închis, specifică unei activități fotosintetice intense. Absența necrozelor sau a semnelor de deshidratare confirmă faptul că mecanismele de transpirație și închiderea stomatelor funcționează corect. Se observă o nuanță violacee la nivelul tulpinilor, ceea ce indică un metabolism secundar activ și o adaptare reușită la intensitatea luminii din mediul

ex vitro. Toate exemplarele prezintă un stadiu de dezvoltare similar, ceea ce validează eficiența mediului nutritiv nr. 9 (0,3 mg/L AIA) în formarea unui sistem radicular capabil să susțină această biomasă aeriană bogată.

Figura 3.11 prezintă înflorirea plantelor de *M. x piperita* L., obținute prin microclonare în cultura *in vitro*, după transferul acestora și aclimatizarea cu succes la condițiile *ex vitro*.

Plantele se caracterizează printr-o dezvoltare morfologică normală și trecerea la faza generativă, ceea ce demonstrează menținerea viabilității, a potențialului de regenerare și a funcționalității complete după etapa de adaptare (tab. 3.10).



Fig. 3.11. Înflorirea în masă a plantelor de *M. x piperita* L. după aclimatizarea cu succes la condițiile *ex vitro*

Eficiența protocolului de micropropagare a fost confirmată prin monitorizarea indicatorilor biometrici pe următorii 60 de zile de transfer de plante în condiții *ex vitro*.

Tabelul 3.10. Dinamica de creștere în perioada de post aclimatizare

Criterii	După 21 de zile *ex vitro*, cm	După 60 de zile *ex vitro*, cm
Lungimea lăstarului	20,05 ± 0,26	35,20 ± 0,31
Numărul de lăstari	4,10 ± 0,08	18,11 ± 0,25
Numărul de internoduri	3,00 ± 0,05	8,20 ± 0,014
Vigurozitatea	++++	++++

Rezultatele sintetizate evidențiază o capacitate ridicată de adaptare și o vigoare vegetativă remarcabilă (tab. 3.10).

Analiza indicatorilor biometrici:

✓ ***Lungimea lăstarului***: În primele 21 de zile, plantele au atins o lungime de 20 cm, urmând ca până la finalul intervalului de 60 de zile să atingă o medie de 35 cm. Această creștere susținută demonstrează funcționalitatea deplină a sistemului radicular format *in vitro*.

✓ ***Capacitatea de ramificare***: Cel mai spectaculos indicator este numărul de lăstari, care a crescut de la 4 (la 21 de zile) la o medie de 18 lăstari per plantă după două luni. Această ramificare bogată indică o activitate metabolică intensă și o eliminare completă a stresului de aclimatizare.

✓ ***Dezvoltarea structurală***: Numărul de internoduri sa dublat (de la 3 la 8), fapt ce corelează cu alungirea tulpinii și creșterea suprafeței foliare disponibile pentru fotosinteză.

Vigoarea generală: Pe tot timpul perioadei monitorizate, plantele au menținut un grad maxim de vigoare (++++), caracterizat prin tije robust, frunziș den și o stare fitosanitară excelentă [Lozinschii M., Brinza L., Mocreac N., Bădulescu L., Batiru G., 2026].

În concluzie, s-a confirmat experimental posibilitatea de multiplicare a plantelor *Mentha x piperita* L. prin utilizarea culturilor de meristeme cultivate *in vitro*. Utilizarea succesivă a dicloroizocianuratului de potasiu (3%) și a permanganatului de potasiu (0,005%) a

asigurat sau rata ridicată de asepsie, demonstrând că acest protocol este o alternativă sustenabilă și eficientă pentru inițierea culturilor de mentă liberă de contaminare.

S-a constatat că, dintre mediile de cultură testate, cel mai eficient s-a dovedit a fi mediul nr. 6, care asigură acumularea maximă de biomasă în etapa de înmulțire, precum și mediul nr. 9, optim pentru înrădăcinare și pregătirea plantelor pentru transplantarea ulterioară în sol.

Succesul aclimatizării, demonstrat prin rezultatele obținute, confirmă validitatea utilizării mediului MS suplimentat cu 0,3 mg/L AIA pentru înrădăcinare, oferind plantelor rezervele necesare pentru o tranziție rapidă și o dezvoltare explozivă în substrat natural.

Utilizarea mediilor lipsite de regulatori de creștere sau cu doze minime de regulatori de creștere valorifică potențialul regenerativ natural al mentei, reducând considerabil costurile de laborator și riscul de vitrificare, fiind strategia ideală pentru conservarea pe termen lung ceea ce validează calitatea biologică superioară a materialului săditor obținut prin acest protocol.

4. *Galanthus plicatus* M. Bieb.: INIȚIEREA ȘI MULTIPLICAREA *IN VITRO*

4.1. Descrierea botanică, răspândirea geografică și statutul de conservare a speciei *Galanthus plicatus* M. Bieb.

Galanthus plicatus M. Bieb. (fig. 4.1), cunoscut sub denumirea populară de ghiocel-cutat, este o specie geofită, mezofilă, element floristic dobrogean-basarabean-tauric-caucazic, răspândită în România (Dobrogea), Republica Moldova (Cantemir) (fig. 4.2), Ucraina (reg. Cercas și Crimeea), nord-vestul Caucazului și în nordul Turciei [Dihoru Gh., Negrean G., 2009]. Specia se dezvoltă în păduri colinare și submontane de foioase, preferând solurile bogate în humus, cu umiditate moderată.



Fig. 4.1. Aspectul morfologic al plantei de *Galanthus plicatus* M. Bieb.



Fig. 4.2. R-nul Cantemir, habitatul speciei *Galanthus plicatus* M. Bieb. în Republica Moldova

În cadrul genului *Galanthus*, unele specii prezintă o distribuție geografică largă, în timp ce altele sunt limitate la areale restrânse.

De exemplu, *Galanthus nivalis* L. este răspândit într-o zonă extinsă a Europei, de la Pirinei până în Italia, nordul Greciei, Ucraina și Turcia europeană, în timp ce *Galanthus trojanus* A.P. Davis și Ozhatay N. (2008) este considerată o specie rară, fiind identificată într-o singură locație din vestul Turciei [Davis, Aaron P., Ozhatay N., 2008].

În prezent, majoritatea speciilor din genul *Galanthus* sunt incluse în liste de protecție la nivel internațional, fiind reglementate prin Convenția privind Comerțul Internațional cu Specii de Faună și Floră Sălbatică pe Cale de Dispariție (CITES), datorită riscurilor asociate recoltării excesive și comerțului necontrolat cu bulbi [International Union for Conservation of Nature, 2018]. Este de remarcat faptul că, în conformitate cu reglementările CITES, numai comunitățile rurale din multe țări au dreptul la recoltarea și comerțul limitat cu doar trei specii (*G. nivalis, G. elwesii* și *G. woronowii*) [Bishop M. și al., 2001].

Specia *G. plicatus* este inclusă în **Cartea Roșie a Republicii Moldova** (2015), categoria critic periclitată (CR). În Republica Moldova, această specie este înregistrată într-o singură locație naturală, în apropierea comunei Capaclia, raionul Cantemir, unde vegetează într-o pădure de gorun cu tei argintiu, populația ocupă o suprafață de aproximativ 2,5 ha și este protejată în cadrul Rezervației peisagistice „Codrii Tigheci", la o altitudine de 138 m. Arboretul, cu acoperirea coronamentului între 70-80%, este dominat de *Quercus petraeae* (Matt.) Liebl. în amestec cu *Tilia tomentosa* Moench, *Acer platanoides* L., *Carpinus betulus* L., *Cerasus avium* și *Acer campestre* L. Stratul arbustiv cu acoperirea de 30-50%, constituit din *Acer tataricum, Cornus mas* L, *Cotinus coggygria* Scop., *Crataegus monogyna* Jacq., *Euonymus europaeus* L., *E. verrucosus* Scop. și *Viburnum lantana*. Stratul erbaceu formează o acoperire generală de cca 90%. *Galanthus plicatus* M. Bieb. vegetează sporadic sau în grupuri mici, abundența+dominanța 1-2. Specii însoțitoare: *Adoxa moschatellina* L., *Aegopodium podagraria* L., *Anemonoides ranunculoides* (L.) Holub, *Anthriscus*

longirostris Bertol., *Arum orientale* M. Bieb., *Asarum europaeum* L., *Asparagus tenuifolius* Lam., *Campanula rapunculoides* L., *Carex brevicollis* DC., *Carex pilosa* Scop., *Convallaria majalis* L., *Corydalis marschalliana* Pers,, *C. solida* (L.) Clairv., *Euphorbia amygdaloides* L., *Ficaria verna* Huds., *Fritillaria montana* Hoppe, *Gagea lutea* (L.) Ker Gawl., *Geranium robertianum* L., *Geum urbanum* L., *Glechoma hirsuta* Waldst. & Kit., *Isopyrum thalictroides* L., *Lamium maculatum* (L.) L., *Mercurialis ovata* Sternb. et Hoppe, *Polygonatum hirtum* (Bosc. ex Poir.) Pursch, *P. multiflorum* (L.) All., *Scilla bifolia* L., *Stellaria holostea* L., *S. media* (L.) Vill., *Tulipa biebersteiniana* var. *biebersteiniana* L., *Veronica herderifolia* L., *Viola reichenbachiana* Jord., *V. suavis* M. Bieb.

4.2. Importanță ecologică și medicinală a speciei

Familia *Amaryllidaceae* reprezintă una dintre cele mai importante familii de plante din punct de vedere fitochimic, fiind inclusă printre cele aproximativ douăzeci de familii vegetale cunoscute pentru conținutul ridicat de alcaloizi biologic activi [Zhong J., 2013]. Această familie cuprinde aproximativ 1100 de specii de plante perene bulbacee, grupate în circa 85 de genuri, răspândite în special în regiunile tropicale și temperate calde ale lumii [Willis J.C., 1988]. Interesul științific pentru reprezentanții acestei familii este determinat în mare măsură de capacitatea lor de a produce o gamă largă de alcaloizi cu proprietăți farmacologice semnificative.

Genul *Galanthus* L. *(Amaryllidaceae*) include în prezent aproximativ 25 de specii de plante geofite perene, distribuite în mod natural în Europa și în regiunea Orientului Mijlociu. În flora Republicii Moldova sunt înregistrate 2 specii: *Galanthus nivalis* L. și *G. plicatus* M. Bieb. [Pînzaru P., 2023]. Aceste plante sunt apreciate atât pentru valoarea lor ornamentală, cât și pentru proprietățile medicinale bine documentate. Diversitatea alcaloizilor reprezintă una dintre cele mai distincte caracteristici fitochimice ale acestui gen. Până în prezent, în extractele speciilor de *Galanthus* au fost identificați aproximativ 127

de metaboliți secundari aparținând la 16 tipuri structurale, reprezentând circa 20% din totalul alcaloizilor cunoscuți din familia *Amaryllidaceae*. Printre metaboliții identificați pentru prima dată în plantele acestui gen se numără galantindolul, gracilina și plicamina. Deși cercetările fitochimice asupra genului *Galanthus* sunt încă incomplete, studiile existente evidențiază o diversitate structurală remarcabilă a alcaloizilor, dintre care numeroși metaboliți secundari prezintă activități biologice încă insuficient investigate [Georgiev B., Sidjimova B., Berkov S., 2024].

Alcaloizii specifici familiei *Amaryllidaceae* prezintă proprietăți biologice variate, incluzând activități anticolinesterazice, antibacteriene, antifungice, antivirale și anticancerigene. Un exemplu reprezentativ este galantamina, izolată inițial din *Galanthus woronowii* Losinsk., care este utilizată în prezent în tratamentul simptomelor bolii Alzheimer ca inhibitor de acetilcolinesterază aprobat pentru utilizare medicală. Un aspect important al speciei *G. plicatus* îl reprezintă valoarea medicinală, deoarece constituie una dintre sursele naturale de galantamină, alcaloid utilizat în tratamentul bolii Alzheimer și al altor afecțiuni neurologice. Exploatarea acestor resurse biologice a amplificat interesul economic pentru specie, crescând implicit riscul de diminuare a populațiilor naturale.

Alte molecule importante, precum licorina, narciclazina și pancratistatina, sunt cunoscute pentru activitatea lor citotoxică și antitumorală. Cu toate acestea, pentru numeroase tipuri structurale de alcaloizi identificate la speciile de *Galanthus*, inclusiv galantindolul sau gracilina, informațiile privind activitatea biologică rămân limitate, evidențiind necesitatea extinderii cercetărilor în acest domeniu.

4.3. Protocol de micropropagare

Populațiile naturale ale speciilor vegetale sunt supuse unui complex de factori de risc care contribuie la reducerea diversității genetice și la scăderea capacității de regenerare. Printre principalele amenințări se numără degradarea habitatelor naturale prin activități

antropice, precum defrișările, urbanizarea sau extinderea terenurilor agricole, precum și efectele schimbărilor climatice asupra regimului de temperatură și precipitații. În plus, colectarea excesivă a plantelor din flora spontană, introducerea speciilor invazive și fragmentarea ecosistemelor contribuie semnificativ la diminuarea populațiilor naturale. Aceste procese determină reducerea variabilității genetice și cresc vulnerabilitatea speciilor la factori biotici și abiotici, evidențiind necesitatea implementării unor strategii eficiente de conservare *in situ* și *ex situ*.

Având în vedere distribuția restrânsă a speciei *Galanthus plicatus* M. Bieb., presiunile antropice asupra populațiilor naturale și valoarea sa ecologică, ornamentală și farmacologică, dezvoltarea unor metode eficiente de multiplicare controlată devine esențială pentru conservarea acesteia. În acest context, tehnicile de micropropagare *in vitro* reprezintă o strategie biotehnologică promițătoare pentru conservarea *ex situ* a resurselor genetice vegetale și pentru obținerea unui material biologic uniform, necesar atât programelor de conservare, cât și cercetărilor fitochimice privind metaboliții secundari ai speciei.

Ca material biologic pentru micropropagare au fost utilizați bulbii speciei *G. plicatus* M. Bieb., proveniți de la plante mature, sănătoase. Bulbii au fost prelevați din habitatul natural al speciei (pădurea de gorun din preajma comunei Capaclia, raionul Cantemir), cu respectarea normelor de protecție a mediului și a principiilor de conservare a populațiilor naturale. Alegerea plantelor-donor a constituit o etapă importantă a cercetării, fiind selectate numai exemplare reprezentative pentru specie, cu caractere morfologice normale și fără simptome de infecții fitopatogene sau atacuri de dăunători.

Inițierea culturilor *in vitro* a fost realizată în condiții aseptice, în hotă cu flux laminar de aer steril. După sterilizare, bulbii de *G. plicatus* au fost inoculați pe mediu nutritiv de bază Murashige-Skoog, conținând macro- și microelemente, fier chelat și vitamine, suplimentat cu mio-inozitol, glicină, acid ascorbic și zaharoză, a mediului MS [Murashige T., Skoog F., 1962] (fig. 4.3).

Sterilizarea materialului vegetal

Sterilizarea explantelor a reprezentat o etapă critică, având în vedere originea naturală a materialului vegetal și riscul sporit de contaminare cu microorganisme epifite și endofite. În cazul geofitelor, în special al plantelor bulbifere, sterilizarea trebuie să asigure un echilibru între eficiența dezinfectării și menținerea viabilității țesuturilor.

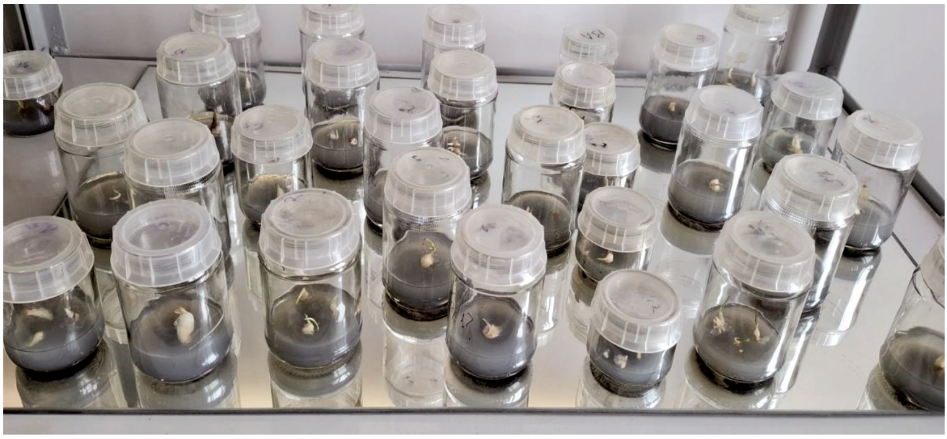


Fig. 4.3. Bulbi de ghiocel-plicat inoculați pe diferite variante ale mediului nutritiv MS

Spre deosebire de unele protocoale clasice, în care se utilizează clorura de mercur ($HgCl_2$) în concentrații de 0,1-0,2%, aceasta a fost exclusă din prezenta cercetare din cauza toxicității sale ridicate și a impactului ecologic negativ. În schimb, a fost elaborat un protocol de sterilizare mai blând și mai sustenabil, bazat pe utilizarea succesivă a mai multor agenți dezinfectanți, cu moduri complementare de acțiune.

Protocolul de sterilizare a inclus următoarele etape: spălarea preliminară a bulbilor cu detergent, pentru îndepărtarea impurităților și a grăsimilor de pe suprafața explantelor; menținerea sub jet de apă curentă timp de 2 ore; tratarea materialului vegetal timp de 30 minute cu antibiotic (ciprofloxacină), pentru limitarea contaminării bacteriene; tratarea timp de 30 minute cu soluție antifungică comercială, pentru prevenirea dezvoltării fungilor; spălări repetate cu apă autoclavată; tratament cu hipoclorit de sodiu; tratament cu soluție de permanganat de potasiu; tratarea timp de 10 minute cu soluție de

peroxid de hidrogen (H_2O_2) de 6%; trei clătiri succesive cu apă autoclavată; tratarea bulbilor timp de 1-3 minute cu alcool etilic de 70%; trei clătiri finale cu apă autoclavată.

Agenții de sterilizare utilizați și efectele acestora sunt prezentați în tabelul 4.1.

Tabelul 4.1. Agenți chimici de sterilizare utilizați pentru explantele de *Galanthus plicatus* M. Bieb.

Nr. d/o	Agentul de sterilizare	Durata, min	Efectul
1.	**Detetergent**	10	Îndepărtează impuritățile și grăsimile de pe suprafața explantelor
2.	**Antibiotic**	30	Inhibă creșterea bacteriilor
3.	**Soluție antifungică**	30	Previne dezvoltarea fungilor
4.	**Hipoclorit de sodiu**	45	Acționează ca agent dezinfectant puternic, distrugând microorganismele
5.	**Apă autoclavată**	5	Elimină reziduurile chimice și reduce riscul de efecte toxice asupra explantelor
6.	**Permanganat de potasiu**	30	Are efect oxidant, contribuind la sterilizarea suprafeței explantelor
7.	**H_2O_2 de 6%**	10	Degradează agenții patogeni prin acțiune oxidativă.
8.	**Apă autoclavată**	5	Elimină reziduurile chimice și reduce riscul de efecte toxice asupra explantelor

Aplicarea succesivă a mai multor sterilizanți a fost justificată prin faptul că materialul vegetal provenit din natură este limitat și valoros, iar pierderea explantelor ar putea compromite întreaga sursă de plante-mamă. Utilizarea combinată a agenților chimici a permis o dezinfectare eficientă, prin acțiune diferențiată asupra bacteriilor,

fungilor și sporilor, maximizând șansele de supraviețuire ale explantelor și reducând impactul asupra populațiilor naturale.

Condițiile de cultură

Explantele inoculate au fost cultivate în camera de creștere, în condiții controlate de mediu. Temperatura de incubare a fost menținută la 20-25 °C, interval considerat favorabil pentru dezvoltarea culturilor de geofite. Regimul de iluminare a fost de 16 ore lumină și 8 ore întuneric, iar intensitatea luminoasă a fost asigurată la 30-50 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, utilizând surse de lumină difuză de tip fluorescent sau LED cu spectru complet.

Respectarea acestor parametri a fost esențială pentru evitarea stresului fiziologic, prevenirea necrozei țesuturilor și stimularea creșterii uniforme a explantelor. În plus, aceste condiții favorizează atât dezvoltarea organelor vegetative, cât și acumularea compușilor de rezervă specifici organelor bulbifere.

Mediile nutritive pentru inițierea culturilor in vitro

Pentru inițierea culturilor *in vitro* au fost testate trei variante de mediu nutritiv pe bază de MS: un mediu standard și două variante modificate. Compoziția mediilor este prezentată în tabelul 4.2.

Tabelul 4.2. Compoziția mediilor nutritive standard și modificate pentru inițierea culturilor *in vitro* de *G. plicatus* M. Bieb.

Nr. d/o	Componentul	MS standard	MS modificat (I)	MS modificat (II)
1.	**MS: macro-, micro-elemente, Fe chelat, vitamine**	100%	100%	50 %
2.	**Mio-inositol (mg/L)**	100	50,0	100,0
3.	**Glicină (mg/L)**	2,0	2,0	2,0
4.	**BAP (mg/L)**	-	0,5	1,0
5.	**Acid ascorbic (mg/L)**	50,0	50,0	50,0

6.	**Zaharoză (mg/L)**	30 000	30 000	45000
7.	**Agar (mg/L)**	6000	6000	7000
8.	**Cărbune activ (mg/L)**	-	1000	1000
pH-ul mediilor a fost ajustat la 5,8 înainte de sterilizare				

În variantele modificate, reducerea concentrației sărurilor minerale la ½ MS a urmărit diminuarea stresului osmotic asupra explantelor, iar suplimentarea cu BAP a avut rolul de a stimula diviziunea celulară și inițierea microbulbilor.

Concentrația sporită de zaharoză a asigurat un aport energetic mai ridicat, iar cărbunele activ a contribuit la adsorbția compușilor fenolici și a excesului de regulatori de creștere, reducând brunificarea țesuturilor.

Mediile nutritive pentru inducerea microbulbilor

Pentru inducerea microbulbilor au fost testate opt variante experimentale ale mediului MS, diferențiate prin tipul și concentrația citokininei, prezența auxinei IBA, concentrația zaharozei și adaosul de cărbune activ (tab. 4.3).

Tabelul 4.3. Mediul nutritiv de bază MS suplimentat cu regulatori de creștere pentru inducerea și dezvoltarea microbulbilor la *G. plicatus*

Nr. d/o	Nr. mediului	Citokinine	Doza CK, (mg/L)	Auxine	Doza auxine, (mg/L)	Zaharoză, g/L	Cărbune activ, g/L	Numarul bulbililor generați per explant
1.	Nr. 1	BAP	0,5	-	-	45	0	2,9 ± 0,05
2.	Nr. 2	BAP	1,0	AIB	0,5	45	0	5 ± 0,06
3.	Nr. 3	BAP	1,5	AIB	0,5	45	0	15 ± 0,11
4.	Nr. 4	BAP	2,0	AIB	0,5	60	0	24 ± 0,43

5.	Nr. 5	2IP	0,5	-	-	45	1,0	5 ± 0,02
6.	Nr. 6	2IP	1,0	AIB	0,5	45	1,0	11 ± 0,09
7.	Nr. 7	2IP	1,5	AIB	0,5	45	1,0	19 ± 0,14
8.	Nr. 8	2IP	2,0	AIB	0,5	60	1,0	21 ± 0,21
9.	Nr. 9	-	-	AIB	0,5	45		-
10.	Nr. 10	-	-	-	-	45		-

Au fost utilizate două citokinine: 6-benzilaminopurină și N6-(2-izopentenil)adenină, fiecare în concentrații de 0,5; 1,0; 1,5 și 2,0 mg/L. În majoritatea variantelor, auxina AIB a fost adăugată în concentrație de 0,5 mg/L.

Această schemă experimentală a permis evaluarea comparativă a efectului celor două citokinine, precum și a interacțiunii lor cu AIB și cu nivelurile de zaharoză asupra inducerii și dezvoltării microbulbilor.

Micropropagarea speciilor aparținând genului *Galanthus* a constituit obiectul mai multor cercetări anterioare, care au demonstrat eficiența culturilor *in vitro* pentru multiplicarea rapidă a materialului vegetal și conservarea *ex situ* a resurselor genetice. Astfel, Tipirdamaz R., Ellialtıoğlu Ș., Çakırlar H. (1999) au evidențiat influența tipului de explant, a sursei de carbohidrați și a pH-ului mediului asupra regenerării la *Galanthus ikariae*. Tilly-Mandy A., Jambor-Benczur E., Szabo J. (2006), precum și Staikidou I., Selby C., Hanks G. (2006), au subliniat importanța regulatorilor de creștere și a concentrației zaharozei în stimularea formării bulbeților la diferite specii de *Galanthus*. Ulterior, Malyarovskaya și colaboratorii (2018) au elaborat protocoale eficiente pentru multiplicarea și conservarea *in vitro* a speciei *Galanthus woronowii*, iar Asadi N. și colab. (2021) au analizat stabilitatea materialului regenerat și riscul variației somaclonale. În ansamblu, aceste cercetări confirmă faptul că succesul micropropagării depinde de optimizarea etapelor de inițiere, multiplicare și regenerare, concluzie confirmată și de rezultatele obținute în prezentul studiu pentru *G. plicatus* M. Bieb.

Pentru optimizarea protocolului de micropropagare a speciei *G. plicatus*, au fost evaluate mai multe variante ale mediului nutritiv

Murashige-Skoog, diferențiate prin tipul și concentrația regulatorilor de creștere, precum și prin nivelul de zaharoză utilizat. Răspunsul explantelor a fost analizat în funcție de numărul de microbulbi generați per explant, precum și de caracteristicile morfologice ale structurilor regenerate [Lozinschii M., Muntean N., Brînză L., Călugăru-Spătaru T., Coropceanu E., 2026].

Inițierea culturilor in vitro și importanța sterilizării explantelor

Pentru speciile aparținând genului *Galanthus* L., explantele utilizate frecvent în culturile *in vitro* includ bulbii întregi, solzii de bulb și meristemele apicale sau laterale. Aceste tipuri de explant sunt caracterizate prin prezența țesuturilor meristematice active, cu o capacitate ridicată de diviziune celulară și regenerare, ceea ce favorizează inducerea organogenezei și formarea structurilor bulbifere în condiții de cultură controlate. Utilizarea bulbilor sau a solzilor de bulb ca material inițial este raportată în studiile de micropropagare ale genului *Galanthus* L., datorită potențialului lor ridicat de regenerare și stabilitate morfogenetică [Staikidou I. și colab., 2006; Malyarovskaya V.I. și colab., 2018].

În prezenta cercetare, bulbii introduși în cultură au fost monitorizați după inoculare pentru a evalua viabilitatea explantelor și adaptarea acestora la mediul artificial. Inițierea culturilor *in vitro* a impus aplicarea unui protocol riguros de sterilizare, deoarece materialul vegetal provenit din habitat natural prezintă frecvent o încărcătură microbiologică ridicată, determinată de microorganisme epifite și endofite. Contaminarea microbiană reprezintă una dintre principalele cauze ale eșecului culturilor *in vitro*, fiind necesară utilizarea unor proceduri eficiente de decontaminare [George E.F. și colab., 2008].

Protocolul de sterilizare utilizat a implicat aplicarea succesivă a mai multor agenți dezinfectanți, inclusiv detergent, antibiotic, fungicid, hipoclorit de sodiu, permanganat de potasiu, peroxid de hidrogen și alcool etilic de 70% (tab. 4.1). Aplicarea combinată a acestor substanțe a permis eliminarea eficientă a microorganismelor de pe supra-

fața explantelor, asigurând simultan menținerea viabilității țesuturilor vegetale. Eficiența protocolului a fost evaluată prin procentul de explante care au rămas simultan sterile și viabile după inoculare, valorile obținute situându-se în intervalul 80-95%, ceea ce confirmă adecvarea metodei pentru inițierea culturilor *in vitro* de *G. plicatus*.

Un aspect important al protocolului elaborat îl reprezintă excluderea clorurii de mercur ($HgCl_2$), un sterilizant puternic utilizat frecvent în cultura țesuturilor vegetale, dar caracterizat prin toxicitate ridicată și potențial fitotoxic. Înlocuirea acestuia cu agenți dezinfectanți mai puțin agresivi contribuie la reducerea impactului toxicologic al procedurii și la creșterea sustenabilității metodei, aspect deosebit de relevant în cazul speciilor rare sau protejate [Cassells A.C., 2012].

După inoculare, explantele au prezentat o colorație alb-gălbuie caracteristică etapelor inițiale de proliferare celulară (fig. 4.4). În unele cazuri au fost observate brunificări ușoare la nivelul țesuturilor apicale, fenomen asociat oxidării compușilor fenolici eliberați de explante ca răspuns la stresul mecanic și chimic generat de procesul de sterilizare și transferul pe mediu nutritiv artificial. Oxidarea fenolică reprezintă un fenomen frecvent în culturile *in vitro* ale plantelor provenite din habitat natural și poate inhiba creșterea explantelor dacă nu este controlată corespunzător [Thomas T.D., 2008].

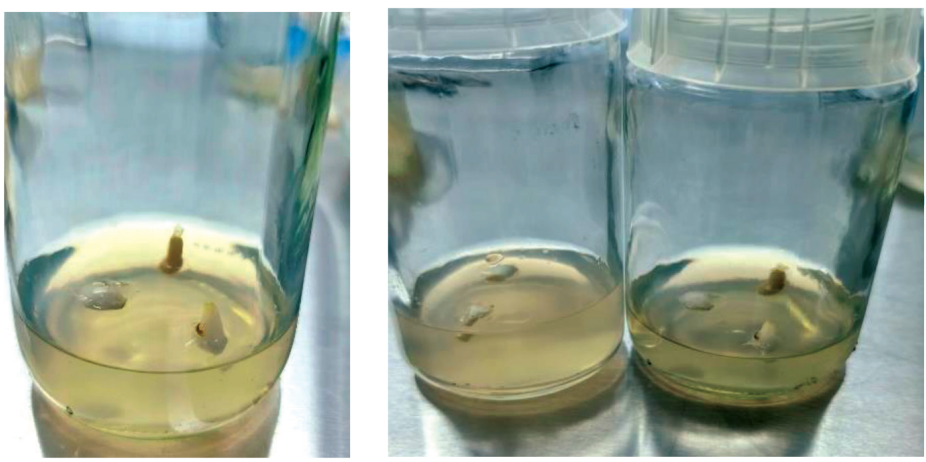


Fig. 4.4. Explante inoculate pe mediul ½ MS modificat (II)

Pentru a reduce acest efect, mediile nutritive au fost suplimentate cu acid ascorbic și cărbune activ, aditivi cunoscuți pentru rolul lor în stabilizarea culturilor *in vitro* (tab. 4.2). Acidul ascorbic acționează ca antioxidant, inhibând oxidarea compușilor fenolici, în timp ce cărbunele activ adsoarbe substanțele fenolice și excesul de regulatori de creștere din mediul nutritiv [Thomas T.D., 2008], contribuind la menținerea unui mediu favorabil dezvoltării explantelor. Utilizarea acestor aditivi a permis reducerea brunificării și menținerea viabilității culturilor în faza de inițiere.

Analiza comparativă a variantelor de mediu nutritiv a evidențiat că formularea modificată bazată pe ½ MS, suplimentată cu 1,0 mg/L BAP, 100 mg/L mio-inozitol, 45 g/L zaharoză, 7 g/L agar și 1 g/L cărbune activ a oferit cele mai favorabile condiții pentru stabilizarea culturilor *in vitro* de *Galanthus plicatus*. Reducerea concentrației sărurilor minerale a contribuit la diminuarea stresului osmotic asupra explantelor, în timp ce BAP a stimulat activitatea meristematică și inițierea structurilor bulbifere. Prezența cărbunelui activ a limitat oxidarea compușilor fenolici eliberați de explante, prevenind brunificarea țesuturilor. În aceste condiții, mediul nutritiv menționat poate fi considerat adecvat pentru etapa de inițiere și stabilizare a culturilor *in vitro* ale speciei investigate. Rezultate similare au fost raportate și pentru alte specii geofite, unde reducerea concentrației sărurilor minerale și utilizarea cărbunelui activ au contribuit la stabilizarea culturilor în fazele inițiale ale micropropagării [George E.F. și al., 2008; Thomas T.D., 2008].

În ansamblu, rezultatele obținute evidențiază importanța optimizării protocolului de sterilizare și a compoziției mediului nutritiv pentru inițierea cu succes a culturilor *in vitro* de *Galanthus plicatus*. Aplicarea unei proceduri eficiente de decontaminare, combinată cu utilizarea antioxidanților și a adsorbanților fenolici, constituie un factor determinant pentru stabilizarea culturilor și pentru dezvoltarea ulterioară a unui sistem eficient de micropropagare.

Inducerea și multiplicarea microbulbilor

Inducerea microbulbilor reprezintă o etapă esențială în micropropagarea speciilor geofite, deoarece aceste structuri bulbifere constituie organe de rezervă capabile să susțină regenerarea plantelor și adaptarea ulterioară la condițiile *ex vitro*. Formarea microbulbilor este influențată în mod direct de compoziția mediului nutritiv, în special de tipul și concentrația regulatorilor de creștere, precum și de nivelul sursei de carbon disponibile în cultură.

În cadrul prezentului studiu au fost evaluate mai multe variante ale mediului nutritiv Murashige-Skoog, diferențiate prin tipul citokininei utilizate (BAP sau 2iP), prezența auxinei AIB și prin nivelul de zaharoză adăugat mediului de cultură. Scopul acestor experimente a fost identificarea combinației optime de factori care să stimuleze inducerea și proliferarea microbulbilor la *G. plicatus* M. Bieb.

Rezultatele experimentale privind eficiența mediilor nutritive sunt prezentate în tabelul 4.3, unde este indicat numărul mediu de microbulbi generați per explant pentru fiecare variantă de mediu testată. Analiza datelor evidențiază faptul că toate mediile suplimentate cu citokinine au susținut formarea structurilor bulbifere, însă intensitatea răspunsului morfogenetic a variat în funcție de combinația hormonală și de concentrația zaharozei utilizate.

În seria mediilor suplimentate cu 6-benzilaminopurină s-a observat o creștere progresivă a numărului de microbulbi generați per explant odată cu majorarea concentrației regulatorului de creștere. Astfel, la concentrația de 0,5 mg/L BAP s-au obținut în medie 2,9 ± 0,05 microbulbi/explant (mediul nr. 1), ceea ce indică o activitate meristematică moderată în absența auxinei. Introducerea acidului indolilbutiric în concentrație de 0,5 mg/L a determinat o amplificare evidentă a răspunsului morfogenetic, iar pe mediul suplimentat cu 1,0 mg/L BAP + 0,5 mg/L AIB s-au format 5 ± 0,06 microbulbi/explant (mediul nr. 2). Creșterea suplimentară a concentrației de BAP la 1,5 mg/L (mediul nr. 3), menținând aceeași doză de auxină, a determinat o intensificare accentuată a proliferării, generând 15 ± 0,11 microbulbi/explant. Cea mai mare rată de multiplicare a fost înregis-

trată pe mediul suplimentat cu 2,0 mg/L BAP + 0,5 mg/L AIB și 60 g/L zaharoză (mediul nr. 4), unde s-au obținut 24 ± 0,43 microbulbi/explant, ceea ce reflectă o stimulare intensă a diviziunii celulare și a proceselor de organogeneză.

Un răspuns comparabil, deși ușor inferior din punct de vedere numeric, a fost observat în seria mediilor suplimentate cu N6-(2-izopentenil)adenină (2iP). Astfel, mediul cu 0,5 mg/L 2iP a generat 5 ± 0,02 microbulbi/explant (mediul nr. 5), iar creșterea concentrației la 1,0 mg/L 2iP + 0,5 mg/L AIB a determinat formarea a 11 ± 0,09 microbulbi/explant (mediul nr. 6). La concentrația de 1,5 mg/L 2iP + 0,5 mg/L AIB s-au obținut 19 ± 0,14 microbulbi/explant(mediul nr. 7), iar pe mediul cu 2,0 mg/L 2iP + 0,5 mg/L IBA și 60 g/L zaharoză s-au format 21 ± 0,21 microbulbi/explant (mediul Nr. 8), (fig. 4.5). Aceste rezultate indică faptul că 2iP poate susține eficient proliferarea structurilor bulbifere, însă efectul său asupra multiplicării este ușor mai redus comparativ cu BAP.

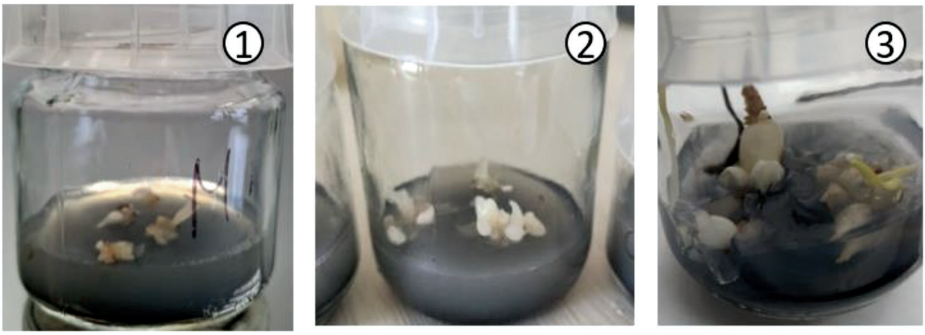


Fig. 4.5. Medii nutrive suplimentate cu 2-iP:
1 – 0,5 mg/L; **2** – 1,0 mg/L; **3** – 1,5 mg/L

Diferențele dintre cele două citokinine pot fi explicate prin mecanismele lor fiziologice distincte. BAP este cunoscută pentru efectul său mitogenic puternic asupra celulelor meristematice, stimulând diviziunea celulară și inițierea structurilor organogenetice. În schimb, 2-iP este considerată o citokinină cu acțiune mai apropiată de echilibrul hormonal natural al plantelor, ceea ce poate conduce la o diferențiere mai uniformă a țesuturilor regenerate, însă cu o rată numerică ușor mai redusă [George E.F. și al., 2008].

Rolul auxinei AIB în stimularea organogenezei a fost evident în majoritatea variantelor experimentale. Compararea mediilor fără auxină cu cele suplimentate cu 0,5 mg/L AIB arată că asocierea citokinină-auxină a determinat o creștere semnificativă a ratei de proliferare a microbulbilor. Acest efect este bine documentat în literatura de specialitate, unde raportul dintre citokinine și auxine este considerat un factor determinant pentru direcționarea proceselor de organogeneză și regenerare [George E.F. și al., 2008; Cassells A.C., 2012].

Un alt factor major care a influențat inducerea microbulbilor a fost concentrația de zaharoză. Creșterea nivelului acesteia de la 45 g/L la 60 g/L a fost asociată cu cele mai ridicate valori ale multiplicării. Zaharoza joacă un rol esențial în culturile *in vitro* ale geofitelor, deoarece reprezintă principala sursă de carbon pentru metabolismul explantelor și, în același timp, acționează ca factor osmotic care favorizează acumularea carbohidraților și formarea organelor de rezervă [Thomas T.D., 2008].

Compararea acestor rezultate cu cele raportate pentru alte specii ale genului *Galanthus* indică faptul că tendințele observate în studiul de față sunt în concordanță cu literatura de specialitate. Tipirdamaz R., Ellialtıoğlu Ș., Çakırlar H. (1999) au demonstrat că la *G. ikariae* concentrațiile ridicate de zaharoză (aproximativ 60 g/L) stimulează semnificativ formarea bulbeților *in vitro*. De asemenea, Staikidou I., Selby C., Hanks G. (2006) au evidențiat rolul important al cărbunelui activ în stimularea creșterii bulbeților la specii de *Galanthus* cultivate *in vitro*, demonstrând că asocierea acestuia cu concentrații ridicate de zaharoză poate amplifica semnificativ dezvoltarea structurilor bulbifere.

Rezultate similare au fost raportate și pentru *G. woronowii*, unde Malyarovskaya V. și colaboratorii (2018) au arătat că mediile suplimentate cu BAP pot stimula regenerarea explantelor, însă rata de multiplicare raportată a fost mai redusă decât cea obținută în prezentul studiu. Această diferență poate reflecta particularități biologice specifice speciei *G. plicatus*, dar și optimizarea combinației hormonale utilizate.

Tendințe comparabile au fost observate și la alte geofite bul-

bifere ornamentale. În studiile realizate asupra genului *Narcissus*, mediile nutritive suplimentate cu citokinine în combinație cu auxine au favorizat proliferarea meristematică și regenerarea structurilor vegetative *in vitro* [Santos A. et al., 2002]. Rezultate similare au fost raportate și pentru *Hyacinthus orientalis*, unde interacțiunea dintre auxine și citokinine pe mediul MS a influențat semnificativ inducerea morfogenezei și dezvoltarea plantulelor regenerate [El-Naggar H.M. și colab., 2023]. În mod similar, cercetările realizate asupra altor geofite bulbifere, precum speciile de *Lilium*, au arătat că concentrațiile ridicate de zaharoză (45-60 g/L) stimulează formarea și dezvoltarea bulbililor *in vitro*, prin favorizarea acumulării carbohidraților necesari formării organelor de rezervă [Azadi P., Khosh-Khui M., 2007].

Un rol important în stabilitatea culturilor a fost atribuit și cărbunelui activ, care poate adsorbi compușii fenolici eliberați de explante și excesul de regulatori de creștere din mediul nutritiv. Prin această acțiune, cărbunele activ contribuie la stabilizarea culturilor și la prevenirea brunificării țesuturilor, fenomen frecvent întâlnit în culturile *in vitro* ale geofitelor [Thomas T.D, 2008].

În ansamblu, rezultatele obținute indică faptul că microbulbificarea la *G. plicatus* este optim stimulată de combinațiile hormonale bazate pe 2,0 mg/L citokinină (BAP sau 2iP), 0,5 mg/L AIB și concentrații ridicate de zaharoză (60 g/L). Comparativ cu alte specii ale genului *Galanthus* și cu alte geofite bulbifere cultivate *in vitro*, rata de multiplicare obținută în prezentul studiu poate fi considerată ridicată, ceea ce confirmă eficiența protocolului elaborat și relevanța acestuia pentru multiplicarea rapidă și conservarea *ex situ* a speciei investigate.

Etapele de maturare a microbulbilor

După etapa de multiplicare, microbulbii obținuți *in vitro* au fost transferați pe medii nutritive destinate maturării și dezvoltării acestora. Această fază a avut ca obiectiv stimularea creșterii în dimensiune a bulbilor și acumularea substanțelor de rezervă necesare pentru dezvoltarea ulterioară a plantulelor. Explantele au fost cultivate timp de aproximativ 8 săptămâni pe fiecare variantă de mediu (fig. 4.6).

Transferul microbulbilor pe mediu Murashige-Skoog în concentrație 100%, suplimentat cu acid indolilbutiric în concentrație de 0,5 mg/L și 45 g/L zaharoză, a favorizat dezvoltării bulbilor (mediul nr. 9). Ulterior, cultivarea pe mediu MS fără regulatori de creștere, dar cu 45 g/L zaharoză (mediul nr. 10), a permis maturizarea microbulbilor și acumularea rezervelor metabolice. În această etapă, concentrația relativ ridicată de zaharoză a jucat un rol esențial în susținerea metabolismului explantelor și în acumularea carbohidraților necesari formării organelor de rezervă.

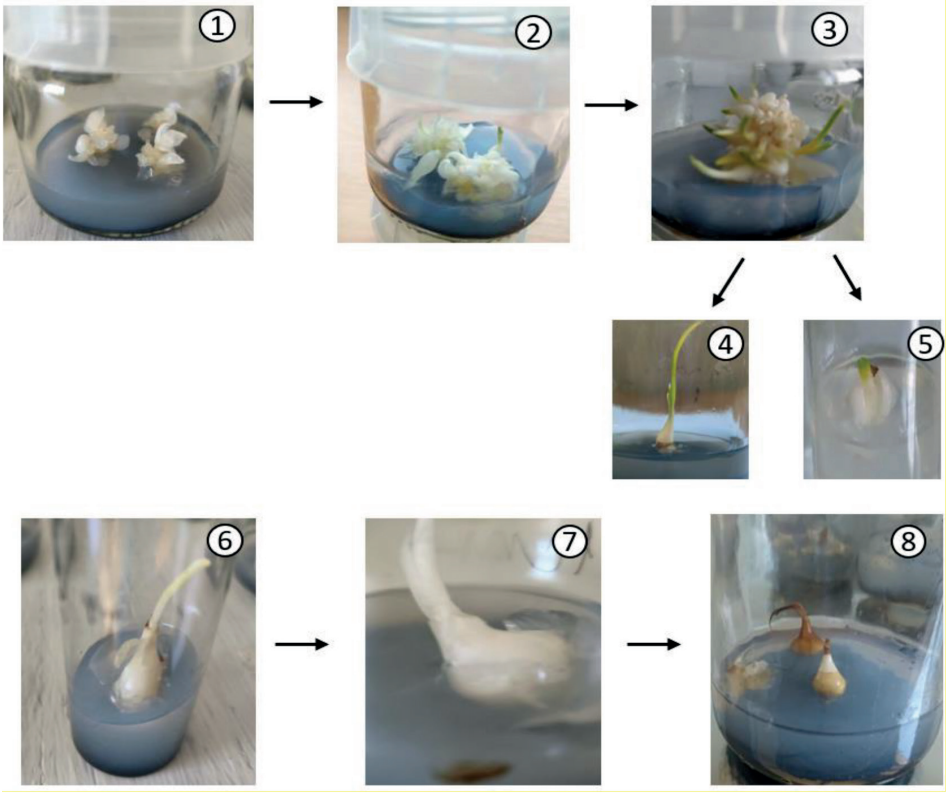


Fig. 4.6. Etapele dezvoltării microbulbilor de *G. plicatus in vitro*:
1-3 – inițierea și proliferarea explantelor pe mediu MS suplimentat cu concentrații crescânde de BAP (1,0-2,0 mg/L); **4-5** – formarea timpurie și separarea microbulbilor nou induși; **6** – transferul microbulbilor în dezvoltare pe mediu MS suplimentat cu IBA (0,5 mg/L) și 45 g/L zaharoză pentru a stimula diferențierea; **7** – mărirea și maturarea microbulbilor pe mediu MS conținând 45 g/L zaharoză fără regulatori de creștere; **8** – microbulbi maturi obținuți *in vitro*.

Schema experimentală aplicată a demonstrat că, prin subculturi

succesive realizate la intervale de aproximativ 8 săptămâni și prin utilizarea unor concentrații progresive de BAP în faza de multiplicare, este posibilă obținerea unei rate ridicate de multiplicare a materialului biologic.

Această strategie permite realizarea unei progresii rapide a numărului de microbulbi, aspect deosebit de valoros în cazul speciilor rare sau protejate, deoarece facilitează multiplicarea unui număr mare de indivizi pornind de la un număr redus de explante inițiale [Lozinschii M., Muntean N., Brînză L., Călugăru-Spătaru T., Coropceanu E., 2026].

4.4. Semnificația rezultatelor pentru conservarea speciei

Rezultatele obținute demonstrează că micropropagarea *in vitro* reprezintă o metodă eficientă pentru multiplicarea și conservarea *ex situ* a speciei *Galanthus plicatus* M. Bieb. Având în vedere distribuția restrânsă a acestei specii, precum și valoarea sa ornamentală și farmaceutică ridicată, presiunea exercitată asupra populațiilor naturale poate conduce la diminuarea resurselor genetice existente. În acest context, elaborarea unui protocol eficient de regenerare și multiplicare *in vitro* prezintă o importanță practică majoră pentru conservarea și utilizarea durabilă a speciei.Protocolul experimental dezvoltat permite obținerea rapidă a unui număr mare de microbulbi viabili, pornind de la un număr redus de explante inițiale. Acești microbulbi pot constitui o sursă valoroasă de material biologic pentru programe de conservare *ex situ*, pentru cercetări fitochimice sau pentru producerea de biomaterial destinat studiului metaboliților secundari, inclusiv al alcaloizilor cu potențial terapeutic. În acest sens, protocolul elaborat pentru etapele de multiplicare și maturare a microbulbilor (fig. 4.7) evidențiază capacitatea tehnicilor de micropropagare de a genera în mod eficient un număr mare de indivizi viabili de *Galanthus plicatus* în condiții controlate.

Prin reducerea necesității colectării plantelor din flora spontană, această abordare biotehnologică contribuie la diminuarea presiu-

nii exercitate asupra populațiilor naturale și la conservarea resurselor genetice ale speciei. Deși aclimatizarea plantelor nu a fost investigată în cadrul prezentului studiu, microbulbii maturi obținuți *in vitro* reprezintă un material de plantare promițător pentru stabilirea ulterioară în condiții *ex vitro*, inclusiv pentru programe de reintroducere controlată, cultivare în horticultură sau pentru producerea biomaterialului destinat studiilor fitochimice. În acest sens, protocolul elaborat prezintă nu doar valoare experimentală, ci și un potențial aplicativ semnificativ în strategiile moderne de conservare a biodiversității și de utilizare durabilă a speciilor vegetale rare sau amenințate.

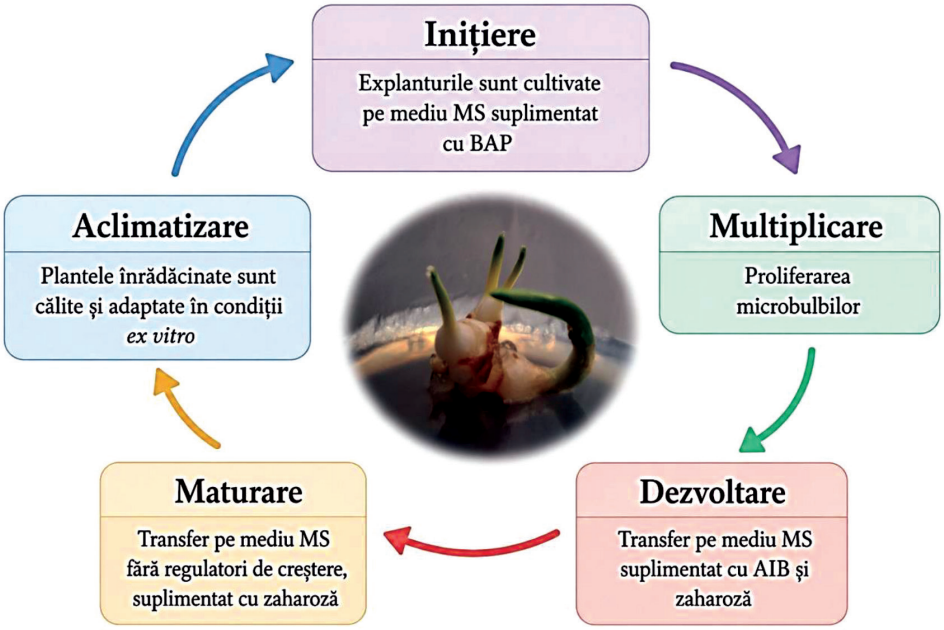


Fig. 4.7. Etapele micropropagării *in vitro* a speciei *Galanthus plicatus* M. Bieb.

În concluzie:

✓ Cercetările realizate au demonstrat că micropropagarea *in vitro* reprezintă o metodă eficientă pentru multiplicarea și conservarea *ex situ* a speciei *Galanthus plicatus*, contribuind la reducerea presiunii asupra populațiilor naturale.

✓ Protocolul de sterilizare elaborat, bazat pe utilizarea succesivă a detergentului, antibioticului, soluției antifungice, hipocloritului

de sodiu, permanganatului de potasiu, peroxidului de hidrogen și alcoolului etilic 70%, a asigurat un procent ridicat de explante viabile și necontaminate (80-95%), fără utilizarea clorurii de mercur, oferind astfel o metodă mai sigură și mai sustenabilă pentru inițierea culturilor *in vitro*.

✓ Pentru etapa de inițiere a culturilor, mediile Murashige-Skoog modificate, suplimentate cu BAP, zaharoză, acid ascorbic și cărbune activ, au favorizat stabilizarea explantelor, reducerea brunificării și menținerea viabilității țesuturilor.

✓ Cea mai eficientă inducere a microbulbilor a fost obținută pe mediul MS suplimentat cu 2,0 mg/L BAP, 0,5 mg/L AIB și 60 g/L zaharoză, unde s-a înregistrat cel mai mare număr de microbulbi per explant (24 ± 0,43). Rezultate apropiate au fost obținute și pe mediul suplimentat cu 2,0 mg/L 2iP, 0,5 mg/L AIB și 60 g/L zaharoză (21 ± 0,21 microbulbi/explant), confirmând rolul determinant al citokininelor, al auxinei și al sursei de carbon în controlul procesului de microbulbificare.

✓ Asocierea citokininelor cu AIB a stimulat diferențierea și stabilitatea structurilor bulbifere, iar concentrația ridicată de zaharoză a favorizat acumularea substanțelor de rezervă și maturizarea microbulbilor.

✓ Etapele succesive de multiplicare, dezvoltare și maturare au permis obținerea unor microbulbi bine diferențiați, care reprezintă un material biologic promițător pentru studii ulterioare de aclimatizare și transfer *ex vitro*.

✓ În ansamblu, protocolul elaborat oferă o bază eficientă pentru multiplicarea rapidă a materialului vegetal și pentru conservarea resurselor genetice ale speciei. Având în vedere valoarea ecologică, ornamentală și medicinală a speciei *Galanthus plicatus* M. Bieb., metoda propusă poate contribui la dezvoltarea strategiilor de conservare *ex situ*, la cercetări fitochimice și la valorificarea biotehnologică a acestei specii valoroase.

5. VALOAREA EDUCAȚIONALĂ ȘI APLICATIVĂ A GHIDULUI

5.1. Utilizarea ghidului în activități didactice



Biotehnologia ca știință este o ramură importantă a biologiei moderne, care a devenit în ultimele decenii una dintre prioritățile principale ale științei și economiei mondiale. Formarea noțiunilor teoretice despre obiectul biotehnologiei începe la orele de biologie. Mai mulți profesori remarcă lipsa condițiilor în școală pentru organizarea de activități practice și experimentale pentru studierea bazelor fundamentale în domeniul biotehnologiilor. În opinia noastră, pentru a rezolva această problemă, se pot utiliza diverse resurse educaționale.

Ghidul „Biotehnologii inovative în cercetare și educație" are o valoare educațională și practică semnificativă, deoarece reunește cunoștințe teoretice moderne și abordări metodologice pentru studierea biotehnologiei vegetale în cadrul procesului de învățământ. Conținutul său contribuie la formarea unei viziuni sistematice la elevi și studenți cu privire la metodele biotehnologice aplicate în știința modernă, agricultură și ecologie. Totodată, utilizarea sa în activitatea didactică permite sistematizarea cunoștințelor teoretice și corelarea acestora cu procesele reale de laborator.

Valoarea educațională a ghidului constă în faptul că acesta adaptează concepte biotehnologice complexe și metode de laborator la nivelul învățământului școlar și universitar. Materialul este prezentat în mod secvențial și accesibil, ceea ce permite utilizarea ghidului atât în studiul disciplinelor biologice de bază, cât și în cadrul

cursurilor specializate de biotehnologie, genetică, fiziologie vegetală, inginerie celulară, precum și în cadrul cursurilor care promovează tehnologiile inovative. O importanță deosebită o are orientarea către o abordare de cercetare în procesul de învățare, care dezvoltă la elevi abilități de analiză, observare, realizare a experimentelor și interpretare a rezultatelor. În special, materialele din ghid pot fi utilizate la studierea bazelor culturii celulare și tisulare a plantelor, a metodelor de sterilizare, a preparării mediilor nutritive și a condițiilor de cultivare aseptică. Acest lucru contribuie la formarea în rândul educabililor a unei înțelegeri a principiilor de lucru cu explantele vegetale și a etapelor de dezvoltare a acestora în condiții controlate *in vitro*.

Valoarea practică a ghidului este determinată de prezența metodelor de laborator și a descrierilor procedurilor experimentale care pot fi puse în practică în laboratoarele didactice. Un loc important îl ocupă studiul metodelor de cultivare a țesuturilor vegetale *in vitro*, care permit cursanților să însușească bazele lucrului steril, prepararea mediilor nutritive, înmulțirea microclonală a plantelor și observarea proceselor de creștere și diferențiere celulară. Realizarea unor astfel de lucrări practice contribuie la formarea, în rândul elevilor și studenților, a competențelor de cercetare și profesionale necesare pentru activitatea științifică și aplicată ulterioară.

În plus, ghidul contribuie la popularizarea biotehnologiei în rândul elevilor, studenților și masteranzilor și la creșterea interesului pentru științele naturii. Utilizarea metodelor biotehnologice moderne în procesul educațional permite apropierea învățământului de practica științifică reală și evidențierea perspectivelor de aplicare a biotehnologiilor în rezolvarea problemelor actuale din agricultură, protecția mediului și biomedicină.

Așadar, ghidul reprezintă o resursă didactică și metodică importantă, care asigură integrarea științei, educației și practicii, iar utilizarea acestuia în procesul de învățământ îmbunătățește calitatea pregătirii educabililor, contribuie la dezvoltarea gândirii științifice și formează competențe de bază în domeniul biotehnologiilor moderne.

5.2. Predarea biotehnologiilor în învățământul preuniversitar și universitar

Biotehnologia ocupă un loc important în educația științifică modernă, deoarece combină cunoștințe din biologie, chimie, genetică, microbiologie și biologie moleculară. Predarea biotehnologiei în învățământul preuniversitar și universitar vizează formarea la studenți a unor noțiuni despre procesele biotehnologice moderne, metodele de cercetare și aplicarea practică a sistemelor biologice în medicină, agricultură, farmaceutică și industrie.

La nivel preuniversitar, studiul biotehnologiei are de obicei un caracter introductiv și include noțiuni de bază de genetică, microbiologie, inginerie celulară și biotehnologie ecologică. Se acordă o atenție specială dezvoltării abilităților de cercetare, lucrului cu echipamentele de laborator și înțelegerii rolului biotehnologiilor în rezolvarea problemelor globale ale umanității.

În cadrul învățământului universitar, biotehnologia este studiată mai aprofundat și include pregătire teoretică și cursuri practice de laborator. Studenții învață metode de diagnostic molecular, inginerie genetică, analiză microbiologică, precum și tehnologii de cultivare a celulelor și țesuturilor. Orientarea practică a învățământului contribuie la formarea competențelor profesionale și la pregătirea specialiștilor pentru activități științifice și de producție.

Una dintre secțiunile importante ale predării biotehnologiei moderne este cultivarea celulelor și țesuturilor *in vitro*. Această metodă se bazează pe cultivarea celulelor, țesuturilor sau organelor în afara organismului, în condiții sterile create artificial, pe medii nutritive. Studiul culturii *in vitro* permite studenților să se familiarizeze cu principiile asepticii, prepararea mediilor nutritive, întreținerea culturilor celulare și controlul creșterii acestora.

Tehnologiile *in vitro* sunt utilizate pe scară largă în biotehnologia agricolă pentru înmulțirea microclonală a plantelor, conservarea speciilor rare și obținerea de material de plantare fără virusuri. În biotehnologia medicală și farmaceutică, metodele de cultivare celulară

sunt utilizate pentru studierea proceselor celulare, testarea medicamentelor și dezvoltarea ingineriei tisulare. Includerea acestui subiect în procesul educațional contribuie la dezvoltarea abilităților practice și la înțelegerea direcțiilor moderne ale cercetării biotehnologice.

5.3. Formarea competențelor experimentale

Învățarea bazată pe investigație este o abordare educațională modernă, centrată pe elev, care urmărește implicarea activă a acestuia în procesul de învățare prin cercetare, explorare și descoperire. Învățarea bazată pe investigație a apărut ca reacție la metodele tradiționale de predare, centrate pe transmiterea pasivă a informațiilor. Această abordare a fost introdusă la începutul secolului al XX-lea, în contextul pedagogiei moderne, care punea accent pe activitatea elevului și pe învățarea prin experiență.

Un rol important în introducerea acestei metode l-a avut pedagogul american John Dewey, care a susținut ideea că elevii învață cel mai bine atunci când investighează, experimentează și rezolvă probleme reale. Ulterior, concepția a fost dezvoltată de Jerome Bruner, care a promovat învățarea prin descoperire și investigare. În a doua jumătate a secolului XX, învățarea bazată pe investigație a fost integrată în reformele educaționale și în curriculumurile școlare din multe țări, fiind susținută de cercetări pedagogice și de organizații internaționale.

Dezvoltarea competențelor experimentale la elevi și studenți nu înseamnă pur și simplu să-i învățăm „cum să efectueze un experiment”. Este vorba despre dezvoltarea unei game întregi de competențe de cercetare: capacitatea de a pune întrebări, de a formula ipoteze, de a proiecta experimente, de a analiza date, de a recunoaște erorile și de a trage concluzii. Aceste abilități stau la baza științei, ingineriei și biotehnologiei moderne. Una dintre abordările actuale este învățarea bazată pe investigație. Esența sa este că studenții nu primesc un răspuns gata pregătit din timp, ci mai degrabă experimentează parcursul unui cercetător. Elevul devine ***activ***, iar profesorul are rol de ***ghid***.

Învățarea bazată pe investigație se caracterizează prin următoarele aspecte esențiale:

- ✓ este *centrată pe elev*, care participă activ la procesul de învățare;
- ✓ pornește de la întrebări, probleme sau *situații reale*;
- ✓ încurajează *descoperirea* și *explorarea* informațiilor;
- ✓ dezvoltă *gândirea critică* și *capacitatea de analiză*;
- ✓ presupune *colaborarea* între elevi;
- ✓ pune accent pe *procesul de învățare*, nu doar pe rezultat;
- ✓ profesorul are rol de *ghid* și nu doar de furnizor de informații.

Metode și tehnici utilizate în învățarea bazată pe investigație

În cadrul învățării bazate pe investigație se folosesc metode și tehnici didactice active, care stimulează participarea elevilor și gândirea critică. Cele mai frecvent utilizate sunt:

- ✓ Observația – elevii analizează fenomene, procese sau situații reale;
- ✓ Experimentul – permite verificarea ipotezelor prin activități practice;
- ✓ Problematizarea – elevii sunt puși în situația de a găsi soluții la probleme;
- ✓ Studiul de caz – analiza unor situații concrete din realitate;
- ✓ Învățarea prin proiect – realizarea unor investigații pe termen mai lung;
- ✓ Dezbaterea – exprimarea și argumentarea opiniilor;
- ✓ Lucrul în echipă – colaborarea pentru rezolvarea sarcinilor;
- ✓ Analiza surselor – utilizarea manualelor, documentelor, materialelor digitale.

În concluzie, învățarea bazată pe investigație reprezintă o metodă modernă și eficientă de predare, care transformă elevul într-un participant activ la procesul educațional. Deși metoda presupune resurse și timp suplimentar, beneficiile ei pentru elevi sunt evidente, transfor-

mând procesul de învățare într-un demers activ, creativ și relevant.

5.4. Propuneri de lucrări de laborator și practice cu conținut biotehnologic

Pentru a spori eficiența predării biotehnologiei vegetale, este recomandabil să se combine instruirea teoretică cu realizarea de lucrări practice și de laborator. Abordarea orientată spre practică contribuie la o mai bună asimilare a materiei, la dezvoltarea abilităților de cercetare și la stimularea interesului studenților pentru activitatea științifică.

În acest context au fost organizate lucrări de laborator cu implicarea studenților, pe principiul complicării treptate: de la familiarizarea cu metodele de bază de lucru în laboratorul de biologie până la realizarea sarcinilor independente (fig. 5.1; anexa 1).



Fig. 5.1. Secvențe privind activitatea studenților în laboratorul de cultură *in vitro*:
1 – transferul mediului MS în borcane; **2, 3, 4** – transferarea explantelor vegetale în mediu nutritiv steril

În etapele inițiale, studenții au studiat regulile de aseptică, metodele de sterilizare a instrumentelor și prepararea mediilor de cultură. Ulterior, a fost posibilă desfășurarea de lucrări practice privind cultivarea țesuturilor vegetale *in vitro*, observarea creșterii țesutului calus, înmulțirea microclonală a plantelor și evaluarea influenței factorilor de mediu asupra dezvoltării culturilor.

O atenție specială a fost acordată formării abilităților de lucru experimental: stabilirea obiectivului cercetării, ținerea jurnalului de laborator, consemnarea rezultatelor observațiilor și analiza acestora. O metodă eficientă de învățare este organizarea de mini-cercetări, în cadrul cărora elevii și studenții pot compara în mod independent compozițiile mediilor nutritive, pot studia influența fitoregulatori de creștere asupra creșterii țesuturilor sau pot evalua condițiile de cultivare a plantelor.

Pentru a spori claritatea și motivația, se recomandă utilizarea tehnologiilor educaționale moderne: microscopia digitală, documentarea fotografică a etapelor experimentului, prezentări multimedia și elemente de învățare prin proiecte. Cursurile practice pot fi organizate atât în laboratoarele de învățământ ale instituțiilor de învățământ, cât și în colaborare cu centrele de cercetare științifică și universitățile.

O direcție importantă este integrarea lucrărilor de laborator cu sarcini ecologice și agricole. De exemplu, cursanții pot participa la proiecte privind înmulțirea microclonală a plantelor rare, obținerea de material de plantare fără viruși sau studierea rezistenței culturilor la condiții de stres. Acest lucru permite demonstrarea importanței practice a biotehnologiei și a rolului acesteia în societatea modernă.

Propuneri de lucrări de laborator și activități practice

În vederea dezvoltării competențelor practice în domeniul biotehnologiilor vegetale, sunt propuse lucrări de laborator cu conținut biotehnologic, concepute pentru familiarizarea elevilor cu metodele, echipamentele și principiile de bază ale culturilor vegetale *in vitro*.

Propuneri de lucrări de laborator cu conținut biotehnologic:

❖ **Lucrarea de laborator nr. 1**

Tema: Organizarea și principiile de funcționare ale laboratorului de culturi vegetale *in vitro*

Obiective: cunoașterea zonelor funcționale ale laboratorului; identificarea echipamentelor specifice (hotă cu flux laminar, autoclav, fitotron); însușirea regulilor de asepsie și biosecuritate.

❖ **Lucrarea de laborator nr. 2**

Tema: Metode de sterilizare utilizate în biotehnologiile vegetale

***Obiective*:** pregătirea materialului vegetal pentru introducerea în cultură; testarea agenților de sterilizare; evaluarea contaminării și supraviețuirii explantelor.

Activitate: sterilizarea explantelor cu diferite variante experimentale; calcularea procentului de asepsie.

❖ **Lucrarea de laborator nr. 3**

Tema: Prepararea mediului nutritiv Murashige și Skoog (MS) pentru cultura *in vitro*

Obiective: prepararea mediului nutritiv din soluții stoc; ajustarea pH-ului; suplimentarea cu regulatori de creștere; sterilizarea prin autoclavare.

❖ **Lucrarea de laborator nr. 4**

Tema: Rolul regulatorilor de creștere în morfogeneza plantelo*r in vitro*

Obiective: studierea efectului auxinelor și citokininelor; analiza raportului hormonal asupra dezvoltării explantelor.

Variante: MS + BAP; MS + AIB; MS + BAP + AIB.

❖ **Lucrarea de laborator nr. 5**

Tema: Inițierea culturilor vegetale *in vitro* din explante nodale

Obiective: izolarea explantelor; inocularea pe mediu nutritiv;

monitorizarea regenerării.

Specii recomandate: *Mentha spp. Stevia rebaudiana, Lavandula spp, Rubus, Aronia.*

❖ **Lucrarea de laborator nr. 6**

Tema: Micropropagarea speciei *Mentha citrata* Ehrh. prin cultura de noduri

Obiective: inducerea lăstarilor multipli; determinarea ratei de multiplicare; evaluarea vigorii plantulelor.

Parametri analizați*:* număr de lăstari/explant; lungimea lăstarilor; număr de noduri.

❖ **Lucrarea de laborator nr. 7**

Tema: *Multiplicarea in vitro a plantelor rare*

Obiective: aplicarea culturilor *in vitro* în conservarea speciilor vulnerabile; inducerea regenerării organelor vegetative.

❖ **Lucrarea de laborator nr. 8**

Tema: Inducerea și cultivarea calusului vegetal

Obiective: obținerea țesuturilor nediferențiate; analiza proceselor de morfogeneză.

Se urmărește: culoarea calusului; textura; intensitatea proliferării.

❖ **Lucrarea de laborator nr. 9**

Tema: Rizogeneza plantelor multiplicate *in vitro*

Obiective: stimularea formării sistemului radicular; testarea efectului auxinelor.

Parametri: procent de înrădăcinare; numărul rădăcinilor; lungimea rădăcinilor.

❖ **Lucrarea de laborator nr. 10**

Tema: Aclimatizarea plantelor obținute prin micropropagare

Obiective: transferul plantelor din condiții *in vitro* în condiții *ex vitro*; alegerea substraturilor; evaluarea supraviețuirii.

❖ **Lucrarea de laborator nr. 11**

Tema: Conservarea resurselor genetice vegetale prin metode *in vitro*

Obiective: realizarea unei mini-bănci de germoplasmă; conservarea speciilor valoroase; reducerea ritmului de creștere.

❖ **Lucrarea de laborator nr. 12**

Tema: Crioconservarea materialului vegetal – principii și aplicații

Obiective: cunoașterea etapelor crioconservării; rolul vitrificării și crioprotectorilor; aplicații în conservarea biodiversității.

❖ **Lucrarea practică nr. 13**

Tema: Elaborarea unui protocol biotehnologic pentru o specie vegetală selectată

Studenții vor proiecta: metoda de sterilizare; mediul nutritiv; combinația hormonală; schema de multiplicare; strategia de conservare.

❖ **Lucrarea practică nr. 14**

Tema: Aplicații educaționale și inovative ale plantelor obținute *in vitro*

Activități: realizarea unei colecții demonstrative; mini-bancă genetică *in vitro*; produse bioeducaționale pe bază de plante.

5.5. Integrarea ghidului „Biotehnologii inovative în cercetare și educație” în realizarea Curriculumului la disciplina Biologie (treapta liceală)

Curriculumul la disciplina Biologie pentru treapta liceală (clasele X-XII) este orientat spre formarea competențelor specifice disciplinei prin abordarea integrată a organismelor vii, a proceselor biologice fundamentale și a relației dintre organisme și mediul înconjurător. În contextul educației moderne, un rol important îl constituie dezvoltarea competențelor de investigare, aplicarea metodelor

experimentale și formarea unei gândiri științifice orientate spre soluționarea problemelor actuale ale societății [Curriculum la Biologie, 2019; Lozinschii M., Brînză L., 2024].

Ghidul **„Biotehnologii inovative în cercetare și educație"** vine în completarea demersului curricular prin valorificarea cunoștințelor fundamentale de biologie și transpunerea acestora în contexte aplicative moderne, specifice cercetării biotehnologice. Prin activitățile propuse, ghidul contribuie la dezvoltarea competențelor cognitive, funcționale și practice ale elevilor, facilitând trecerea de la învățarea teoretică la investigarea experimentală.

Conținuturile ghidului susțin principiile curriculumului liceal prin:

✓ dezvoltarea competențelor de investigare științifică, prin proiectarea și realizarea experimentelor biologice; formarea abilităților de lucru cu informația științifică, analiza rezultatelor și formularea concluziilor;

✓ dezvoltarea gândirii critice și creative, prin identificarea soluțiilor biotehnologice pentru probleme actuale; orientarea profesională a elevilor spre domeniile biologiei, biotehnologiei, medicinei, agriculturii și protecției mediului; promovarea educației pentru dezvoltare durabilă, prin aplicarea tehnologiilor moderne de conservare a biodiversității vegetale.

Tabelul 5.1 prezintă corelarea dintre unitățile de conținut prevăzute în **Curriculumul la disciplina** Biologie (treapta liceală) și tematicile abordate în ghidul „Biotehnologii inovative în cercetare și educație", evidențiind modalitățile de valorificare a acestora prin activități didactice și aplicative orientate spre dezvoltarea competențelor specifice disciplinei (tab. 5.1).

Tabelul 5.1. Corelarea unităților de conținut ale Curriculumului la disciplina Biologie (treapta liceală) cu tematicile abordate în ghidul „Biotehnologii inovative în cercetare și educație"

Nr.	Domeniul curricular / unități de conținut	Conținuturi abordate conform Curriculumului la Biologie	Valorificarea conținuturilor prin activitățile și tematicile ghidului
1.	Celula – unitatea structurală și funcțională a organismelor vii (clasa a X-a)	Organizarea structurală și funcțională a celulei; componente celulare; diviziunea celulară; diferențierea celulară.	Cultura de celule, țesuturi și organe vegetale *in vitro*; totipotența celulară; regenerarea plantelor din explante; morfogeneză vegetală.
2.	Caracteristici generale ale organismelor (clasa a X-a)	Creșterea și dezvoltarea organismelor; reproducerea; reglarea proceselor fiziologice; influența factorilor asupra dezvoltării organismelor.	Rolul regulatorilor de creștere vegetală (auxine, citokinine, gibereline); inducerea lăstarilor și rădăcinilor; etapele micropropagării.
3.	Sistematica organismelor (clasa a X-a)	Diversitatea organismelor vegetale; clasificarea organismelor; importanța speciilor; protecția biodiversității.	Conservarea resurselor genetice vegetale; conservarea *in vitro* a speciilor vulnerabile; colecții și mini-bănci de germoplasmă.
4.	Bazele geneticii (clasa a XII-a)	Material genetic; transmiterea informației ereditare; variabilitatea organismelor.	Cultura de antere și microspori; obținerea plantelor haploide și liniilor homozigote; aplicații în ameliorare.
5.	Ameliorarea organismelor. Biotehnologii moderne (clasa a XII-a)	Metode moderne de ameliorare; utilizarea organismelor vii în beneficiul omului; aplicații ale biotehnologiilor.	Micropropagarea plantelor de interes economic și medicinal; obținerea materialului vegetal sănătos; protocoale pentru *Mentha spp*. și *Galanthus plicatus* M. Bieb.

6.	Ecologie și protecția mediului (clasa a XII-a)	Relația organism–mediu; impactul activității umane; conservarea și utilizarea durabilă a resurselor naturale.	Conservare *ex situ* și in *vitro*; crioconservarea materialului vegetal; formarea responsabilității ecologice.

Integrarea tematicilor ghidului în realizarea Curriculumului la disciplina Biologie facilitează trecerea de la învățarea conceptuală la aplicarea practică a cunoștințelor. Prin utilizarea tehnicilor de cultură *in vitro*, micropropagare și conservare a resurselor genetice vegetale, elevii dezvoltă competențe de investigare științifică, gândire critică, creativitate și responsabilitate față de biodiversitate.

Integrarea tematicilor ghidului în realizarea **Curriculumului la disciplina Biologie** facilitează trecerea de la învățarea conceptuală la aplicarea practică a cunoștințelor. Prin utilizarea tehnicilor de cultură *in vitro*, micropropagarea și conservarea resurselor genetice vegetale, elevii dezvoltă competențe de investigare științifică, gândire critică, creativitate și responsabilitate față de biodiversitate [Curriculum la Biologie, 2019; Lozinschii M., Brînză L., 2024; Lozinschii M., Brînză L., Coropceanu E., 2024].

Prin utilizarea ghidului în cadrul activităților educaționale, elevii pot fi implicați în activități practice precum:

• observarea culturilor vegetale in vitro;

• analiza etapelor micropropagării plantelor;

• realizarea unor mini-proiecte de conservare a speciilor vegetale;

• studierea influenței regulatorilor de creștere asupra dezvoltării plantelor;

• elaborarea unor produse educaționale și biotehnologice.

În concluzie, integrarea ghidului „Biotehnologii inovative în cercetare și educație” în realizarea **Curriculumului la disciplina** Biologie (treapta liceală) contribuie la modernizarea procesului educațional prin valorificarea metodelor și aplicațiilor biotehnologice actuale, facilitând formarea competențelor specifice disciplinei și

dezvoltarea gândirii științifice a elevilor. Astfel, ghidul reprezintă o punte de legătură între curriculumul liceal și cercetarea universitară, contribuind la formarea unei generații de elevi capabili să aplice cunoștințele biologice în contexte reale, inovative și interdisciplinare.

5.6. Corelarea ghidului „Biotehnologii inovative în cercetare și educație" cu competențele specifice disciplinei Biologie (clasele X–XII)

Activitățile teoretice și practice propuse în cadrul ghidului contribuie la dezvoltarea competențelor specifice disciplinei Biologie prin integrarea cunoștințelor fundamentale despre organismele vii cu metode moderne de cercetare biotehnologică. Prin aplicarea tehnicilor de cultură in vitro, elevii sunt implicați în procese de investigare, analiză și interpretare a fenomenelor biologice, dezvoltând competențe necesare educației științifice contemporane.

Competențele specifice prevăzute de **Curriculumul la disciplina** Biologie (treapta liceală) sunt dezvoltate și consolidate prin activitățile propuse în ghidul „Biotehnologii inovative în cercetare și educație", care oferă contexte autentice de învățare bazate pe investigare, experiment și aplicarea cunoștințelor în situații relevante pentru cercetarea și educația biologică (tab. 5.2).

Tabelul 5.2. Corelarea competențelor specifice ale Curriculumului la disciplina Biologie (treapta liceală) cu activitățile propuse în ghidul „Biotehnologii inovative în cercetare și educație"

Nr.	Competențe specifice disciplinei Biologie	Valorificarea prin activitățile ghidului
1.	Utilizarea limbajului științific biologic referitor la structuri, procese, fenomene, legi și concepte în diverse contexte de comunicare.	Elevii utilizează corect terminologia specifică biotehnologiilor vegetale: cultură in vitro, explant, mediu nutritiv, sterilizare, micropropagare, totipotență celulară, conservare genetică. Elaborarea rapoartelor de laborator și interpretarea rezultatelor dezvoltă comunicarea științifică.

2.	Investigarea lumii vii cu ajutorul metodelor și mijloacelor specifice pentru îmbunătățirea calității vieții și a mediului.	Realizarea activităților experimentale privind inițierea culturilor vegetale in vitro, observarea regenerării plantelor, analiza influenței factorilor de mediu și a regulatorilor de creștere asupra dezvoltării organismelor vegetale.
3.	Implicarea în activități de menținere a stării de sănătate proprii și a celor din jur prin aplicarea metodelor interactive în vederea formării unui comportament sanogen.	Studierea importanței plantelor medicinale și aromatice (Mentha spp.), valorificarea compușilor biologic activi și realizarea unor produse educaționale naturale contribuie la promovarea unui stil de viață sănătos.
4.	Participarea în acțiuni de ocrotire a biodiversității prin parteneriat în vederea rezolvării problemelor ecologice la nivel individual, local și global.	Aplicarea metodelor de conservare in vitro, realizarea mini-băncilor de germoplasmă și studierea speciilor vulnerabile (ex. Galanthus plicatus) formează responsabilitatea față de protejarea resurselor genetice vegetale.

Prin această abordare se demonstrează modul în care noțiunile teoretice din biologie pot fi valorificate prin activități practice și de cercetare, facilitând trecerea de la acumularea cunoștințelor la aplicarea lor în situații reale.

Activitățile bazate pe cultura in vitro, micropropagarea plantelor, utilizarea resurselor vegetale și conservarea biodiversității contribuie la dezvoltarea capacității elevilor de a investiga fenomene biologice, de a interpreta rezultate experimentale și de a formula concluzii științifice.

Validarea aplicabilității ghidului prin activități de cercetare și inovare ale elevilor. Aplicabilitatea și impactul educațional al activităților propuse în cadrul ghidului **„Biotehnologii inovative în cercetare și educație”** sunt confirmate prin implicarea activă a elevilor în activități extracurriculare cu caracter științific și inovativ: concursuri de cercetare, olimpiade, conferințe științifice și saloane de inventică.

Participarea elevilor la evenimente precum **Mold SEF (Moldova Science and Engineering Fair), olimpiade republicane, conferințe științifice pentru elevi și expoziții de invenții și inovații** demonstrează dezvoltarea competențelor de investigare, aplicarea metodei științifice, capacitatea de analiză și prezentare a rezultatelor experimentale.

Obținerea medaliilor de aur în cadrul Salonului Internațional de Inventică și Antreprenoriat Inovativ 2026, organizat de Universitatea Pedagogică de Stat „Ion Creangă" din Chișinău:

1) ***In vitro* micropropagation of *Menta citrata* species on organic substrates.** *Autor:* **Lozinschii Felicia**

2) **Plant biotechnologies applied in the ecological management of pests in protected areas.** *Autori:* **Caraman Anastasia, Picicurov Mihail.**

3) **Mini *in vitro* gene bank for the conservation of species from the flora of the Republic of Moldova.** *Autori:* **Ostaf Evelina, Bărbuță Gabriela, Frunză Andreea, Boghean Alexandru.**

Proiectele elaborate pe baza activităților propuse în ghid contribuie la:

• valorificarea creativității și gândirii inovative;

• dezvoltarea abilităților de proiectare și realizare a cercetării;

• formarea competențelor STEM;

• consolidarea colaborării dintre învățământul preuniversitar și mediul universitar/de cercetare;

• orientarea elevilor spre domenii precum biologia, biotehnologia, medicina, farmacia și științele mediului.

Rezultatele obținute în cadrul acestor manifestări confirmă eficiența abordării educaționale bazate pe **învățare prin cercetare (inquiry-based learning)** și evidențiază rolul biotehnologiilor vegetale ca instrument modern de motivare și formare profesională a tinerilor.

Tabelul 5.3 evidențiază modul în care produsele educaționale realizate pe baza speciei *Mentha citrata* Ehrh. contribuie la formarea

și dezvoltarea competențelor specifice disciplinei Biologie (treapta liceală), prin integrarea conceptelor biologice, a activităților practice și a strategiilor de învățare aplicativă prevăzute în **Curriculumul la Biologie, 2019** (tab. 5.3).

Tabelul 5.3. Corelarea produselor educaționale realizate pe bază de *Mentha citrata* Ehrh. cu competențele specifice disciplinei Biologie (treapta liceală)

Activitatea/ produsul realizat	Concepte biologice integrate	Activități practice ale elevilor	Competențe dezvoltate conform Curriculumului la Biologie 2019
Înghețată de mentă bergamotă cu ciocolată	Plante aromatice; compuși biologic activi; utilizarea resurselor vegetale	Studierea proprietăților Mentha citrata; elaborarea și testarea produsului alimentar	Investigarea lumii vii; aplicarea cunoștințelor biologice; creativitate științifică
Săpun natural cu mentă	Metaboliți secundari; uleiuri esențiale; rolul plantelor pentru sănătate	Obținerea extractelor vegetale și realizarea unui produs natural	Comportament sanogen; utilizarea responsabilă a resurselor naturale
Lumânări aromatice cu mentă	Substanțe volatile; proprietăți aromatice; biodiversitate	Utilizarea materiei prime vegetale în produse aplicative	Gândire interdisciplinară și aplicarea biologiei și chimiei
Ciocolată cu mentă	Plante alimentare funcționale; compuși naturali	Realizarea produsului și evaluarea caracteristicilor	Investigare experimentală și analiză
Băuturi răcoritoare pe bază de mentă	Plante medicinale; substanțe biologic active	Prepararea extractelor și compararea produselor	Promovarea unui stil sănătos de viață

Zahăr aromatizat cu mentă	Valorificarea proprietăților plantelor aromatice	Prelucrarea materiei vegetale	Dezvoltarea abilităților practice
Bomboane de jeleu cu aromă de mentă bergamotă	Ingrediente naturale; compuși vegetali aromatici	Proiectarea și obținerea produsului	Competențe de cercetare, creativitate și inovare
Compoziții decorative cu plante de mentă obținute *in vitro*	Micropropagare; aclimatizare; conservarea resurselor vegetale	Utilizarea plantelor regenerate *in vitro*	Responsabilitate față de biodiversitate

Prin realizarea produselor pe bază de *Mentha citrata* Ehrh., elevii și studenții valorifică cunoștințele biologice într-un context aplicativ, dezvoltând competențe de cercetare, creativitate și inovare, precum și capacitatea de a utiliza resursele vegetale în elaborarea unor produse cu valoare educațională, funcțională și estetică.

Produsele educaționale realizate de elevi și studenți pe baza speciei *Mentha citrata* Ehrh. reprezintă exemple de valorificare practică a cunoștințelor biologice, prin integrarea elementelor de botanică, biotehnologie vegetală, chimie a compușilor naturali și tehnologii de prelucrare a resurselor vegetale. Aceste activități au urmărit dezvoltarea competențelor de investigare, aplicare a cunoștințelor științifice, creativitate și inovare, prin transformarea materialului vegetal în produse cu valoare educațională, funcțională și estetică.

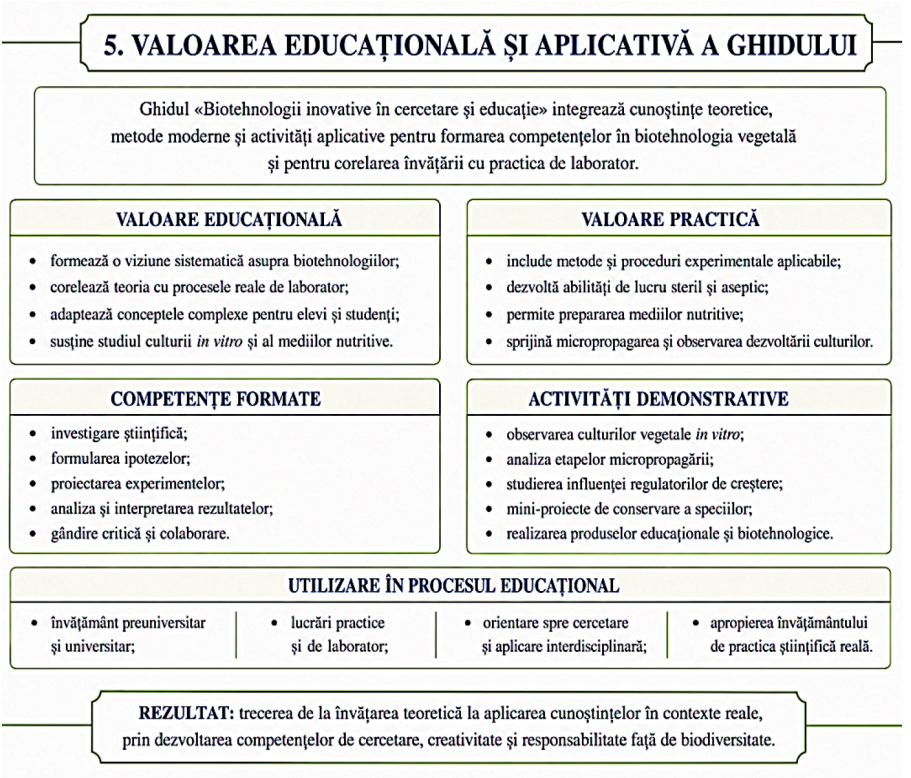


Fig. 5.2. Valoarea educațională și aplicativă a ghidului „Biotehnologii inovative în cercetare și educație" în formarea competențelor de biotehnologie vegetală

Prin elaborarea unor produse precum săpun natural cu mentă, lumânări aromatice, produse alimentare (ciocolată, băuturi răcoritoare, zahăr aromatizat, bomboane de jeleu cu aromă de mentă bergamotă) și compoziții decorative cu plante de mentă obținute *in vitro*, elevii și studenții au explorat proprietățile plantelor aromatice, rolul compușilor bioactivi și posibilitățile de utilizare sustenabilă a resurselor vegetale. Activitățile practice au oferit contexte autentice pentru aplicarea metodelor de cercetare, dezvoltarea spiritului antreprenorial și promovarea utilizării biotehnologiilor în educație.

Figura 5.2 ilustrează dimensiunile valorii educaționale și aplicative ale ghidului „Biotehnologii inovative în cercetare și educație".

Aceasta evidențiază contribuția ghidului la formarea competențelor specifice prin corelarea conceptelor biologice cu activitățile

practice, experiențele experimentale și aplicarea rezultatelor cercetării în contexte educaționale autentice.

În concluzie, prin integrarea cercetării biotehnologice în procesul educațional, ghidul contribuie la realizarea competențelor prevăzute de Curriculumul la disciplina Biologie pentru treapta liceală, asigurând trecerea de la acumularea informațiilor teoretice la aplicarea acestora în contexte reale. Activitățile propuse dezvoltă competențe de investigare, gândire critică, creativitate, colaborare și responsabilitate față de sănătate și biodiversitate.

6. PRODUSE ARTIZANALE REALIZATE DE ELEVI ȘI STUDENȚI PE BAZĂ DE *Mentha citrata* Ehrh.



În cadrul activităților didactice, elevii Centrului de Excelență în Medicină și Farmacie „Raisa Pacalo” din Chișinău și studenții facultății de Biologie și Chimie ai Universității Pedagogice de Stat „Ion Creangă” din Chișinău au studiat proprietățile mentei bergamotă și utilizarea acesteia în diverse domenii. Aparent simplu, acest ingredient vegetal a constituit baza unei serii de experimente care au permis descoperirea potențialului său gustativ, aromatic și funcțional. Astfel, menta a devenit elementul principal atât al produselor alimentare, cât și al celor nealimentare.

Elevii și studenții facultății de Boilogie și Chimie al UPSC au creat produse alimentare în care menta apare ca aditiv natural gustativ-aromatic, precum și produse cu altă destinație – de exemplu, săpun, mască și lumânări aromatice, unde proprietățile sale au fost utilizate pentru a conferi prospețime și un parfum caracteristic (Anexa 1-12).

Activitățile practice au fost orientate către elaborarea de rețete cu utilizarea materiei prime vegetale și introducerea componentelor naturale în compoziția produselor. O astfel de abordare le-a permis studenților nu doar să studieze particularitățile utilizării mentei în tehnologiile alimentare, ci și să-și extindă cunoștințele despre utilizarea acesteia în domenii conexe.

Astfel, aceste proiecte nu sunt doar experimente practice, ci o parte importantă a procesului de învățare. Astfel, elevii au posibilitatea să dezvolte abilități de cercetare prin crearea de produse, folosind elemente de biotehnologie.

6.1. Înghețata de mentă bergamotă cu ciocolată

Producerea înghețatei de mentă cu ciocolată a fost un proces bine gândit și care a inclus mai multe etape. În primă etapă, elevii au studiat proprietățile mentei, acordând atenție componentelor sale biologic active. Apoi a fost elaborată rețeta, în care au fost selectate proporțiile optime ale ingredientelor pentru a obține un gust și o textură echilibrate. În procesul de lucru o atenție deosebită s-a acordat calității materiilor prime: s-au folosit frunze proaspete de mentă, bază lactată și ciocolată naturală, ceea ce a permis obținerea unui produs cu un gust armonios și un aromă răcoritoare (fig. 6.1).

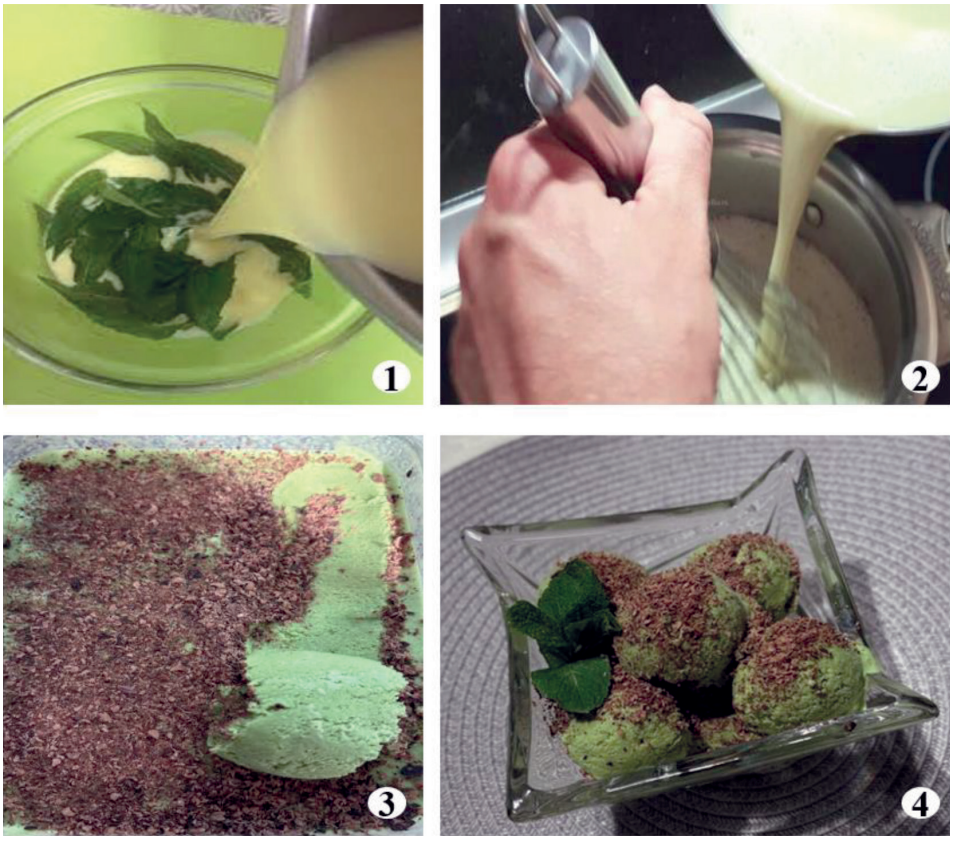


Fig. 6.1. Etapele de producere a înghețatei de mentă cu ciocolată:
1 – pregătirea infuziei din mentă; **2** – lichidul aromatizat**;**
3 – baza de înghetață congelată**; 4** – produsul final

În etapa următoare s-a desfășurat procesul tehnologic propriu-zis: pregătirea materiei prime vegetale, extragerea substanțelor

aromatice, amestecarea componentelor, precum și răcirea și congelarea amestecului.

Ingrediente: 400 ml lapte integral; 300 ml frișcă lichidă naturală de 33% grăsime; 120 g zahăr; 4 gălbenușuri de ou; 10 g frunze proaspete de menta bergamotă, extract de vanilie, 50 g ciocolată neagră, praf de sare, opțional colorant verde.

Modul de preparare:

Menta (frunzele și tulpinile) se taie în de circa de 2-3 cm. Într-un vas termorezistent se amestecă laptele și jumătate din smântână, se adaugă menta și se aduce la fierbere. Apoi, cratița se ia de pe foc, se acoperă și se lasă la infuzat aproximativ o oră. După aceea, amestecul se strecoară, stoarcând bine menta. Lichidul aromatizat cu mentă se pune din nou în cratiță, se adaugă jumătate din zahăr și se încălzește aproape până la fierbere, amestecându-se până la dizolvarea completă a zahărului. Separat, gălbenușurile se amestecă cu restul de zahăr până se obține o masă omogenă. Se toarnă amestecul fierbinte de lapte în gălbenușuri într-un jet subțire, amestecând intens și continuu, pentru a preveni coagularea. Ulterior, masa obținută se pune din nou în cratiță. Amestecul se fierbe la foc mediu, amestecând constant, până se îngroașă (stare în care rămâne o urmă la suprafață). Apoi, se ia de pe foc și se toarnă într-un alt recipient, pentru a opri încălzirea. Se lasă compoziția să se răcească, acoperindu-se cu folie de plastic. La final se adaugă restul de smântână, se amestecă și se pune la frigider pentru câteva ore sau peste noapte.

Etapa finală a constat în evaluarea calității produsului obținut, incluzând analiza gustului, a aromei și a consistenței.

Acest proiect are o importanță educațională semnificativă, deoarece demonstrează eficiența abordării orientate spre practică în predarea biotehnologiilor la nivel preuniversitar (anexa 2). Lucrul la crearea produsului permite elevilor nu doar să-și consolideze cunoștințele teoretice de chimie și biologie, ci și să le aplice în practică, dezvoltându-și abilitățile de cercetare și analiză. În plus, participarea la astfel de proiecte contribuie la formarea competențelor profesionale și sporește motivația pentru învățare, deoarece studenții văd rezultatul real al activității lor.

6.2. Săpun natural cu mentă

Săpunul natural, spre deosebire de cel sintetic, nu numai că curăță pielea, ci și o îngrijește. În funcție de componente, acesta contribuie la hidratarea pielii, asigurând celulele cu substanțe utile și eliminând inflamațiile. Datorită prezenței în săpun a uleiurilor vegetale naturale, după utilizarea acestuia pe piele se formează o peliculă subțire. Aceasta are funcție protectoare, dar totodată nu împiedică schimbul de oxigen. În săpunul sintetic, uleiurile sunt înlocuite cu parfumuri și arome artificiale.

Menta bergamotă nu înseamnă doar prospețime și răcoare. Având un miros asemănător cu bergamota și levănțica, ea este apreciată pentru uleiurile esențiale unice. Cu toate că face parte din genul *Mentha*, în compoziția uleiului esențial de menta bergamotă se conține doar 1-2% de mentol, compușii majoritari fiind acetatul de linalil și linalool, care conferă plantei un profil aromatic specific, diferit de cel al speciilor bogate în mentol. Compoziția sa chimică și proprietățile sale sunt similare cu cele ale uleiului esențial de levănțică și poate fi utilizat ca alternativă sau în combinație cu acesta, pentru a crea amestecuri sinergice minunate.

Ingrediente: 50 g bază de săpun; 10 g frunze de mentă; ulei esențial de mentă; 1 lingură ulei de cocos.

Modul de preparare:

Frunzele de mentă se infuzează în apă fierbinte, apoi se strecoară pentru a obține decoctul de mentă. În următoarea etapă de taie în bucăți baza de săpun și se pune într-un recipient. Se adaugă o linguriță de decoct. Amestecul se pune pe baia de apă până când cuburile se topesc complet. Este important să se evite fierberea lui. În etapa următoare în amestecul lichid se adaugă câteva picături de ulei esențial, o lingură de infuzie de mentă și o lungură de ulei de cocos. Astfel, baza de săpun a căpătat o nuanță foarte interesantă și parfumată cu mentă. Apoi lichidul obținut se transferă în matriță (formă) și se lasă la întărit. Durează aproximativ o oră pentru ca săpunul să se întărească (fig. 6.2).

În etapa finală se scoate săpunul din forme și se testează produsul pe mâinile proprii.

Săpunul cu mentă este ideal pentru trezirea de dimineață. Aroma proaspătă și revigorantă a săpunului cu mentă elimină senzația de oboseală, revigorează mintea și corpul și îmbunătățește starea de spirit. Ajută la eliminarea „ceații din creier", la îmbunătățirea clarității minții și la calmarea stresului și anxietății. Săpunul cu mentă răcorește și calmează pielea și acționează similar cu medicamentele antihistaminice, calmând erupțiile alergice, cum ar fi urticaria și dermatita de contact.

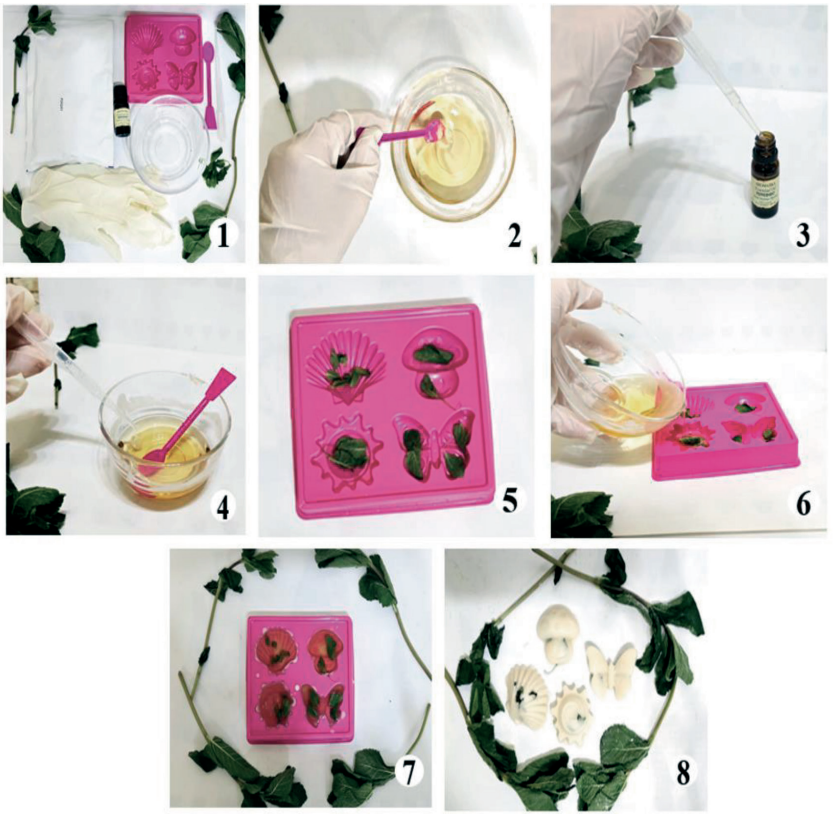


Fig. 6.2. Etapele producerii săpunului natural cu mentă:
1 – pregătirea materialelor necesare; **2** – baza de săpun lichefiată**;** **3** – dozarea uleiului esențial; **4** – omogenizarea amestecului; **5** – pregătirea formei de săpun; **6** – transferarea amestecului; **7** – forma cu amestec; **8** – produsul final (săpunul solid)

Săpunul cu mentă are efect astringent și curăță bine pielea, îndepărtând eficient murdăria, sebumul și alte impurități, și, de asemenea, strânge porii.

Datorită proprietăților sale antibacteriene și antiseptice, elimi-

nă bacteriile care provoacă acnee, iar datorită acțiunii sale antiinflamatorii reduce umflăturile și roșeața.

În cadrul acestei activități, educabilii au învățat principiile de bază ale obținerii săpunului natural pe bază de mentă, din materie primă vegetală. Cunoștințele obținute au fost aplicate în practică în procesul de fabricare a săpunului cu adaos de mentă. Pe parcursul activității, au fost dezvoltate abilități de respectare a secvenței tehnologice, de acuratețe și de manipulare în siguranță a componentelor, precum și înțelegerea rolului substanțelor biologic active din plante în crearea produsului final. Realizarea proiectului a contribuit la dezvoltarea abilităților practice, a interesului cognitiv și a gândirii interdisciplinare, ceea ce confirmă eficiența abordării orientate spre practică în procesul de învățare.

6.3. Lumânări aromatice cu mentă

Lumânările aromatice reprezintă un element decorativ și funcțional popular în amenajarea interioară, care contribuie la crearea unei atmosfere confortabile și la îmbunătățirea stării emoționale a omului. Lumânările cu parfum de mentă prezintă un interes deosebit, deoarece uleiurile esențiale ale acestei plante au proprietăți revigorante și contribuie la creșterea concentrării. Pentru fabricarea acestor lumânări se pot folosi atât materiale sintetice, cât și naturale.

Ingrediente: 300 g ceară de soia (ceară de albine); 12 bucăți fitile; 15 g frunze proaspete de mentă bergamotă; 7 ml ulei esențial de mentă. În plus, sunt necesare forme de silicon pentru turnarea lumânărilor, un recipient pentru topirea cearii, un cuțit, un tocător, o lingură pentru amestecare și hârtie de copt.

Modul de preparare:

Procesul de fabricare începe cu pregătirea materiei prime vegetale. Frunzele proaspete de mentă se spală, se usucă și se mărunțesc fin pentru o eliberare mai eficientă a substanțelor aromatice. Apoi, ceara se pune într-un recipient termorezistent și se încălzește la baie de apă până la topirea completă. Temperatura de topire depinde de tipul de ceară utilizat și este de obicei între 50 și 80 °C (fig. 6.3).



Fig. 6.3. Unele secvențe din procesul tehnologic de fabricare a lumânărilor aromatice cu utilizarea mentei:
1 – pregătirea materiei vegetale; **2** – topirea bazei de ceară; **3** – transferul compoziției obținute în forme de silicon; **4** – produsele finite după finalizarea procesului de cristalizare a cerii

După ce se obține o consistență lichidă omogenă, se adaugă în ceara topită câteva picături de ulei esențial de mentă și frunzele mărunțite pregătite în prealabil. Amestecul se agită bine pentru a asigura o distribuție uniformă a componentelor aromatice. Apoi, fitilul se fixează în centrul formei de silicon și se toarnă cu grijă masa de ceară.

În etapa următoare, lumânarea se lasă la temperatura camerei până la întărirea completă. Timpul de răcire depinde de volumul produsului și poate varia de la câteva ore la o zi. După întărire, lumânările se scot din formă, dacă este necesar, fitilul se taie la o lungime

de 5-7 mm și se efectuează o evaluare vizuală a calității produsului.

Astfel, fabricarea lumânărilor aromatice cu mentă reprezintă un proces simplu din punct de vedere tehnologic, bazat pe introducerea componentelor aromatice naturale în baza de ceară. Produsul obținut combină proprietățile decorative cu un parfum plăcut și răcoritor, ceea ce îl face foarte căutat pentru utilizarea în condiții casnice.

6.4. Ciocolată cu mentă

Ciocolata este unul dintre cele mai populare deserturi din lume. Astăzi există o mulțime de variante ale acesteia, cu diverse adaosuri și arome. Una dintre combinațiile interesante este ciocolata cu mentă, care se remarcă prin aroma sa răcoritoare și gustul plăcut. O astfel de ciocolată poate fi preparată acasă din ingrediente naturale.

Scopul acestei lucrări a constat în studierea compoziției și modului de preparare a ciocolatei cu mentă, în condiții de casă.

Ingrediente: 100 g unt de cacao sau unt țărănesc; 5 linguri de pudră de cacao; 3-4 linguri de zahăr sau zahăr pudră; 2 linguri de lapte; 5-7 frunze proaspete de mentă; 200 ml frișcă, 10 g gelatină, 100 g ciocolată albă, nuci (opțional).

Modul de preparare:

Procesul de preparare a ciocolatei de casă cu mentă începe cu pregătirea ingredientelor. Frunzele proaspete de mentă se spală cu grijă sub jet de apă, se usucă și se toacă mărunt pentru a se elibera mai bine aroma și gustul. Gelatina se pune la hidratat cu apă. Untul se pune într-un recipient termorezistent și se încălzește la baie de apă până se topește complet. După aceea, în untul topit se adaugă treptat lapte, zahăr și pudră de cacao (fig. 6.4).



Fig. 6.4. Unele secvențe din procesul de pregătire a ciocolatei artizanale cu mentă:
1 – pregătirea ciocolatei negre; **2** – ciocoltă albă topită; **3** – formă din silicon; **4** – amestec de frișcă și mentă; **5** – transferul compoziției obținute în forme de silicon; **6** – figurine de ciocolată; **7** – frișcă cu mentă; **8** – ganache cu mentă; **9** – ganache cu mentă și ciocolată neagră; **10-11** produse finite

Compoziția obținută se amestecă continuu până se formează o masă de ciocolată omogenă, fără cocoloașe. În etapa următoare, se adaugă frunzele de mentă mărunțite în masa de ciocolată și se continuă amestecarea timp de câteva minute. Acest lucru contribuie la distri-

buirea uniformă a aromelor de mentă în întregul volum al produsului.

Paralel se amestecă frișca cu frunzele de mentă mărunțite si ulterior se încălzește, până la punctul de fierbere. În amestecul fierbinte se adaugă ciocolata albă. Ulterior în compoziție se adaugă gelatina topită. Masa finită se toarnă în forme pregătite în prealabil și se lasă la răcit la temperatura camerei. După răcirea preliminară, formele se pun în frigider timp de 6-8 ore, până la întărirea completă a compoziției. După întărire, figurinele se scot din forme. Peste figurine se toarnă ciocolată neagră. Produsul obținut are un gust caracteristic de ciocolată și un aromă răcoritoare de mentă.

În figura 6.4 sunt prezentate mostre de ciocolată cu mentă, realizate în cadrul lucrărilor practice ale elevilor. Ciocolata are forma unor tablete și a unor mici figurine. Pentru produsul finit a fost creată o etichetă de marcă, „CiocoMenta", care reflectă componenta gustativă principală – menta. Produsele au o structură bicoloră, care combină părțile de ciocolată și mentă, ceea ce le subliniază aspectul original. Produsele finite au fost ambalate și pregătite pentru prezentare și degustare.

În procesul tehnologic, s-a constatat că ciocolata cu mentă poate fi preparată acasă, de unul singur. Pentru aceasta se folosesc ingrediente simple și ușor de procurat. Adăugarea mentei conferă ciocolatei un gust și o aromă plăcută și răcoritoare. Prepararea ciocolatei de casă permite experimentarea cu ingredientele și obținerea unui produs natural de înaltă calitate.

6.5. Băuturi răcoritoare pe bază de mentă

Menta bergamotă are proprietăți antiinflamatorii, antispastice, și poate fi benefică pentru sistemul digestiv, ajutând la calmarea tulburărilor sau nervozității stomacale, greței și răului de mișcare. De asemenea, poate fi utilă pentru relaxarea mușchilor inflamați. În plus, menta bergamotă poate ajuta la susținerea sistemului imunitar și la asigurarea susținerii respirației, calmând inflamația și eliminând mucusul și congestia. Menta bergamotă este un remediu eficient împotriva grețurilor, tonifică sistemul digestiv, ficatul și pancreasul.

Însă în perioada estivală, cele mai răcoritoare băuturi sunt cele pe

bază de mentă. În această selecție se regăsesc rețete de băuturi cu acest ingredient proaspăt și revigorant, specifice verii: băutură răcoritoare cu mentă, ghimbir și lămâie verde; limonadă cu mentă; mohito cu lămâie și mentă, coctail cu lapte și mentă; compoturi cu diverse fructe și mentă etc.

Pentru studiu au fost selectate unele tipuri de băuturi răcoritoare pe bază de mentă bergamotă, care se deosebesc prin compoziție și caracteristici organoleptice. Au fost pregătire băuturi cu mentă, ghimbir și lămâie verde; limonadă de mentă; mojito fără alcool cu lămâie verde și mentă. Alegerea acestor băuturi se datorează utilizării pe scară largă a mentei ca ingredient natural aromatizant și gustativ, capabil să îmbunătățească proprietățile de consum ale băuturilor și să le confere un gust și un aromă răcoritoare.

Băutură răcoritoare cu mentă, ghimbir și lămâie verde (fig. 6.5)

Ingrediente: 10 g frunze proaspete de mentă; 30 g lămâie proaspătă; 5 g ghimbir proaspăt; 250 ml apă potabilă; 5 g miere.

Modul de preparare:

Frunzele de mentă se spală și se toacă ușor. Ghimbirul se curăță și se răzuiește pe o răzătoare fină, iar lămâia se taie în felii subțiri. Componentele pregătite se pun într-un recipient, se adaugă mierea și se toarnă apă potabilă. Compoziția se amestecă bine și se lasă la infuzat timp de 10-15 minute. După filtrare, băutura este gata de consum.

Băutura răcoritoare cu mentă, ghimbir și lămâie verde se caracterizează printr-un gust plăcut, acidulat și picant, și o aromă pronunțată. Datorită conținutului de ingrediente naturale de origine vegetală, băutura are proprietăți organoleptice deosebite și poate fi consumată pentru a potoli setea în perioada caldă a anului.

Limonadă cu mentă (fig. 6.5)

Ingrediente: 10 g frunze proaspete de mentă; 40 g lămâie proaspătă; 250 ml apă potabilă; 10 g zahăr.

Modul de preparare:

Lămâia se taie felii, frunzele de mentă se spală și se toacă mărunt. Ingredientele pregătite se pun într-un vas, se adaugă zahărul și apa. Amestecul se agită până la dizolvarea zahărului și se lasă la infuzat timp de 15 minute. Înainte de servire, băutura se răcește.



Fig. 6.5. Băuturi răcoritoare pe bază de mentă:
1 – băutură răcoritoare cu mentă, ghimbir și lămâie verde**, 2 –** limonadă cu mentă;
3 – mojito fără alcool cu lămâie verde și mentă

Limonada cu mentă este o băutură fără alcool, cu un gust răcoritor de citrice și aroma caracteristică a mentei. Combinația de lămâie și mentă contribuie la formarea unui profil gustativ armonios și sporește atractivitatea produsului pentru consumatori.

Mojito fără alcool cu lămâie verde și mentă (fig. 6.5)

Ingrediente: 12 g frunze proaspete de mentă; 40 g lime; 250 ml apă carbogazoasă; 10 g zahăr.

Modul de preparare:

Se pun frunzele de mentă într-un vas și se zdrobesc ușor. Apoi se adaugă bucățile de lime și zahărul. În etapa următoare se toarnă apă carbogazoasă răcită peste compoziție și se amestecă. Băutura se servește imediat după preparare.

Mojito fără alcool este o băutură răcoritoare populară, care se distinge prin aroma intensă de mentă și notele citrice de lămâie verde. Apa carbogazoasă conferă băuturii o textură ușoară și îi îmbunătățește caracteristicile gustative.

6.6. Zahăr aromatizat cu mentă

Zahărul mentolat este un produs aromat, cu un gust foarte plăcut și răcoritor și un ingredient excelent pentru mai multe preparate

culinare (fig. 6.6). Zahărul cu mentă poate este utilizat la impregnarea blaturilor, poate fi adăugat în umplutura diverselor produse de patiserie, pentru a face mai interesant gustul deserturilor și al sosurilor de fructe și fructe de pădure. Iar dacă acest preparat este adăugat în ceai, se obține o băutură extraordinar de aromată și sănătoasă.

***Ingrediente*:** 30-40 de grame de frunze de mentă bergamotă și 300 grame de zahăr.



Fig. 6.6. Zahăr aromatizat cu mentă:
1 – frunze de mentă; **2** – zahăr alb; **3** – produs finit, zahăr aromatizat cu mentă

Modul de preparare:

Frunzele proaspete de mentă se spală, se usucă și se mărunțesc până se obține o pastă omogenă. Apoi, zahărul se amestecă bine cu pasta omogenă de mentă până la distribuirea uniformă a componentelor vegetale. Amestecul obținut se distribuie uniform într-un strat subțire pe hârtie de copt și se lasă la temperatura camerei până la uscarea completă (8-12 ore). După uscare, produsul se mărunțește suplimentar și, dacă este necesar se cerne, pentru a obține o structură omogenă.

Zahărul cu aromă de mentă este un produs alimentar aromatizat, cu un miros și un gust pronunțat de mentă. Poate fi utilizat ca aditiv pentru băuturi și produse de patiserie, pentru a le conferi aroma caracteristică de mentă.

6.7. Bomboane de jeleu cu aromă de mentă bergamotă

Bomboanele de jeleu cu aromă de mentă sunt produse de cofetărie pe bază de agenți gelifianți (fig. 6.7).

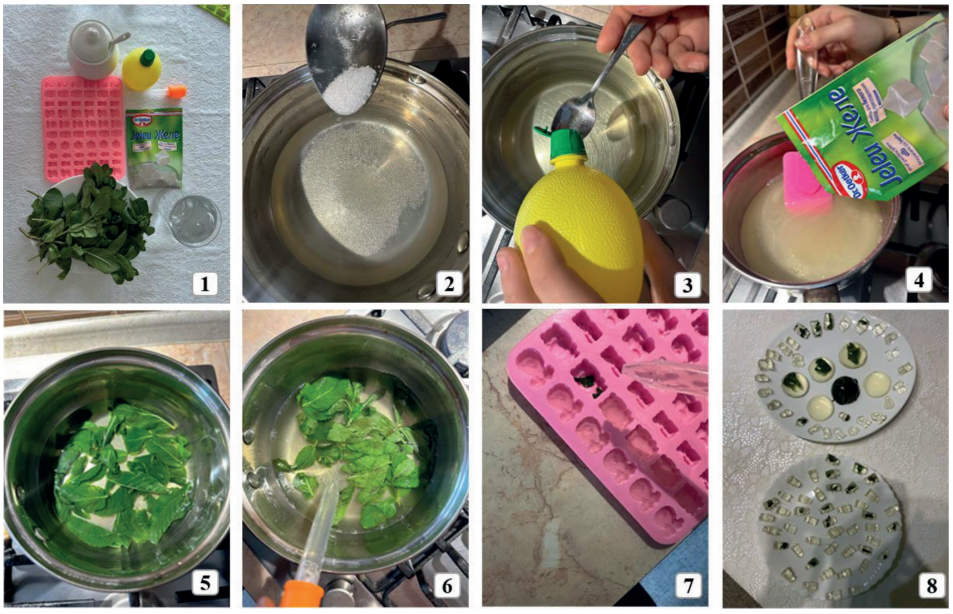


Fig. 6.7. Bomboane de jeleu cu aromă de mentă bergamotă:
1 – ingrediente și materiale necesare pentru preparare; **2** – dizolvarea zahărului în apă; **3** – adăugarea sucului de lămâie în baza de jeleu; **4** – încorporarea gelatinei hidratate în siropul cald; **5** – adăugarea frunzelor proaspete de mentă bergamotă în amestec; **6** – omogenizarea și filtrarea amestecului de jeleu; **7** – transferarea amestecului în forme de silicon; **8** – produsul finit, bomboane de jeleu cu aromă de mentă bergamotă după întărire

Aceste delicii au o textură moale și proprietăți gustative pronunțate. Adăugarea de mentă conferă produsului o aromă răcoritoare caracteristică și nuanțe gustative, ceea ce sporește atractivitatea sa pentru consumatori. Aceste produse sunt utilizate pe scară largă ca gustări dulci și produse de desert.

Ingrediente: 10 g gelatină; 100 ml apă potabilă; 50 g zahăr; 10 g frunze proaspete de mentă bergamotă; 5 ml suc de lămâie; 1-2 picături ulei esențial de mentă (opțional).

Modul de preparare:

Gelatina se toarnă în prealabil în 30-40 ml de apă și se lasă la hidratat timp de 10-15 minute. Restul cantității de apă se încălzește împreună cu zahărul până la dizolvarea completă a cristalelor, fără a se aduce la fierbere. Apoi se adaugă gelatina pregătită și se amestecă bine până se obține o masă omogenă.

Frunzele proaspete de mentă se spală, se toacă mărunt și se adaugă în baza caldă de gelatină împreună cu sucul de lămâie. Opțional se adaugă 1-2 picături de ulei esențial de mentă pentru a intensifica efectul aromatic. Amestecul se filtrează și se toarnă în forme. Ulterior, formele cu masa de jeleu se pun la frigider timp de 2-3 ore până la întărirea completă. După stabilizare, produsul se scoate din forme.

Bomboanele de jeleu cu aromă de mentă sunt un produs de cofetărie cu o consistență moale de jeleu și un aromă pronunțată și răcoritoare de mentă. Utilizarea componentelor vegetale asigură un profil gustativ și aromatic natural și îmbunătățește proprietățile organoleptice ale produsului.

6.8. Compoziții florale decorative cu mentă

În cadrul lucrărilor practice, s-au realizat aranjamente florale decorative folosind plante de mentă obținute prin metoda culturii *in vitro* și care au trecut cu succes prin etapa de aclimatizare la condițiile mediului exterior (fig. 6.8).



Fig. 6.8. Compoziții decorative din plante de mentă cultivate *in vitro* și adaptate la condițiile *ex vitro*

Pentru compozițiile florale s-au utilizat plante tinere de mentă cu forme și nuanțe diferite ale frunzelor, așezate în ghivece și coșuri decorative. Compozițiile au fost completate cu elemente decorative, ceea ce a permis creșterea atractivității lor estetice și demonstrarea posibilităților de utilizare practică a plantelor cultivate prin metode biotehnologice. Plantele obținute prin tehnica culturii *in vitro* pot servi drept exemplu de aplicare a materialului de plantare aclimatizat în amenajarea decorativă a spațiilor verzi și în fitodesign.

În concluzie, se poate remarca faptul că produsele pe bază de mentă bergamotă, elaborate de elevi, constituie un exemplu de punere în practică cu succes a unei abordări orientate spre practică în studierea proprietăților materiei prime vegetale și a utilizării acesteia în diverse produse funcționale. Aceste proiecte combină elemente de știință și creativitate, demonstrând că și componentele naturale simple pot deschide oportunități vaste pentru experimente și crearea de produse variate.

Realizarea acestor proiecte demonstrează, că includerea elementelor de dezvoltare a produselor în procesul educațional este o metodă eficientă de predare a biotehnologiilor la nivel preuniversitar. O astfel de abordare asigură integrarea cunoștințelor teoretice și a abilităților practice, contribuie la dezvoltarea gândirii critice și sporește motivația de învățare a elevilor. În plus, acesta formează înțelegerea principiilor de creare a produselor funcționale și a importanței acestora pentru sănătatea umană.

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

AKTER, K.T.; HOQUE, M.A. *In Vitro* Shoot Regeneration of Mint (*Mentha* Sp. L.) Using Different Types of Explants and Levels of Benzylaminopurine. *Bangladesh J. Agril. Res.* 2018, 43, pp. 703-716.

ANDRONIC, L.; SMEREA, S.; CĂLUGĂRU-SPĂTARU, T.; DASCALIUC A. *Biotehnologii in vitro în susținerea sectorului horticol: Recomandare metodică*. USM, Institutul de Genetică, Fiziologie şi Protecţie a Plantelor. Chişinău: Editura USM, 2025. 109 p. ISBN 978-9975-62-946-1.

ASADI, NARGES; HOSSEIN ZAREI; SEYYED HAMIDREZA HASHEMI-PETROUDI; SEYYED JAVAD MOUSAVIZADEH. Micropropagation and Assessment of Somaclonal Variation in Galanthus transcaucasicus *In Vitro* Plantlets. In: Ornamental Horticulture, 2021, 27 (4), pp. 505-515. https://doi.org/10.1590/2447-536X.v27i4.2320.

AZADI, PEJMAN; KHOSH-KHUI, MORTEZA. Micropropagation of *Lilium ledebourii* (Baker) Boiss as affected by plant growth regulator, sucrose concentration, harvesting season and cold treatments. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2007, 10 (4), pp. 582-591. https://dx.doi.org/10.4067/S0717-34582007000400011

BADEA, E.; RAICU, P. Culturi de celule şi ţesuturi vegetale. Aplicaţii în agricultură, Ceres, 1984. 143 p.

BADEA, E.M.; SĂNDULESCU, D. Biotehnologii Vegetale, Fundația Biotech, București 2001, 295 p.

BHAT, S.; MAHESHWARI, P.; KUMAR, S.; KUMAR, A. Mentha species: *In vitro* Regeneration and Genetic Transformation. In: *Molecular Biology Today*, 2002, 3 (1), pp. 11-23.

BISHOP, M.; DAVIS, A.P.; GRIMSHAW, J. *Snowdrops: a monograph of cultivated Galanthus*. Netley: Griffin Press, 2001.

BLAKESLEY, D.; EDWARDS, M.; KIERNAN, R.J. et al. Development of friable embryogenic callus and embryogenic suspension culture systems in cassava (*Manihot esculenta* Crantz), In: Nature Biotechnology, 1996, 14, pp. 726-730.

BRÎNZĂ, L.; CĂLUGĂRU-SPĂTARU, T.; LOZINSCHII, M.; COROPCEANU, E.; BOTEZATU, I. Development of the *in vitro* micropropagation protocol for the conservation of the species Pulsatilla grandis Wend. In: *Acta et commentationes (Ştiinţe Exacte şi ale Naturii)*, 2025, Vol. 19 (1), pp. 200-210. DOI: https://doi.org/10.36120/2587-3644.v19i1.200-210

CACHIŢĂ-COSMA, D.; SAND, C. Biotehnologie vegetală. vol I: Baze teoretice şi practice, Sibiu: Mira Design, 2000, 288 p.

CALALB, T.; LOZINSCHII, M. Biotehnologii Vegetale Aplicative: Manual pentru studenții Facultății de Farmacie. In: Universitatea de Start de Medicină și farmacie „Nicolae Testemițeanu". Chișinău: Print-Caro, 2026, 204 p. ISBN 987-5-85748-378-7.

CAPPELLARI, L.R.; SANTORO, M.V.; SCHMIDT, A.; GERSHENZON, J.; BANCHIO, E. Induction of essential oil production in Mentha x piperita by plant growth promoting bacteria was correlated with an increase in jasmonate and salicylate levels and a higher density of glandular trichomes. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2019, Vol. 141, pp. 142-153.

CARTEA ROȘIE A REPUBLICII MOLDOVA. Ministerul Mediului al Republicii Moldova, Academia de Științe a Moldovei, Grădina Botanică și Institutul de Zoologie; Comisia națională: Valeriu Munteanu [și alții]; redactori: Gheorghe Duca (președinte) [și alții]. Editura Știința, Chișinău, ediția a III-a, 2015, p. 123.

CASSELLS, AC. Pathogen and biological contamination management in plant tissue culture: phytopathogens, *vitro* pathogens, and vitro pests. Methods Mol Biol. 2012; vol. 877, pp. 57-80. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-818-4_6

COSMULESCU, SINA NICOLINA. Biotehnologii vegetale. In: Editura Univesritaria", 2024, 219 p. ISBN 978-606-14-2077-3.

CRUZ-CRUZ, C.A.; GONZÁLEZ-ARNAO, M.T.; ENGELMANN,

F. Biotechnology and Conservation of Plant Biodiversity. In: *Resources*, 2013. V. 2, pp. 73-95.

DAVIS, A. P.; OZHATAY, N. *Galanthus trojanus*: A new species of *Galanthus* (Amaryllidaceae) from north-western Turkey. In: *Botanical Journal of the Linnean Society*, 2008, 137 (4), pp. 409-412. https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2001.tb02335.x

DIHORU, GH.; NEGREAN, G. *Cartea roșie a plantelor din România*. București: Edit. Academiei Române, 2009, 630 p. ISBN 978-973-27-1705-9.

EL-NAGGAR, HANY M.; ASHRAF M. SHEHATA; MANEEA MOUBARAK; AMIRA R. OSMAN. Optimization of morphogenesis and *in vitro* production of five *Hyacinthus orientalis* cultivars. Horticulturae, 2023, 9, no. 2, p. 176. https://doi.org/10.3390/horticulturae9020176

ENGELMANN, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. In: *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant.,* 2011. V. 47, pp. 5-16.

FAHY G.M.; MACFARLANE D. R.; ANGELL C.A.; MERYMAN H.T. Vitrification as an approach to cryopreservation. In: *Cryobiology,* 1984. V. 21, pp. 407-426.

FAURE, O.; DIEMER, F.; MOJA, S.; JULLIEN, F. Mannitol and thidiazuron improve *in vitro* shoot regeneration from spearmint and peppermint leaf disks. In: *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 1998, 52, pp. 209-212.

GARCÍA-VÁZQUEZ, G.; CARRIÓN, G.; GUTIÉRREZ-MORA, A.; MATA-ROSAS, M. *In Vitro* Culture Strategies for the Conservation and Sustainable Use of *Vanilla planifolia* Andrews: A Comprehensive Review. In: J. Zool. Bot. Gard. 2026, 7(1), 9; https://doi.org/10.3390/jzbg7010009

GAO, J. Tissue culture and rapid multiplication techniques of *Apocynum* L. In: *Agricultural Science & Technology*, 2012, 13(11), 2269-2272.

GEORGE, E.F.; HALL, M.A.; KLERK, GJ.D. Plant Growth Regulators III: Gibberellins, Ethylene, Abscisic Acid, their Analogues and Inhibitors; Miscellaneous Compounds. In: *Plant Pro-*

pagation by Tissue Culture. Springer, Berlin. 2007, Vol. 1, pp. 227-281.

GEORGE, E.F.; HALL, M.A.; KLERK, GJ.D. Micropropagation: Uses and Methods. In: George, E.F., Hall, M.A., Klerk, GJ.D. (eds) Plant Propagation by Tissue Culture. Springer, Dordrecht. 2008, pp. 29-64. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5005-3_2

GEORGIEV, B.; SIDJIMOVA, B.; BERKOV S. Phytochemical and Cytotoxic Aspects of Amaryllidaceae Alkaloids in *Galanthus Species*: A Review. In: *Plants,* 2024. 13 (24), 3577, pp. 1-24. https://doi.org/10.3390/plants13243577

INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE. The IUCN red list of threatened species version. United Kingdom: International Union for Conservation of Nature and Natural Resources, 2018.

JULLIEN, F.; DIEMER, F.; COLSON, M.; FAURE, O. An optimising protocol for protoplast regeneration of three peppermint cultivars (*Mentha piperita*). In: *Plant Cell. Tissue Organ Cult*. 1998, 54, pp. 153-159.

KANE, M. E.; KAUTH, P. J.; STEWART, S. L. Micropropagation. In: Trigiano R. N., Gray D. J. (eds.), Plant Tissue Culture, Development, and Biotechnology. CRC Press, 2008.

KUROSAWA, E. Experimental studies on the nature of the substance secreted by the "bakanae" fungus (*Fusarium heterosporum*). In. *Transactions of the Natural History Society of Formosa*, 1926,16, pp. 213-227.

KYTE, LYDIANE; KLEYN, JOHN; SCOGGINS, HOLLY; BRIDGEN MARK. Plants from test tubes an introduction to micropropagation, Fourth Edition, 2013, 259 p. ISBN: 978-1-60469-206-8.

LASLO, V.; ZĂPÂRȚAN, M.; VICAȘ, S.; AGUD, E. Use of nodal explants in "*in vitro*" micro-propagation of *Mentha piperita* L. In: *Analele Universității din Oradea*, Fascicula Protecția Mediului, 2011, Vol. XVI, pp. 247-251.

LOZINSCHII, M. Inițierea *in vitro* a soiurilor de arbuști fructiferi drept sursă de material săditor. In: *Instruire prin cercetare pen-*

tru o societate prosperă: Biologie, Ed. 9, 19-20 martie 2022, Chişinău. Chişinău: Tipografia Universităţii de Stat din Tiraspol, 2022, Ediția 9, Vol.1, pp. 127-129. ISBN 978-9975-76-390-5 (PDF).

LOZINSCHII, M.; BRINZA, L., MOCREAC, N.; BADULESCU, L.; BATIRU, G. Biotechnologies for *in vitro* propagation of *Mentha x piperita* L. In: Agriculture for Life, Life for Agriculture. Book of Abstracts, section 2, Horticulture. Bucharest, 2026, p. 207. ISSN 2457-3213. ISSN-L 2457-3213.

LOZINSCHII, M.; BRÎNZĂ, L.; CALALB, T.; COROPCEANU, E. Development of a sustainable protocol for micropropagation of *Aronia melanocarpa* plants for agricultural and pharmaceutical purposes. In: International Scientific Conference *"Higher Education: Traditions, Values, Perspectives"*, September 19-20, 2025, pp. 669-681. DOI: 10.46727/c.v2.19-20-09-2025.p232-244

LOZINSCHII, M.; BRÎNZĂ, L.; COROPCEANU, E.; BOTEZATU, I. Importanța compoziției mediului nutritiv și a pH-lui în tehnologia de cultivare a vitroculturilor de mur. În: International scientific-practical conference *„Education through research for a prosperous society"*, 12th Edition, March 1-2, 2025. Chișinău: CEP UPSC, 2025. ISBN 978-9975-48-245-5. Volumul I (Științe ale naturii), pp. 435-443. ISBN 978-9975-48-246-2. ISBN 978-9975-48-247-9 (PDF).

LOZINSCHII, M.; BRÎNZĂ, L. Dezvoltarea competenței de investigare la elevi prin activități de cercetare. În: *Acta et commentationes, Sciences of Education*, 2024, no. 3 (37), pp. 123-130. ISSN 1857-0623. DOI: 10.36120/2587-3636.v37i3.123-130

LOZINSCHII, M.; BRÎNZĂ, L.; COROPCEANU, E. Dezvoltarea competențelor de investigare la elevi prin intermediul inter- și transdisciplinarității la orele de biologie. Conferinţa Ştiinţifică Internaţională „Abordări inter/transdisciplinare în predarea ştiinţelor reale, (concept STEAM)", ediţia a 4-a. Chisinau: IDIS „Viitorul", 1-2 noiembrie, 2024, pp. 498-505. ISBN 978-5-86654-132-4 (PDF). DOI: 10.46727/c.steam-2024.p498-505

LOZINSCHII, M.; CIORCHINA, N. Particularităţile microclonării soiurilor de mur fără spini 'Cester' şi 'Loch ness'. In: *Revista Botanică*, 2013, nr. 1 (6), pp. 15-24. ISSN 1857-236

LOZINSCHII, M.; CIORCHINA, Nina, CALALB, T. Micropropagation of blackberry cultivars-perspectives for Republic of Moldova. In: Marisia, Studii și materiale, Vol. XXXV, Târgu Mureș. Științele naturii, 2015, pp. 9-17.

LOZINSCHII, M.; MUNTEAN, N.; BRÎNZĂ, L.; CĂLUGĂRU-SPĂTARU, T.; COROPCEANU, E. *In vitro* micropropagation of snowdrop species (*Galanthus plicatus* M. Bieb.) and their importance in biodiversity conservation. In: 25th International Workshop for Young Scientists „BioPhys Spring 2026", 28th-29th May 2026, Prague, Czech Republic, pp. 83-84. ISBN 978-80-213-3564-6

ŁYCZKO, J.; PIOTROWSKI, K.; KOLASA, K. et al. *Mentha piperita* L. Micropropagation and the Potential Influence of Plant Growth Regulators on Volatile Organic Compound Composition. In: *Mollecules*, 7 June 2020, Vol. 25, 25(11). https://doi.org/10.3390/MOLECULES25112652

MAHDAVIKIA, F.; SAHARKHIZ, M.J. Phytotoxic activity of essential oil and water extract of peppermint (*Mentha× piperita* L. CV. Mitcham). In: *J. Appl. Res. Med. Aromat. Plants* 2015, *2*, pp. 146-153.

MALYAROVSKAYA, V.I.; SAMARINA, L.S.; RAKHMANGULOV, R.S.; KONINSKAYA, N.G. Study of micropropagation stages of *Galánthus woronowii* Losinsk. In: *Biotechnology*, 2018, vol. 55, pp. 71-77.

MASTELIC, J.; MILOS, M.; KUSTRAK, D. Free and glycosidically bound volatiles *of Mentha citrata* Ehrh. In: *Croat. Chem. Acta*, 2000, 73, pp. 781-794.

MAXTED, N.; FORD-LLOYD B.V.; HAWKES J.G. Complementary conservation strategies. In: Plant genetic conservation: the *in situ* approach. London, 1997, pp. 15-41.

MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and applications. In: *Amer J. Physiol.,* 1984, 247 (Cell Physiol 16), pp. 125-142.

MERYMAN, H.T.; WILLIAMS, R.J.; DOUGLAS, M. S.J. Freezing injury from solution effects and its prevention by natural or artificial cryoprotection. In: *Cryobiology,* 1977, v. 14, pp. 287-302.

MINISTERUL EDUCAȚIEI, CULTURII ȘI CERCETĂRII AL REPUBLICII MOLDOVA. Curriculum național. Aria curriculară Matematică și Științe. Disciplina Biologie. Clasele a X-a – a XII-a. Chișinău, 2019.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. In: *Physiologia Plantarum,* 1962, volume 15, Issue 3, pp. 473-497. https://doi.org/10.1111/j.1399-3054-1962.tb08052.x

NAIR, A.J. Introduction to biotechnology and genetic engineering. New Delhi: INFINITY SCIENCE PRESS LLC, 2008, 812 p. ISBN-13: 978-1-934015-16-2

NOVIKOVA, T.I. Use of biothechnological approaches for the conservation of plant biodiversity. In: Растительный мир Азиатской России, 2013, № 2(12), с. 119-128.

OKUMOTO, S. Quantitative imaging using genetically encoded sensors for small molecules in plants. In: *Plant J*. 2012; 70, pp. 108-117.

OUAKOUAK, H.; BENCHIKHA, A.; HASSANI, A.; ASHOUR, M. Chemical composition and biological activity of Mentha citrata Ehrh., essential oils growing in southern Algeria. In: *J. Food Sci Technol*., 2019, 56 (12), pp. 5346-5353.

PALII, A.; COMAROV, G.; LOZAN, A.; SCORPAN, V. Biotehnologii moderne în fitotehnie și biosecuritate. Tipografia Centrală. Chișinău, 2004, 232 p. ISBN 9975-78-351-1.

PAUNESCU, A. Biotechnology for Endangered Plant Conservation: A Critical Overview. In: *Romanian Biotechnological Letters*, Vol. 14, No. 1, 2009, pp. 4095-4103.

PAWŁOWSKA, B.; PTAK, A. Application of *in vitro* culture and biotechnology for the protection of endangered national plant species in Poland. In: *Acta Soc. Bot. Pol*. 2023; 92(1); DOI: https://doi.org/10.5586/asbp.9202

PIERIK, R. L. M. *In Vitro* Culture of Higher Plants. Springer Dor-

drecht. 1997, 348 p. ISBN: 978-0-7923-4527-5; DOI: https://doi.org/10.1007/978-94-011-5750-6

PÎNZARU, P. Flora vasculară din Republica Moldova (lista speciilor și ecologia). *Ed. a 3-a. Vol. I. Plantele vasculare spontane*. Chișinău: CEP UPSC, 2023, 226 p. ISBN 978-9975-46-806-0.

PRAGADHEESH, V.S.; YADAV, A.; CHANOTIYA, C.S. Chiral differentiation of terpenoids in bergamot mint (*Mentha citrata*) cultivar Kiran: A non-menthol mint essential oil. In: *J. Med Aromat Plant Sci*, 2020, 42 (2), pp. 138-144.

RADOMIR, A.-M.; STAN, R.; FLOREA, A.; CIOBOTEA, C.-M.; BĂNUȚĂ, F.M.; NEGRU, M.; NEBLEA, M.A.; SUMEDREA, D.I. Overview of the Success of In Vitro Culture for Ex Situ Conservation and Sustainable Utilization of Endemic and Subendemic Native Plants of Romania. In: *Sustainability*, 2023, 15, 2581. https://doi.org/10.3390/su15032581

RAMSAY, M.M.; JACSKON, A.D.; PORLEY, R.D. A Pilot Study for *ex situ* Conservation of UK Bryophytes. In: Proc. of Euro Gard 2000-II European Botanic Garden Congress. Richmond, 2000, pp. 52-57.

REED, B.M.; UCHENDU, E. Controlled rate cooling. In: Reed B. M. (ed) Plant cryopreservation: a practical guide. Springer, Berlin, 2008, pp. 77-92.

SAMANTARAY, A.; SIAL, P.; KAR, M. Micro-propagation and biochemical analysis of Spear Mint (*Mentha spicata*). In: *Indian J. Innov. Dev.* 2012, *1*, pp. 489-493.

SANTORO, M.V.; NIEVAS, F.; ZYGADLO, J.; GIORDANO, W.; BANCHIO, E. Effects of Growth Regulators on Biomass and the Production of Secondary Metabolites in Peppermint (*Mentha piperita*) Micropropagated *in Vitro*. In: *J. Plant Sci*, 2013, 4, pp. 49-55.

SANTOS, ARLETE; FERNANDA FIDALGO; IRMAMARIA DE MORAES SANTOS; ROBERTO SALEMA. *In Vitr*o Bulb Formation of Narcissus asturiensis, a Threatened Species of the Amaryllidaceae. In: The Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 2002. 77 (2): pp. 149-152. https://doi.org/10.1

080/14620316.2002.11511471.

SAYED SHAQUR, AHMED; HOMAYRA, HUQ; FARHANA, AFRIN VABNA; FAHIMA. KHATUN. Micropropagation of mint *(Mentha spicata*). In: *International Journal of Biosciences,* 2024, Vol. 25, No. 2, pp. 97-102.

SHARAN, A.K.; DUBEY, S.R.; KUMARI, S.; CHANDRA, V.; SINGH, B.P.; KUMAR, G. Effect of combination of different hormones on Micro propagation of *Mentha* sps. In: *Ann. Plant Sci.* 2014, *3*, pp. 837-844.

STAIKIDOU, I.; SELBY, C.; HANKS, G. Stimulation of *in vitro* bulblet growth in *Galanthus* species with sucrose and activated charcoal. In. *Acta Hortic*., 2006, 725, pp. 421-426. https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2006.725.57

STREET H.E. (ed.). Plant Tissue and Cell Culture. 2nd edition, Botanical Monographs, vol. 11. Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, Edinburgh, Melbourne, 1977, 614 p.

TALANKOVA-SEREDA, T.E.; KOLOMIETS, J.V.; HOLUBENKO, A.V.; NUZHYNA, N.V. The influence of clonal micropropagation on productivity and di erentiation of *Mentha piperita* plant tissues. In: *Regul. Mech. Biosyst*., 2019, 10, pp. 337-344.

TASSY, C.; FEUILLET, C.; BARRET, P. A method for the medium-term storage of plant tissue samples at room temperature and successive cycles of DNA extraction. In: *Plant Mol. Biol. Rep.,* 2006. Vol. 24, pp. 247-248.

TEIXEIRA L. F.; ALVES de ASSIS R. M.; BATISTA da SILVA A. C. et al. Light and natural ventilation systems optimize the growth and production of volatile compounds in micropropagated *Mentha piperita* L. In: *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant.* 2026. https://doi.org/10.1007/s11627-026-10645-6

TELEUȚĂ, A.; COLȚUN, M:; MIHĂILESCU; C.; CIOCÂRLAN, N. Plante medicinale. În: editura „Litera Internaţional“, 2008. 336 p. ISBN 978-9975-74-009-8

THOMAS, TD. The role of activated charcoal in plant tissue culture. Biotechnol Adv. 2008 Nov-Dec; 26 (6), pp. 618-31. https://doi.

org/10.1016/j.biotechadv.2008.08.003

TILLY-MANDY, ANDREA; JAMBOR-BENCZUR, ERSZEBET; SZABO, J.. Results with the Micropropagation of Galanthus elwesii and Galanthus nivalis 'Flore Pleno'." Acta Horticulturae, 2006. 725, pp. 439-444. https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2006.725.61.

TIPIRDAMAZ, R.; ELLIALTIOĞLU, Ş.; ÇAKIRLAR, H. The Micropropagation of Snowdrop (*Galanthus ikariae* Baker.): Effects of Different Explant Types, Carbonhydrat Sources and Doses and pH Changes in the Medium on the Bulblet Formation. In: Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 1999, 23 *(*10), pp. 823-830. ISSN: 1300-011X; eISSN: 1303-6173.

TYMOSZUK, A.; KULUS, D. *In Vitro* Technology and Micropropagated Plants. MDPI, Basel, Switzerland. 2024, 204 p. ISBN 978-3-7258-0279-1; doi.org/10.3390/books978-3-7258-0280-7

VRUNDHA, C.P.K.; ASWATHI, N.V.; THOMAS, T.D. The Role of Meta-topolin in Plant Morphogenesis In Vitro. În: Ahmad, N., Strnad, M. (eds.), Meta-topolin: A Growth Regulator for Plant Biotechnology and Agriculture. Springer, 2021, pp. 93-118.

WILLIS, J.C. Amaryllidaceae. In: Shaw, A.H.K. (Ed.), A Dictionary of the Flowering Plants & Ferns, 8th edn. Cambridge University Press, Cambridge, 1988.

YOUSEFIAN, S.; ESMAEILI, F.; LOHRASEBI, T. A Comprehensive Review of the Key Characteristics of the Genus *Mentha*, Natural Compounds and Biotechnological Approaches for the Production of Secondary Metabolites. In: *Iran J Biotechnol*., 2023, 21 (4), e3605. doi: 10.30498/ijb.2023.380485.3605.

ZHONG, J. Amaryllidaceae and Sceletium alkaloids. In: *Natural Products Reports*, 2013. 30 (6), pp. 849-868. doi: 10.1039/c3np70005d

GLOSAR DE TERMENI

Aclimatizare – obișnuirea treptată a plantelor regenerate cu condițiile mediului exterior.

Adaptare *ex vitro* – adaptarea plantelor la condiții nesterile după transferul din mediul *in vitro* în sol sau în substrat.

Agar – agent de solidificare utilizat la prepararea mediilor nutritive.

Androgeneză – proces de formare a embrionilor sau plantelor haploide din celule gametofitice masculine, de obicei din antere sau microspori.

Asepsie – ansamblul metodelor utilizate pentru prevenirea contaminării culturilor biologice cu microorganisme nedorite.

Autoclavare – metodă de sterilizare bazată pe utilizarea vaporilor de apă sub presiune și temperatură ridicată, folosită pentru sterilizarea mediilor nutritive și materialelor de laborator.

Bancă de gene – colecție organizată de material genetic vegetal păstrat pentru conservarea biodiversității și utilizarea în cercetare sau ameliorare.

Bancă de gene *in vitro* – colecție de plante, țesuturi sau organe vegetale menținute în condiții sterile pe medii nutritive artificiale pentru conservarea resurselor genetice.

Biodiversitate – varietatea organismelor vii, ecosistemelor și resurselor genetice existente într-un anumit mediu.

Bioreactor – dispozitiv pentru cultivarea celulelor, țesuturilor sau explantelor în condiții controlate pe un mediu nutritiv.

Biotehnologie vegetală – domeniu interdisciplinar care utilizează organisme, celule și țesuturi vegetale pentru obținerea unor produse, tehnologii sau soluții aplicative.

Calus – masă nediferențiată de celule vegetale ce se divid activ și care se formează pe un mediu nutritiv sub acțiunea fitohormonilor. Poate servi drept sursă de regenerare a unor organe noi sau a unor plante întregi.

Caulogeneză – proces biologic de formare și dezvoltare a lăstarilor din celule sau țesuturi vegetale.

Cibrid – o celulă hibridă sau un organism obținut prin fuzionarea nucleului unei celule cu citoplasma provenită de la altă celulă.

Clonarea plantelor – proces de obținere a unor plante identice din punct de vedere genetic pornind de la o singură plantă, celulă, țesut sau organ, prin utilizarea metodelor de înmulțire vegetativă și a biotehnologiei *in vitro*.

Clorază – îngălbenirea țesuturilor vegetale, cauzată de reducerea conținutului de clorofilă.

Contaminare – prezența microorganismelor patogene în cultura *in vitro*.

Contaminare bacteriană – contaminare produsă de bacterii în culturile *in vitro*.

Contaminare fungică – contaminare produsă de fungi / mucegaiuri în culturile *in vitro*.

Crioconservare – metodă de conservare pe termen lung a celulelor, țesuturilor sau plasmei embrionare la temperaturi extrem de scăzute (de obicei în azot lichid, la -196 °C), menținându-le viabilitatea după decongelare.

Cultură de antere – metodă biotehnologică prin care anterele sunt cultivate *in vitro* pentru obținerea plantelor haploide.

Cultură de calus – cultivarea țesutului vegetal nediferențiat pentru studierea proceselor de regenerare și morfogeneză.

Cultura de celule – cultivarea celulelor individuale sau a agregatelor celulare.

Cultură de meristeme – cultivarea țesuturilor meristematice utilizată pentru multiplicarea plantelor și obținerea materialului vegetal liber de agenți patogeni.

Cultură de microspori – tehnică utilizată pentru obținerea plantelor haploide pornind de la celulele gametofitului masculin.

Cultura de organe – cultivarea organelor izolate (rădăcini, lăstari, embrioni etc.).

Cultură de protoplaști – cultivarea celulelor vegetale fără perete celular, utilizată în cercetarea genetică și hibridarea somatică.

Cultura de țesuturi – cultivarea țesuturilor vegetale în condiții artificiale.

Cultura *in vitro* – cultivarea celulelor, țesuturilor sau organelor vegetale în condiții artificiale sterile, pe un mediu nutritiv.

Cultură meristematică – cultură *in vitro* inițiată din meristeme, utilizată frecvent pentru obținerea plantelor sănătoase, libere de patogeni.

Diferențiere celulară – proces prin care celulele capătă caracteristici structurale și funcționale specifice.

Embriogeneză somatică – proces prin care celulele somatice formează embrioni capabili să regenereze plante complete.

Ex situ – conservarea, studierea sau gestionarea organismelor în afara mediului lor natural, în condiții create artificial sau controlate.

Ex vitro – se referă la condițiile de cultivare sau transfer al plantelor în afara culturii sterile *in vitro*, adică într-un mediu natural sau nesteril (sol, substrat, seră).

Explant – fragment de plantă utilizat pentru introducerea în cultura *in vitro.*

Explant nodal – fragment de tulpină care conține unul sau mai mulți muguri axilari.

Explant primar – fragment de plantă prelevat inițial pentru introducerea în cultură *in vitro*.

Fază de aclimatizare – etapa de adaptare treptată a plantelor *in vitro* la condiții *ex vitro*.

Fază de inițiere – etapa în care explantul este introdus pentru prima dată în condiții *in vitro*.

Fază de multiplicare – etapa în care se stimulează formarea și proliferarea lăstarilor.

Fază de rizogeneză – etapa în care se induce formarea rădăcinilor la lăstarii obținuți *in vitro*.

Fenoli – compuși organici produși de plante, care pot determina brunificarea și deteriorarea țesuturilor în cultură *in vitro*.

Fitohormoni – substanțe naturale produse de plante care controlează creșterea și dezvoltarea acestora.

Fitotron – cameră climatică, în care factorii de mediu precum

temperatura, lumina, umiditatea și concentrația de CO_2 sunt controlați artificial pentru a studia creșterea și dezvoltarea plantelor.

Fotoperiodism – răspunsul plantelor la durata perioadelor de lumină și întuneric.

Germoplasmă – totalitatea resurselor genetice ale unei specii utilizate pentru conservare, cercetare și ameliorare.

Ginandrogeneză – proces de obținere a plantelor haploide prin stimularea dezvoltării celulelor gametofitice feminine.

Haploid – organism sau celulă care conține un singur set de cromozomi.

Hiperhidricitate – dereglare fiziologică a plantelor *in vitro*, caracterizată prin aspect apos, translucid și fragil al țesuturilor.

Homozigot – organism care prezintă două alele identice pentru un anumit caracter genetic.

In situ – conservarea, studierea sau gestionarea organismelor direct în mediul lor natural.

In vitro – cultivarea explantelor în condiții artificiale sterile, de obicei pe medii nutritive în laborator.

Inițierea culturii – etapa de introducere a explantului în condiții sterile și de începere a creșterii acestuia pe un mediu nutritiv în condiții *in vitro*.

Înmulțirea microclonală – înmulțirea vegetativă în masă a plantelor în cultura de țesuturi.

Inoculare – introducerea unui explant într-un mediu nutritiv steril pentru inițierea culturii.

Înrădăcinare – procesul de formare a rădăcinilor la lăstarii obținuți în cultură *in vitro*, pe un mediu nutritiv adecvat.

Intensitate luminoasă – cantitatea de lumină disponibilă pentru creșterea și dezvoltarea plantelor.

Medii nutritive – amestecuri de substanțe minerale, organice, vitamine și regulatori de creștere necesare dezvoltării culturilor *in vitro*.

Mediul MS (Murashige-Skoog) – mediu nutritiv utilizat pe scară largă în culturile vegetale *in vitro*, bogat în macroelemente și microelemente.

Meristem – țesut vegetal format din celule tinere, cu capacitate intensă de diviziune.

Metaboliți secundari – compuși organici care nu participă direct la creșterea și dezvoltarea plantei, dar care îndeplinesc funcții de apărare.

Micropropagare – tehnică de multiplicare rapidă a plantelor prin metode *in vitro*, obținând un număr mare de plante identice genetic.

Morfogeneză – procesul de formare și dezvoltare a structurilor vegetale (organe, țesuturi).

Mugure apical – mugure situat la vârful tulpinii, responsabil de creșterea în lungime a plantei.

Mugure axilar – mugure situat la baza frunzei, capabil să formeze un lăstar nou.

Multiplicare – etapa de înmulțire în masă a lăstarilor sau a țesuturilor în cultura *in vitro* pentru creșterea numărului de plante.

Necroză – moartea localizată a celulelor sau țesuturilor vegetale.

Organogeneză – formarea organelor vegetale (rădăcini, lăstari) din celule sau țesuturi cultivate *in vitro*.

Oxidare fenolică – brunificarea explantelor ca urmare a eliberării și oxidării compușilor fenolici.

Pasaj – transferul unei culturi celulare sau tisulare într-un mediu nutritiv proaspăt pentru a-i menține creșterea și viabilitatea.

Plantă regenerată – plantă obținută dintr-o cultură de celule, țesuturi sau organe ca urmare a regenerării *in vitro*.

Pupinel – sterilizator cu aer cald.

Regenerare vegetală – capacitatea țesuturilor sau celulelor vegetale de a forma o plantă completă.

Regenerarea plantelor – obținerea unei plante întregi dintr-o celulă, țesut sau organ.

Regulatori de creștere vegetală – compuși naturali sau sintetici care influențează procesele de creștere și dezvoltare ale plantelor.

Rizogeneză – procesul de inițiere și formare a rădăcinilor.

Sterilizare – eliminarea microorganismelor de pe suprafețe, instrumente, medii nutritive sau material vegetal.

Sterilizare – proces de eliminare sau distrugere a microorganismelor.

Subcultivare – transferul periodic al culturilor vegetale pe medii nutritive proaspete pentru menținerea creșterii.

Subcultivrare – transferul periodic al materialului vegetal pe mediu nutritiv proaspăt.

Sucroză – sursă de carbon utilizată frecvent în mediile nutritive.

Termoterapie – metodă de eliminare sau reducere a patogenilor prin expunerea materialului vegetal la temperaturi controlate.

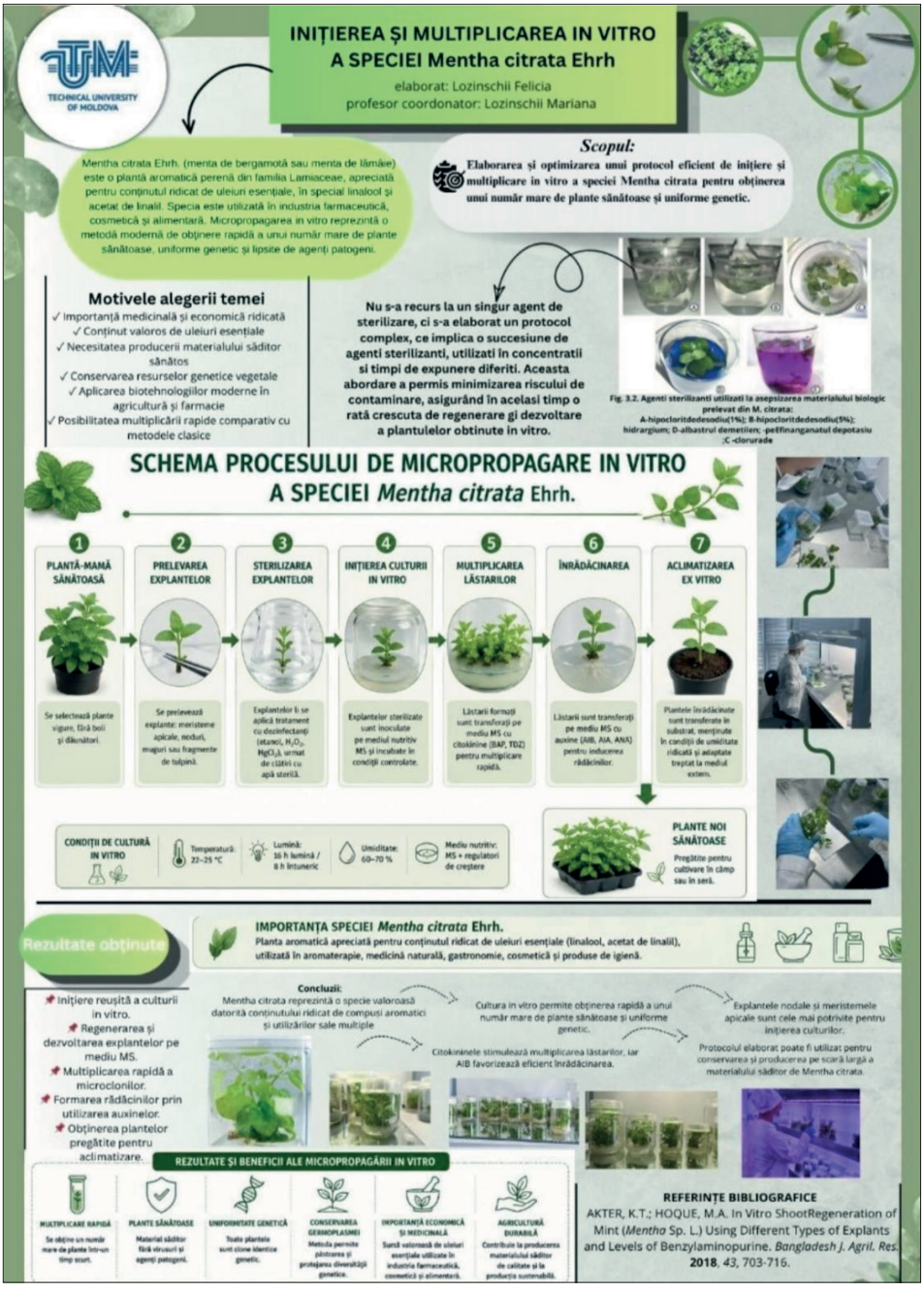
Totipotență – capacitatea unei celule vegetale de a da naștere unui organism complet, incluzând toate organele și țesuturile.

Variabilitate somaclonală – modificări genetice sau epigenetice apărute în timpul cultivării îndelungate *in vitro*.

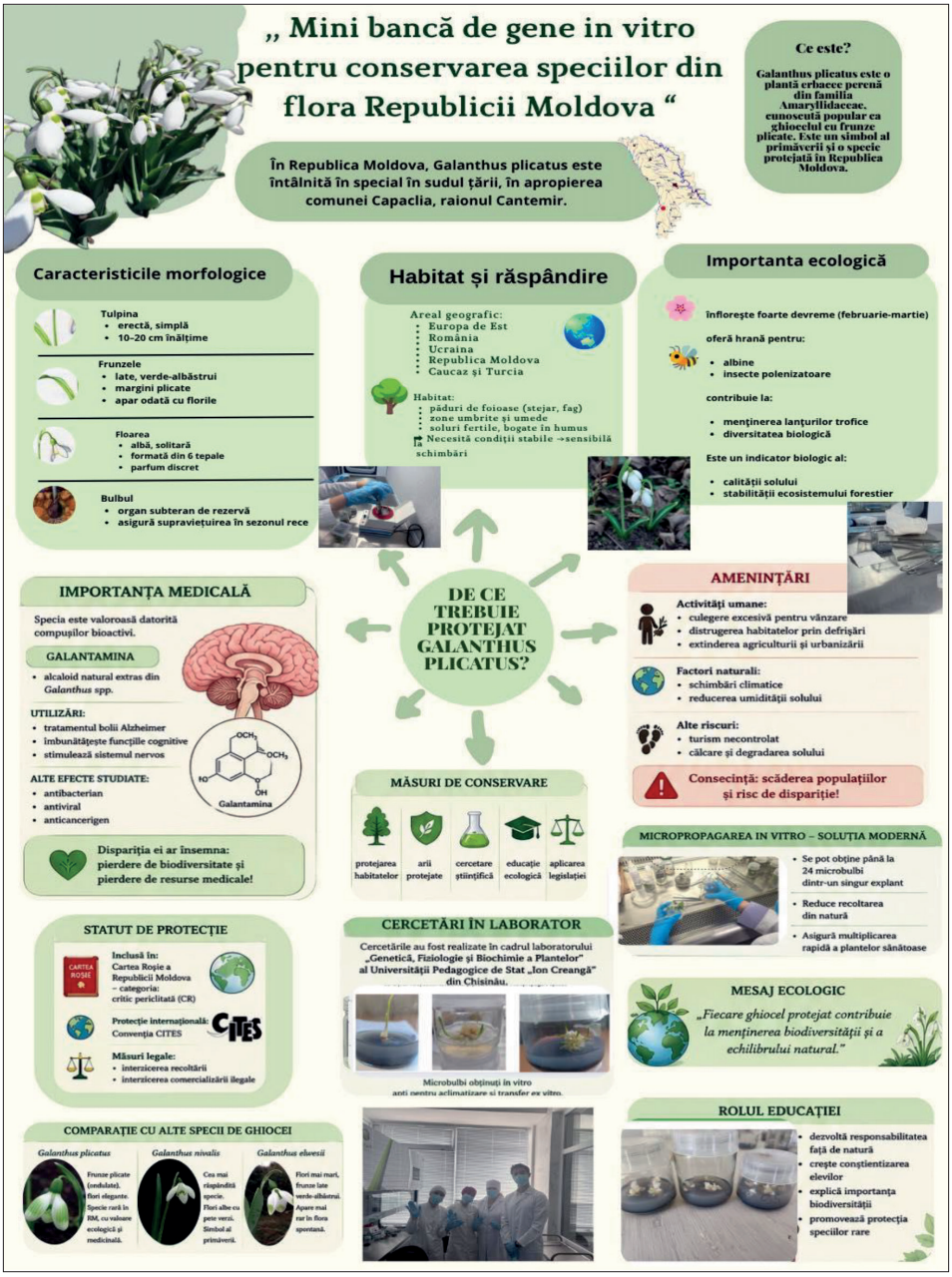
Vitrificare – metodă de răcire extrem de rapidă, în cadrul căreia lichidul trece în stare solidă, asemănătoare sticlei, fără a se forma cristale de gheață.

ANEXE (proiecte realizate de elevi și studenți)

Anexa 1. Proiect: „Inițierea și multiplicarea *in vitro* a speciei *Mentha citrata* Ehrh.”



Anexa 2. Proiect: „Mini bancă de gene *in vitro* pentru conservarea speciilor din flora Republicii Moldova”



Anexa 3. Proiect: *„Pinguicula vulgaris”*

Biotehnologiile aplicate în gestionarea ecologică a dăunătorilor în zonele protejate

PINGUICULA VULGARIS

Structura plantei:

Planta este organizată într-o rozetă bazală compactă (Ø 5-16 cm) de frunze cărnoase, lipite de sol, cu marginile răsucite în sus. Epiderma foliară este bifuncțională, acoperită de glande pedunculate (care secretă cleiul pentru capturarea insectelor) și glande sesile (care secretă enzimele pentru digestie și absorbție directă).





Mecanismul de capcană naturală

Frunzele funcționează ca o capcană adezivă activă (tip „hârtie de muște”), bazată pe două tipuri de glande foliare:

1)Glandele pedunculate: Secretă un mucilagiu lipicios și strălucitor care atrage vizual și imobilizează insectele la contact.

2)Glandele sesile: Secretă enzime digestive (proteaze) care dizolvă prada și absorb nutrienții (azot, fosfor) direct în plantă.

Printr-o mișcare lentă (tigmotropism), marginile frunzei se răsucesc spre interior pentru a reține lichidul digestiv și a optimiza absorbția.







Scopul lucrării:

Multiplicarea in vitro și folosirea ca bioinstrument a Pinguiculei Vulgaris în gestionarea ecologică a insectelor dăunătoare în medii închise , inclusiv sere , florării , zone rezidențiale sau clădiri cu blocuri .



ETAPELE MULTIPLICĂRII IN VITRO

1. Selectarea materialului vegetal pentru inoculare



2. Prepararea mediilor nutritive



3. Asepsizare si sterilizarea materialului vegetal



4. Autoclavarea mediilor nutritive și a instrumentelor de lucru/ sterilizarea



5. Inocularea plantulelor pe mediul nutritiv



6. Creșterea și dezvoltarea in vitro plantulelor în condiții controlate



7. Adaptarea plantelor Ex vitro în mini sere specializate



8. Sădirea plantelor în ghivece sau în sol



MACROELEMENTE

Substanța	Concentrația g/l
NH_4NO_3	16,5
KNO_3	19,0
$CaCl_2 * 2H_2O$	0,44
$MgSO_4 * 7H_2O$	3,7
KH_3PO_4	1,7

MICROELEMENTE

Substanța	Concentrația mg/l
H_3BO_3	6,2
$MnSO_4 * 4H_2O$	22,3
$ZnSO_4 * 7H_2O$	8,6
$Na_2MoO_4 * 2H_2O$	0,25
$CuSO_4 * 5H_2O$	0,025
$CoCl_2 * 6H_2O$	0,025
KI	0,83

Importanța în medicină

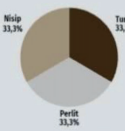
Enzime digestive (Pinguiculină, Proteaze): Sunt substanțele principale care dizolvă insectele. Din punct de vedere medical, ele au un efect antiseptic și antibacterian puternic, distrugând membranele bacteriilor (de aceea, în trecut, frunzele zdrobite se puneau direct pe răni pentru a preveni infecțiile). Acizi organici (Acid benzoic): Este un conservant natural produs de plantă. Are un rol antifungic demonstrat, oprind dezvoltarea ciupercilor și a mucegaiurilor. Flavonoide: Compuși vegetali cu efect antioxidant și antiinflamator. Aceștia ajută la reducerea iritațiilor.

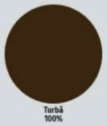




Variante de sol folosite pentru plantare







- Turbă 100%: Foarte bună pentru nutriție și aciditate. Oferă exact pH-ul acid și umiditatea constantă pe care planta le are în natură. Singurul minus este că, în timp, se poate tasa în ghiveci dacă nu este amestecată.
- 50% Turbă + 50% Perlit: Optimă pentru aerare. Perlitul menține turba afânată, permițând rădăcinilor fine să respire mai bine și stimulând creșterea frunzelor.
- 33% Turbă + 33% Perlit + 33% Nisip: Optimă pentru stabilitate. Nisipul adaugă greutate structurală, oferind rozetei o ancorare mecanică excelentă și un drenaj superior.







Biocontrolul Natural

Pinguicula vulgaris funcționează ca o capcană biologică activă și ecologică datorită frunzelor sale lipicioase. Aceasta este specializată strict pe insecte de talie mică, fiind ideală pentru controlul dăunătorilor în diverse spații: În Sere: Elimină eficient dăunătorii majori care distrug culturile, precum musculițele de pământ (Sciaridae), musculița albă de seră, thripșii și afidele înaripate (păduchii de plante), înlocuind cu succes insecticidele chimice toxice. În Locuințe: Controlează natural și sigur populațiile de musculițe de oțet (de fructe) și țânțari, fără a emana substanțe chimice sau alergeni în spațiul de locuit. În Instituții (Școli, Cabinete, Laboratoare): Menține igiena prin capturarea insectelor minuscule purtătoare de bacterii (inclusiv collembolele din sol), având în același timp un rol estetic, ecologic





Eficiența Economică

Statut pe piața locală (Republica Moldova): Specie de nișă, exotică, cu disponibilitate redusă în florăriile comerciale standard. Se comercializează preponderent prin comenzi speciale de la sere europene sau prin intermediul colecționarilor privați.

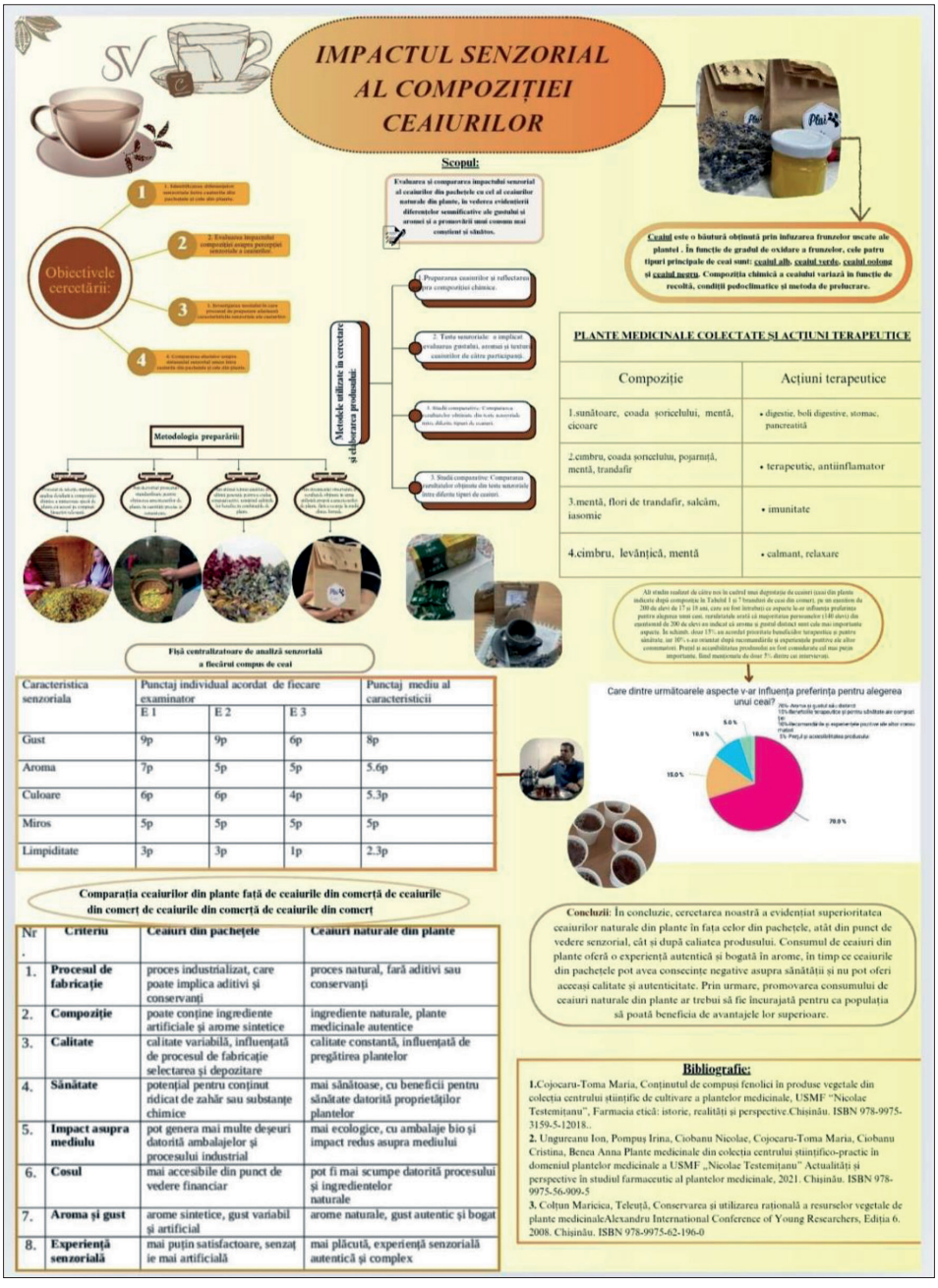
Preț de achiziție estimat: Variază între 150 și 300 MDL per exemplar (în funcție de diametrul rozetei și maturitatea plantei)







Anexa 4. Proiect: „Impactul senzorial al compoziției ceaiurilor”



Caracteristica senzoriala	Punctaj individual acordat de fiecare examinator			Punctaj mediu al caracteristicii
	E 1	E 2	E 3	
Gust	9p	9p	6p	8p
Aroma	7p	5p	5p	5.6p
Culoare	6p	6p	4p	5.3p
Miros	5p	5p	5p	5p
Limpiditate	3p	3p	1p	2.3p

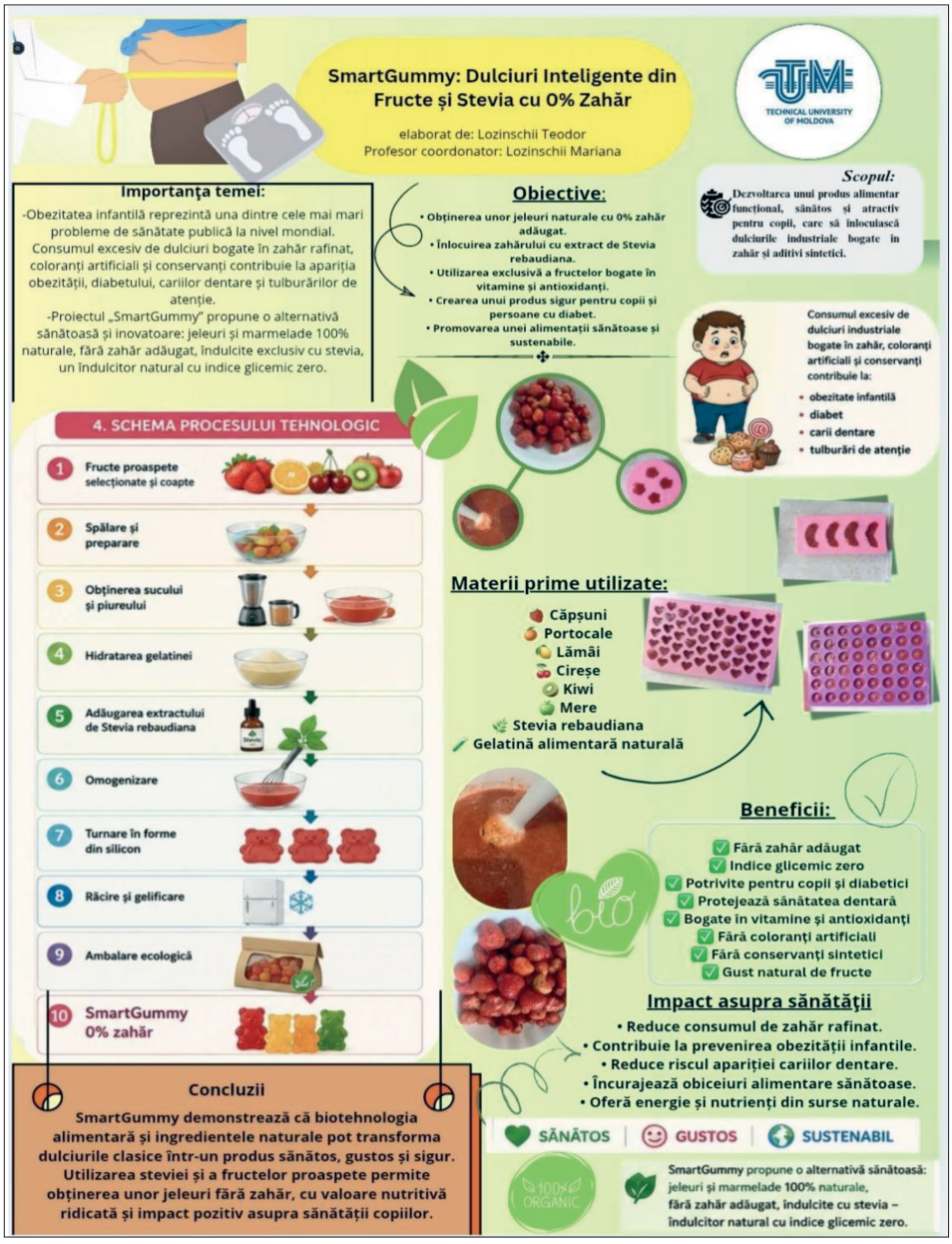
Comparația ceaiurilor din plante față de ceaiurile din comerț de ceaiurile din comerț de ceaiurile din comerț de ceaiurile din comerț

Nr.	Criteriu	Ceaiuri din pachețele	Ceaiuri naturale din plante
1.	**Procesul de fabricație**	proces industrializat, care poate implica aditivi și conservanți	proces natural, fără aditivi sau conservanți
2.	**Compoziție**	poate conține ingrediente artificiale și arome sintetice	ingrediente naturale, plante medicinale autentice
3.	**Calitate**	calitate variabilă, influențată de procesul de fabricație selectarea și depozitare	calitate constantă, influențată de prelucrarea plantelor
4.	**Sănătate**	potențial pentru conținut ridicat de zahăr sau substanțe chimice	mai sănătoase, cu beneficii pentru sănătate datorită proprietăților plantelor
5.	**Impact asupra mediului**	pot genera mai multe deșeuri datorită ambalajelor și procesului industrial	mai ecologice, cu ambalaje bio și impact redus asupra mediului
6.	**Cosul**	mai accesibile din punct de vedere financiar	pot fi mai scumpe datorită procesului și ingredientelor naturale
7.	**Aroma și gust**	arome sintetice, gust variabil și artificial	arome naturale, gust autentic și bogat
8.	**Experiență senzorială**	mai puțin satisfactoare, senzație mai artificială	mai plăcută, experiență senzorială autentică și complex

Anexa 5. Proiect: „Inovații practice în combinarea plantelor pentru ceaiuri terapeutice”



Anexa 6. Proiect: „SmartGummy: Dulciuri inteligente din fructe și stevia cu 0% zahăr”



Anexa 7. Proiect: „Magie răcoroasă în fiecare bilă de înghețată”

Proiect:
Magie răcoroasă în fiecare bilă de înghețată

Serviri: 4 timp de pregatire: >1 ora

Ingrediente

- 500 ml lapte integral
- 250 ml frișcă lichidă (30-36% grăsime)
- 120 g zahăr
- 4 gălbenușuri de ou
- 1 mână mare de frunze proaspete de mentă
- 1 linguriță extract de vanilie
- 100 g ciocolată neagră (tăiată bucăți mici)
- un praf de sare
- (opțional) puțin colorant verde

Mod de preparare

1. ***Infuzia de mentă***
   Încălzește laptele cu frunzele de mentă până aproape de fierbere.
   Oprește focul și lasă 10-15 minute pentru aromă, apoi strecoară.
2. ***Baza de înghețată***
   Bate gălbenușurile cu zahărul până devin deschise la culoare.
   Toarnă treptat laptele cald peste ele, amestecând continuu.
3. ***Gătirea cremei***
   Pune amestecul pe foc mic și amestecă până se îngroașă ușor (aprox. 82-84°C).
   Nu trebuie să fiarbă.
4. ***Adăugarea frișcii***
   Ia de pe foc, adaugă frișca, vanilia și sarea.
   Lasă compoziția să se răcească complet.
5. ***Congelarea***
   Pune compoziția la congelator. Amestecă la fiecare 30-40 min de 3-4 ori (sau folosește o mașină de înghețată).
6. ***Ciocolata***
   Când începe să se întărească, adaugă bucățile de ciocolată și amestecă.

Anexa 8. Proiect: „Ciocolată cu mentă”



Anexa 9. **Elevii Centrului de Excelență în Medicină și Farmacie „Raisa Pacalo” în vizită in laboratorul de cultură *in vitro*, LGFBP**



Anexa 10. **Participarea elevilor Centrului de Excelență în Medicină și Farmacie „Raisa Pacalo” la Salonul Internațional de Inventică și Antreprenoriat Inovativ, UPSC, ediția 4-a, 2026**



Anexa 11. Produsele elevilor prezentate la Salonul Internațional de Inventică și Antreprenoriat Inovativ, UPSC, ediția 4-a, 2026



Anexa 12. Premierea câștigătorilor în cadrul Salonului Internațional de Inventică și Antreprenoriat Inovativ, ediția a IV-a, UPSC, 2026



Mariana LOZINSCHII, Lilia BRÎNZĂ,
Eduard COROPCEANU

Ghid
BIOTEHNOLOGII INOVATIVE ÎN CERCETARE ȘI EDUCAȚIE

Culegere și paginare computerizată.
Bun de tipar 10.01.2026.
Formatul 70x100/16. Tipar offset.
Coli conv. de tipar 36.91. Coli de autor 29.99.

Tiparul executat la „Blitz Poligraf" SRL
mun. Chișinău, str. Florica Nița, nr. 7, ap. 69