I. Raportul Ştiinţific şi Tehnic 2020

- **Contract nr. 21 PTE/2020**

- Etapă nr. 1/2020

- Cod proiect: PN-III-P2-2.1-PTE-2019-0670

- Titlu proiect: Tehnologie și sistem cu imersie temporară în bioreactoare cu comandă digitală, destinate micropropagării plantelor

- **Rezumatul etapei**:

Obiectivul general al proiectului vizează dezvoltarea și experimentarea de la nivel TRL 4 la TRL 6 a unui prototip pentru un nou sistem de imersie temporară în bioreactoare cu unitate de decizie și control digitalizată (TIBS-D) destinat micropropagării plantelor, testarea și validarea prototipului în condiții reale de funcționare în laboratorul de micropropagare al SC Renard Olunden SRL și brevetarea acestuia pentru exploatarea comercială pe piața internă și internațională. Sistemul de imersie temporară în bioreactoare cu unitate de decizie și control digitalizată, propus de noi, este primul sistem automat, autonom, cu un program personalizabil pentru fiecare bioreactor din sistem. Pentru realizarea acestui obiectiv, in etapa I s-a realizat documentarea pentru analiza și definirea caracteristicilor tehnice ale tehnologiilor de micropropagare în sisteme cu imersie temporară în bioreactoare (TIBS). Tot cu acest scop s-au realizat experimente comparative pentru micropropagarea afinului cu tufă înaltă în bioreactor și medii solide agarizate, precum si micropropagarea alunului (*Corylus avellana*) și steviei (*Stevia rebaudiana* în bioreactor. De asemenea, a fost proiectată unitatea de control și de decizie (UCD) și unitatea de bază (UB) a bioreactorului și au fost achizitionate componentele și utilajele necesare execuției sistemului.

- **Descrierea ştiinţifică şi tehnică, cu punerea în evidenţă a rezultatelor etapei și a gradului de realizare a obiectivelor – se vor indica rezultatele şi modul de diseminare a rezultatelor.**

I. Documentare conceptuală pentru analiza și definirea caracteristicilor tehnice ale tehnologiilor de micropropagare în sisteme cu imersie temporară în bioreactoare (TIBS)

În ultimele decenii au fost realizate mai multe sisteme de imersie temporară (TIS) pentru biotehnologia plantelor după cum urmează (Georgiev 2014):

1. **Sistemul Twin-Flask** (Biorreactores de Inmersión Temporal [BIT]) - este unul dintre primele TIS dezvoltate (Watt, M. P. 2012; Escalona et al. 1999; Lyam et al. 2012). Este format din două recipiente (baloane cu gură largă, sticle sau borcane), conectate între ele printr-o conductă U (sticlă sau plastic) sau un tub din silicon (Aragón et al. 2010; Yang et al. 2010). Unul dintre recipiente are funcția de vas de cultură, în timp ce al doilea este utilizat ca rezervor pentru mediul de cultră. Recipientul cu rol de vas de cultură poate fi cu suport de sprijin pentru explante (se pot folosi bile de sticlă, spumă poliuretanică, sită metalică

sau plastic) în partea inferioară. Fiecare container este conectat la propria linie de aer sub presiune, controlată de două timere independente, cuplate cu robinetele electromagnetice cu trei căi. Sistemele Twin-Flask au fost aplicate cu succes în propagarea plantelor și culturi de embrioni. Recent, sistemele Twin-Flask au fost utilizate în lucrările de cercetare privind acumularea de metaboliți secundari prin culturi in vitro diferențiate, de asemenea.

2. **Sistemele Ebb-and-Flow** ar putea fi descrise ca o modificare simplificată a sistemelor Twin-Flask. Avantajele sistemelor Ebb-and-Flow sunt construcția simplă și fiabilă, automatizarea simplificată și aportul redus de energie. Distribuția neuniformă a luminii în interiorul vasului de cultivare și lipsa opțiunilor de ventilație forțată și îmbogățirea CO2 sunt printre principalele dezavantaje ale sistemului.
3. **Sistem RITA** - (CIRAD, Franța, distribuit de VITROPIC, Franța) - a fost dezvoltat special pentru cultura plantelor in vitro și este format dintr-un singur vas de polipropilenă autoclavabilă (500 ml) cu două compartimente separate de o tavă instalată cu un suport de plasă și o țeavă de plastic, montată la centrul său. Compartimentul superior al vasului este camera de cultură, în timp ce compartimentul inferior este rezervorul pentru mediul de cultură.
4. **Thermo-photo-bioreactor** - a fost creat special pentru producerea de metaboliți secundari pentru *Deschampsia antarctica* din Antarctica (Navarro et al. 2011) și are o construcție complexă și costisitoare. Bioreactorul este format din două vase din sticlă Pyrex conectate prin îmbinări și țevi din oțel inoxidabil. Vasul superior este camera de cultură. Este echipat cu o sursă integrată de lumină UV, montată pe capacul superior. Materialul vegetal este susținut de un sport din oțel inoxidabil instalat în interiorul camerei de cultură. Vasul inferior este rezervorul de depozitare a mediului nutritiv. Este proiectat cu două porturi externe - unul pentru alimentarea cu aer și unul în partea de jos utilizat pentru încărcarea mediului. Principalele avantaje ale TIS termo-foto-bioreactorului sunt opțiunile pentru controlul precis al temperaturii și iradierii UV, ceea ce este foarte important pentru cultivarea plantelor extremofile. Cu toate acestea, construcția complexă și scumpă este principalul argument împotriva acestui design.
5. **Ebb-and-flow hibrid** - cu flux convectiv tubular saturat a fost dezvoltat exclusiv pentru cultivarea culturilor de rădăcini păroase cu o mare densitate (Cuello et al. 2008). Acest sistem este un bioreactor hibrid, care acționează ca o coloană cu bule pentru primele zile după inoculare și apoi trece la funcționare ca un sistem Twin-Flask. Operația inițială sub formă de coloană cu bule este necesară pentru a asigura distribuția și imobilizarea uniformă a rădăcinilor păroase transformate. Odată ce rădăcinile sunt atașate de suportul plaselor de imobilizare internă, reactorul începe să funcționeze ca un TIS Twin-Flask. Principalele dezavantaje sunt proiectarea complicată, operarea complexă, utilizarea limitată numai la culturile de rădăcini și recoltarea dificilă a biomasei rădăcinilor.
6. **Bioreactorul cu imersie de bule** (BIB) utilizează imersia temporară a explantelor propagate în spumă în loc de lichid. Sistemul este format dintr-un singur cilindru de sticlă, împărțit transversal în două compartimente printr-o placă micro poroasă. Compartimentul superior este camera de creștere, în care câteva rafturi interne din oțel inoxidabil sunt stivuite unul peste altul pentru a susține explantele. Mediul nutritiv lichid cu adaos de detergent (Tween 20) este în partea de jos a camerei de cultură. Camera inferioară este pentru distribuirea uniformă a aerului de către placa poroasă. BIB este disponibil comercial în Brazilia la scara 1,5 L (Tecnal Equipamentos para Laboratório, Brazilia). Cercetări recente au arătat că BIB asigură o creștere mai bună și un număr mai mare de lăstari/ explant decât RITA TIS în propagarea Arborelui de ceai (Melaleuca alternifolia) și Orhidee (Oncidium leucochilum). Cu toate acestea, prezența detergentului în mediul nutritiv, precum și timpul prelungit pentru drenarea lichidului pot restricționa aplicarea BIB pentru propagarea unor specii de plante sensibile.
7. **Sistemele balansoare** - folosesc o platformă mecanică pentru a înclina vasele de cultură într-un unghi dat, astfel încât mediul poate fi distribuit de la un capăt al cutiei de cultură la celălalt și invers (Adelberg, et al. 2004; Kämäräinen-Karppinen et al. 2010; Uchendu, et al. 2011). Vasele de cultură sunt confecționate din policarbonat transparent autoclavabil și au formă dreptunghiulară cu o deschidere laterală cu gură largă, închise de un capac cu șurub larg, cu membrană de filtru în interior. După inoculare, cutiile sunt plasate pe rafturile înclinate mecanic. Înclinările rafturilor creează valuri mici și cufundă alternativ și aerează inoculii. Principalul avantaj al sistemului cu balansare este că un număr mare de vase de cultură ar putea fi amplasate pe un suport și nu este necesară conexiunea suplimentară la o sursă de aer. Dezavantajele sistemelor

balansoare sunt legate de necesitatea unei platforme de înclinare cu acționare electromecanică, ceea ce crește costurile de investiții și energie. Platformele înclinate necesită mai mult spațiu pentru a funcționa corect și acest lucru se poate reflecta asupra costului de producție pe unitatea de spațiu din camera de creștere.

8. **Sistem cu tambur rotativ** - este format dintr-un aparat cu role și o sticlă de plastic sau sticlă autoclavabilă care se află pe el (Akita et al. 1998). Când aparatul cu role se rotește cu viteză mică, plantele imobilizate sunt cufundate periodic și expuse mediului aerian.

În încercarea de a reduce costurile investiției inițiale pentru echipamente și de a economisi spațiu și forță de muncă**,** în ultimii ani au fost dezvoltate și distribuite pe piață mai multe TIS, cum ar fi:

- Bioreactorul RALM (Biorreatores RALM, Ralm Industria e Comércio ltda., Brazilia) este un TIS, care funcționează pe principiul Twin-Flask.
- Sistemul SETIS (Vervit, Belgia, distribuit de Duchefa Biochemie, Olanda) care funcționează într-un mod similar cu sistemul TIS Ebb-and-Flow.
- PLANTIMA (A-Tech Bioscientific Co., Ltd., Taiwan) care este un TIS cu volum mic, operat pe principiul RITA și a fost utilizat pentru propagarea plantelor (Yan et al. 2010, Yan et al 2013).
- PLANTFORM (Plant Form AB, Suedia & TC propagation Ltd., Irlanda) este un alt TIS, care utilizează principiul de funcționare al sistemului RITA.
- BOX-IN-BAG este un TIS de unică folosință, care funcționează pe principiul TIS Ebb-and-Flow.
- Bioreactorul WAVE este o platformă cu balansare mecanică care folosește pungi de cultivare pre-sterilizate de unică folosință (Eibl and Eibl, 2006, 2008, 2009).

Toate aceste tipuri de bioreactoare au la bază un sistem mecanic sau pneumaic, unitățile sunt legate între ele cu ajutorul unei tubulaturi conectate la pompe iar timpul de imersie este reglat cu ajutorul unor timere sofisticate, motiv pentru care sunt destul de greu de reglat si manevrat. În plus, unitățile componente ale sitemului (bioreactoarele) nu pot fi personalizate, setarea parametrilor făcîndu-se de la un singur timer pentru tot sistemul. Un alt dezavantaj al acestora este că pompele nu reușesc să acționeze corespunzător asupra mediului de cultură din bioreactoarele aflate a capătul sistemului, culturile din aceste vase fiind de multe ori compromise dacă nu se folosesc pompe de mare putere, adecvate numărului de bioreactoare din sistem. La toate bioreactoarele existente pe piață mediul lichid, acționat de pompe, scaldă explantele fiind impins de jos în sus, apoi prin forța gravitaționala coboară din nou sub explante. În timpul acestui proces explantele sunt deplasate din locul in care au fost inoculate astfel că distribuția lor în interiorul vasului de cultură devine neuniformă.

În cadrul acestei etape a fost testat Bioreactorul Plantform pentru cultura in vitro la afinul cu tufa inalta (*Vaccinium corymbosum*), alun (*Corylus avellana*) și stevia (*Stevia rebaudiana)*.

A. Cultura in vitro a afinului cu tufă înaltă în bioreactoare

Pentru inființarea acestui experiment s-au folosit două soiuri de afin: „Duke" și „Hortblue Petite" (Fig. 1). Minibutașii cu lungimi de 1,5 până la 2 cm folosiți pentru inoculare au provenit din culturi in vitro de 10 săptămâni de pe un mediu de cultură agarizat, cu următoarea compoziție: săruri McCown's Woody Plant (WPM) (Lloyd și McCown, 1980), 100 mg / l Sequestrene 138 (FeNaEDDHA 6%), 100 mg / l mio-inozitol, 2 mg / l vitamina B1, 1 mg / l vitamina B6, 1 mg / l acid nicotinic, 1 mg/l zeatină, 3% (g / v) zahăr, pH = 5 și 4 mg/l Plantagar.

Pentru a determina eficiența bioreactorului asupra micropropagării afinului cu tufă înaltă au fost aplicate 3 tratamente, toate având ca mediu bazal mediul WPM descris mai sus, respectiv:

V1- WPM+5 mg/l 2 iP (2- isopentiladenina),

V2- WPM+0.5 mg/l Z (zeatina)

V3 - WPM+1 mg/l Z

Figura 1. Cultura comparativă a afinului cu tufă înaltă în bioreactoare și medii solidificate cu agar.

Aceste varriante de mediu de cultură au fost utilizate ca medii lichide în bioreactoare și ca medii solide în borcane.

Înființarea culturilor in vitro in bioreactoare:

- S-a utilizat bioreactorul Plantform care un sistem de pompare pneumatic controlat de un temporizator automat pentru a regla aerarea și alimentarea cu mediu de cultură. Bioreactorul Plantform este fabricat din policarbonat transparent cu dimensiunile de 180 × 160 × 150 mm. (Welander și colab., 2014; www.plantform.se.)

- În fiecare bioreactor s-au introdus 500 ml mediu de cultură și s-au inoculat 20 minibutași/bioreactor. Lungimea minibutașilor inoculați a fost de 1,5-2 cm.

-Timpul de imersie a fost de 1 minut la patru ore, iar aerarea a fost o dată / oră, timp de 4 minute.

Înființarea culturilor in vitro in medii agarizate:

- S-au utilizat borcane de 720 ml, de 9 cm diametru și 13,5 cm înălțime, prevazute cu capac cu filtru de aerisire.

- În fiecare borcan s-au introdus 100 ml mediu de cultură și s-au inoculat 10 minibutași. Lungimea minibutașilor inoculați a fost de 1,5-2 cm.

În toate cazurile pH-ul mediului a fost ajustat la 5,0 înainte de autoclavare. Autoclavarea mediilor de cultură s-a facut la 0,11 MPa și 121 ° C timp de 20 de minute iar componentele au fost adăugate înainte de autoclavare. Toate componentele au fost achiziționate de la Duchefa Biochemie B.V, Olanda.

Atît culturile in vitro din bioreactoare cît și cele de pe mediile solide au fost menținute în camera de creștere la o fotoperioadă de 16 ore lumina/8 ore întuneric cu o intensitate luminoasă de 32.4 µmol $m^{-2}s^{-1}$

(Philips CorePro LED tube 1200 mm 16W865 CG, 1600lm Cool Daylight), o temperatură de 23 ± 3 ° C și 50 ± 2% umiditate conform protocolul descris de Clapa și colab., 2018. Durata culturilor in vitro a fost de 90 de zile.

Soiul de afin „Hortblue Petite" s-a comportat mai bine în bioreactoare decît soiul „Duke", în special în ceea ce privește rata de proliferare. De asemenea, soiul „Hortblue Petite" a avut rata de proliferare precum și ceilați parametri studiați semnificativ statistic mai mari față de mediile agarizate. La soiul : „Duke" nu au existat diferențe semnificativ statistic ale parametrilor studiați față de variantele agarizate (Fig. 2, 3, 4).

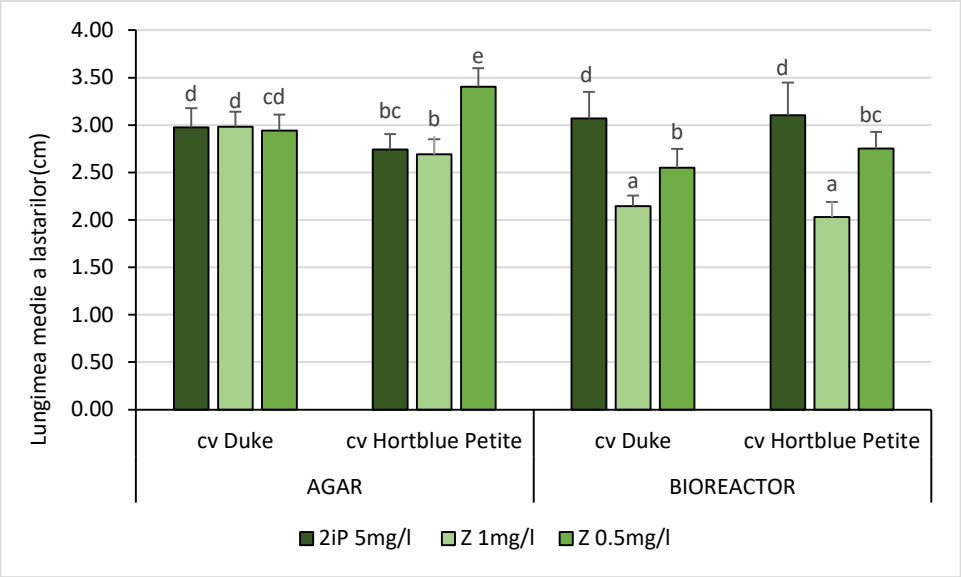


Figura 2. Lungimea medie a lăstarilor de afin obținuți prin cultura in vitro în bioreactorul PLantform si medii solidificate cu Plantagar

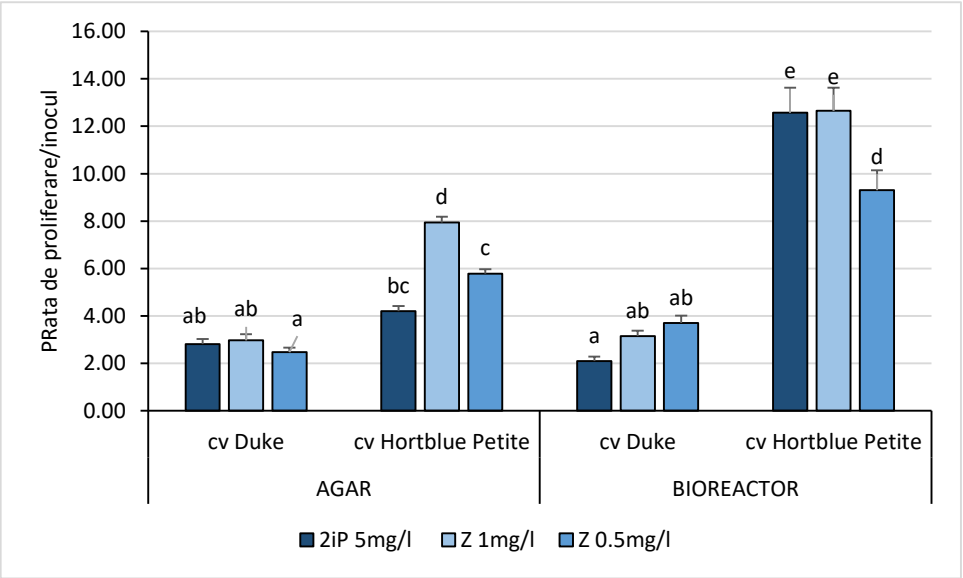


Figura 3. Rata de proliferare/inocul la cultura in vitro a afinului în bioreactorul PLantform si medii solidificate cu Plantagar

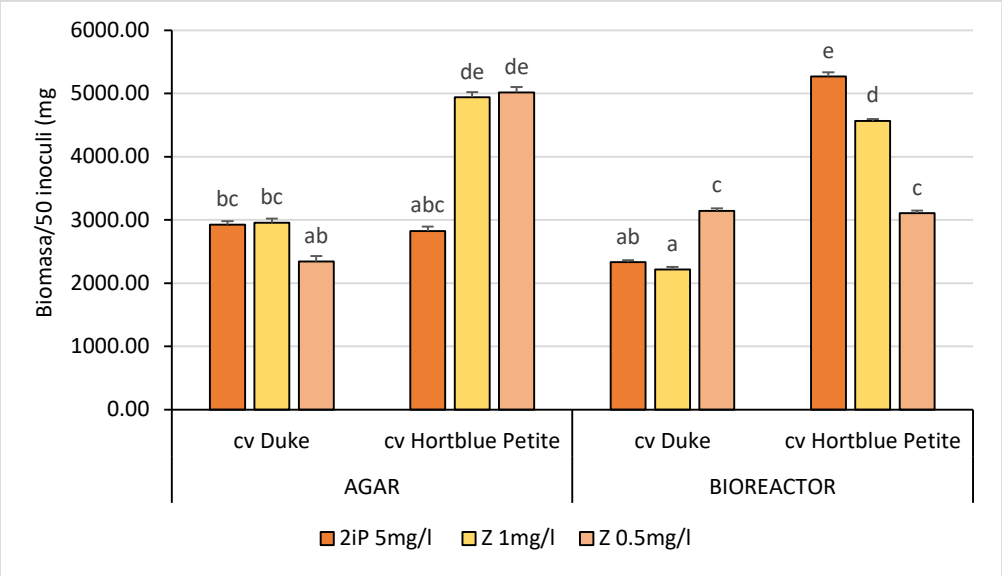


Figura 4. Biomasa/50 inoculi la cultura in vitro a afinului în bioreactorul PLantform si pe medii solidificate cu Plantagar

B. Cultura in vitro a alunului (*Corylus avellana* L) în bioreactoare

În acest experiment s-a testat modul în care se comporta la cultura in vitro in bioreactoare soiul de alun : „Barcelona" (Fig. 5). Minibutașii cu 1-2 noduri folosiți pentru inoculare au provenit din culturi in vitro de 10 săptămâni de pe un mediu de cultură agarizat, cu următoarea compoziție: săruri McCown's Woody Plant (WPM) (Lloyd și McCown, 1980), 100 mg / l Sequestrene 138 (FeNaEDDHA 6%), 100 mg / l mio-inozitol, 2 mg / l vitamina B1, 1 mg / l vitamina B6, 1 mg / l acid nicotinic, 1 mg/l zeatină, 3% (g / v) zahăr, pH = 5,8 și 4 mg/l Plantagar.

Pentru a determina eficiența bioreactorului asupra micropropagării afinului cu tufă înaltă au fost aplicate 3 tratamente, toate având ca mediu bazal mediul WPM descris mai sus, respectiv:

V1- WPM+1 mg/l Z – 300ml mediu/bioreactor

V2- WPM+1 mg/l Z – 400ml mediu/bioreactor

V3 - WPM+1 mg/l Z – 500ml mediu/bioreactor

Înființarea culturilor in vitro in bioreactoare:

- la fel ca în cazul afinului s-a utilizat bioreactorul Plantform.

- Cantitatea de mediu din bioreactoare a fost 300, 400 și 500 ml mediu de cultură și s-au inoculat 30 minibutași/bioreactor.

-Timpul de imersie a fost de 1 minut la patru ore, iar aerarea a fost o dată / oră, timp de 4 minute.

Autoclavarea mediilor de cultură s-a facut la 0,11 MPa și 121 ° C timp de 20 de minute iar componentele au fost adăugate înainte de autoclavare. Toate componentele au fost achiziționate de la Duchefa Biochemie B.V, Olanda.

Culturile au fost menținute în camera de creștere la o fotoperioadă de 16 ore lumina/8 ore întuneric cu o intensitate luminoasă de 32.4 µmol $m^{-2}s^{-1}$ (Philips CorePro LED tube 1200 mm 16W865 CG, 1600lm Cool Daylight), o temperatură de 23 ± 3 ° C și 50 ± 2% umiditate. Durata culturilor in vitro a fost de 90 de zile.

Rezultatele obținute au arătat că soiul de alun „Barcelona" a avut cea mai mare rată de proliferare (1,22 ± 0,12) în bioreactorul cu 400 ml mediu de cultură, iar cei mai lungi lăstari (3,38 ± 0,39 cm) s-au obținut în bioreactorul care conține 500 ml mediu (Fig. 6). Rata scăzută de proliferare se pare că s-a datorat necrozării inoculilor și faptului că cea mai mare parte a lăstarilor inoculați au generat un singur lăstar cu lungimea cuprinsă între 1,5 și 11,5 cm. Aceste date sunt similare cu alte rezultate obținute la micropropagarea alunului atît în

bioreactoare cat și în medii solide, alunul fiind o specie destul de recalcitrantă la înmulțirea in vitro astfel că necesită în continuare studii pentru a găsi mediile de cultură adecvate care să ducă la obținerea unei rate de proliferare cît mai ridicate.

Interesant a fost faptul că protocoalele utilizate în acest experiment au facilitat înrădăcinarea lăstarilor regenerați, cu procente de înrădăcinare cuprinse între 52,65% și 78,68%. Prin urmare, cel mai mare procent de înrădăcinare (78,68%) la alun a fost înregistrat în bioreactorul cu 400 ml mediu de cultură (Fig. 7).

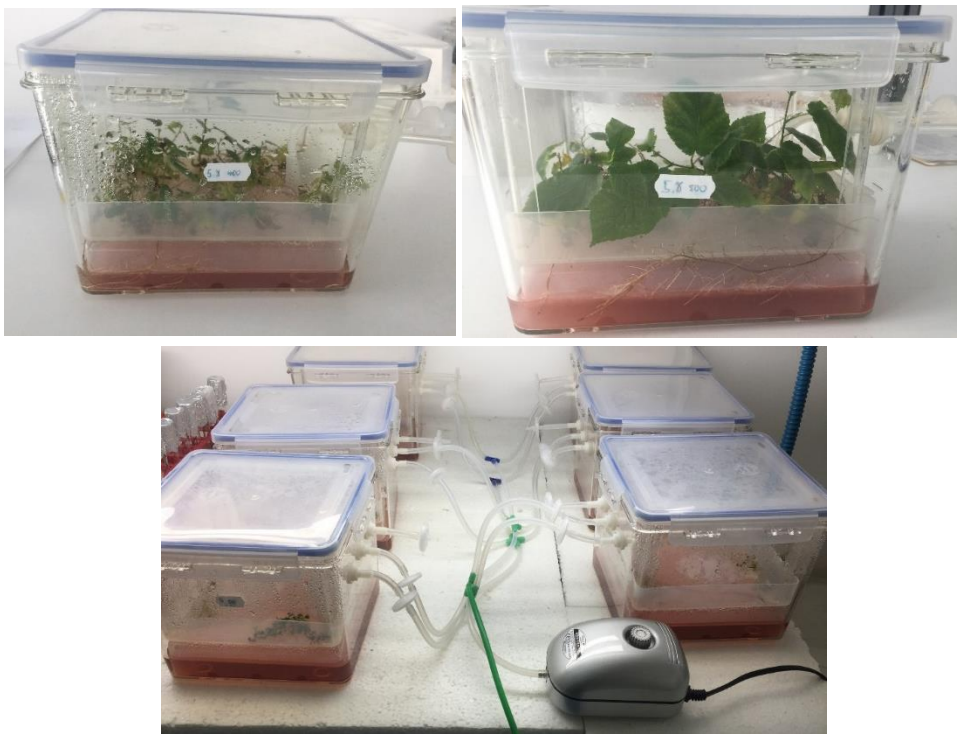


Figura 5. Alun in vitro in bioreactorul Plantform

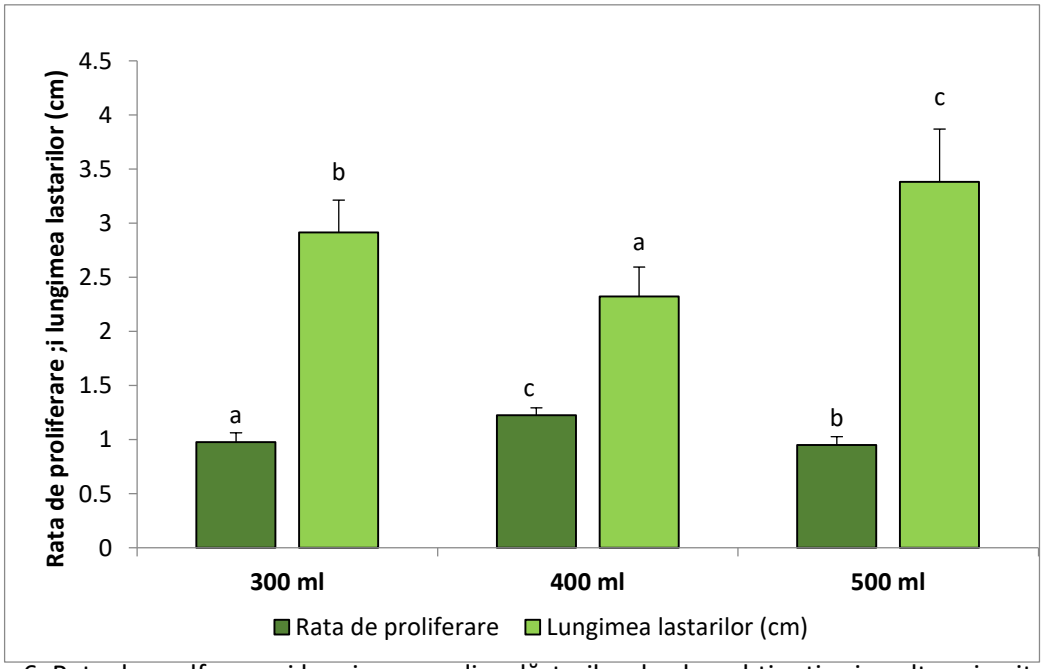


Figura 6. Rata de prolferare și lungimea medie a lăstarilor de alun obținuți prin cultura in vitro în bioreactorul PLantform cu 300, 400 și 500 ml mediu de cultură/bioreactor

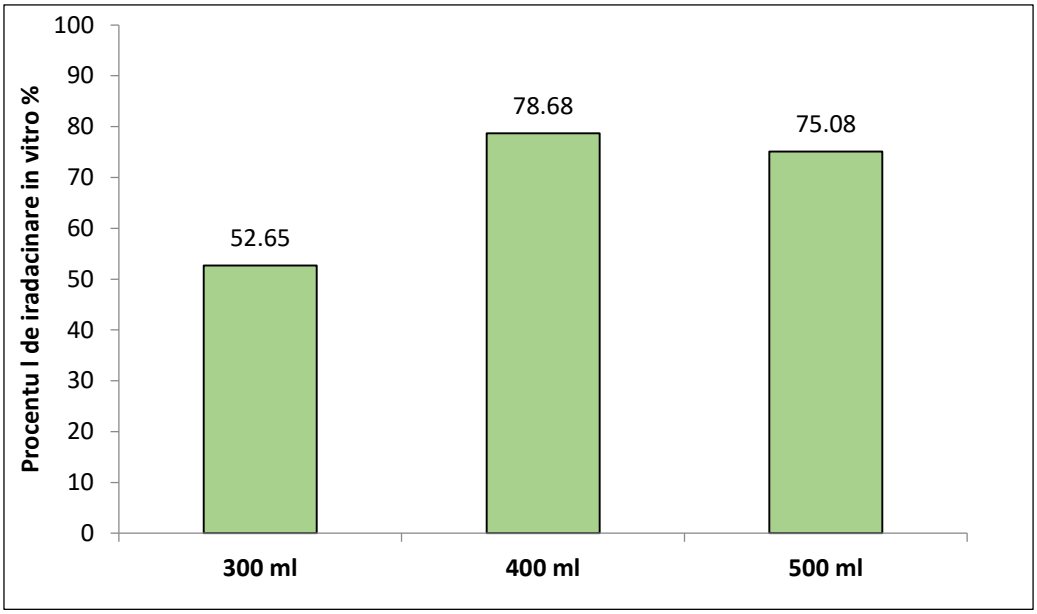


Figura 7. Rata de prolferare și lungimea medie a lăstarilor de alun obținuți prin cultura in vitro în bioreactorul PLantform cu 300, 400 și 500 ml mediu de cultură/bioreactor

C. Cultura in vitro) în bioreactoare la *Stevia rebaudiana*

Pentru a testa eficiența multiplicării in vitro in bioreactoare la *Stevia rebaudiana* (Fig. 8) s-au utilizat patru variante de medii de cultură toate avand ca mediu bazal mediul Murashige and Skoog, 1962 (MS) avand în compozitie micro și macroelemente în concentrație întreagă, Myo-inositol 100 mg/l, Thiamine 1mg/l, Pyridoxine 0,5 mg/l, Acid nicotinic 0,5 mg/l și 30 g l/zahar și diferite concentratii de benziladenina (BA). Minibutașii cu 1-2 noduri folosiți pentru inoculare au provenit din culturi in vitro de 4 săptămâni de pe același mediu de cultură MS dar gelificat cu 4 g/l Plant agar și fără regulatori de creștere. pH-ul mediilor a fost ajustat la 5,8 înainte de autoclavare.

Astfel, cele patru tratamente au fost:

V1- MS – fără regulatori de creșetere

V2- MS+0,1 mg/l BA

V3 - MS+0,2 mg/l BA

V4 - MS+0,3 mg/l BA

Înființarea culturilor in vitro in bioreactoare:

- s-a utilizat bioreactorul Plantform
- cantitatea de mediu din bioreactoare a fost de 500 ml mediu de cultură și s-au inoculat 25 minibutași/bioreactor.
- Timpul de imersie a fost de 1 minut la patru ore, iar aerarea a fost o dată / oră, timp de 4 minute.

Autoclavarea mediilor de cultură s-a facut la 0,11 MPa și 121 ° C timp de 20 de minute iar componentele au fost adăugate înainte de autoclavare. Toate componentele au fost achiziționate de la Duchefa Biochemie B.V, Olanda.

Culturile au fost menținute în camera de creștere la o fotoperioadă de 16 ore lumina/8 ore întuneric cu o intensitate luminoasă de 32.4 µmol $m^{-2}s^{-1}$ (Philips CorePro LED tube 1200 mm 16W865 CG, 1600lm Cool Daylight), o temperatură de 23 ± 3 ° C și 50 ± 2% umiditate conform protocolul descris de Clapa și colab., 2018. Durata culturilor in vitro a fost de 30 de zile.

Rezultatele obținute au arătat că la cultura steviei in bioreactoare cei mai lungi lăstari s-au obținut în bioreactorul în care mediul de cultură a fost suplimentat cu 0,2 mg/l BA și au avut o lungime medie de 12,48 ± 0,60 cm (Fig. 9). Tot în bioreactoarele în care mediul de cultură a fost suplimentat cu 0,2 mg/l BA s-a obținut și cea mai mare cantitate de biomasă, respectiv o medie 1543 ± 124 mg verde și 143 ± 6,2 mg biomasp uscată/15 inoculi (Fig. 10).

Figura 8. Stevia rebaudiana cultivate in vitro in mediu geli

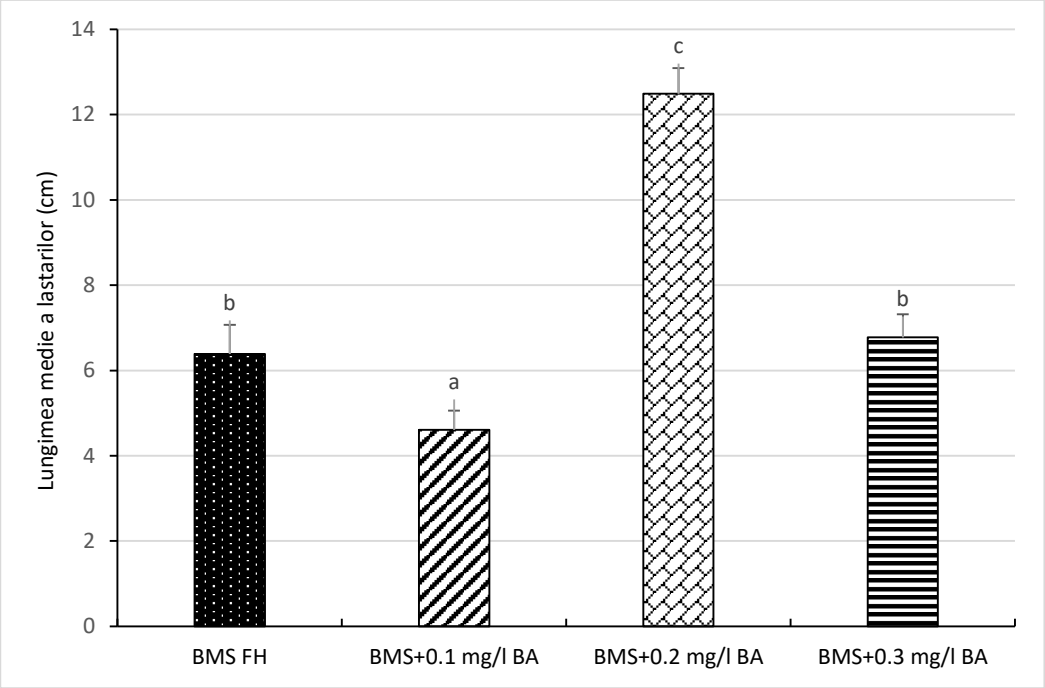


Figura 9. Lungimea medie a lastarilor de *Stevia rebaudiana* obținuți în cultura in vitro în bioreactoare pe mediul de cultura MS fără regulatori de creștere și suplimentat cu 0,1; 0,2 și 0,3 mg/l BA

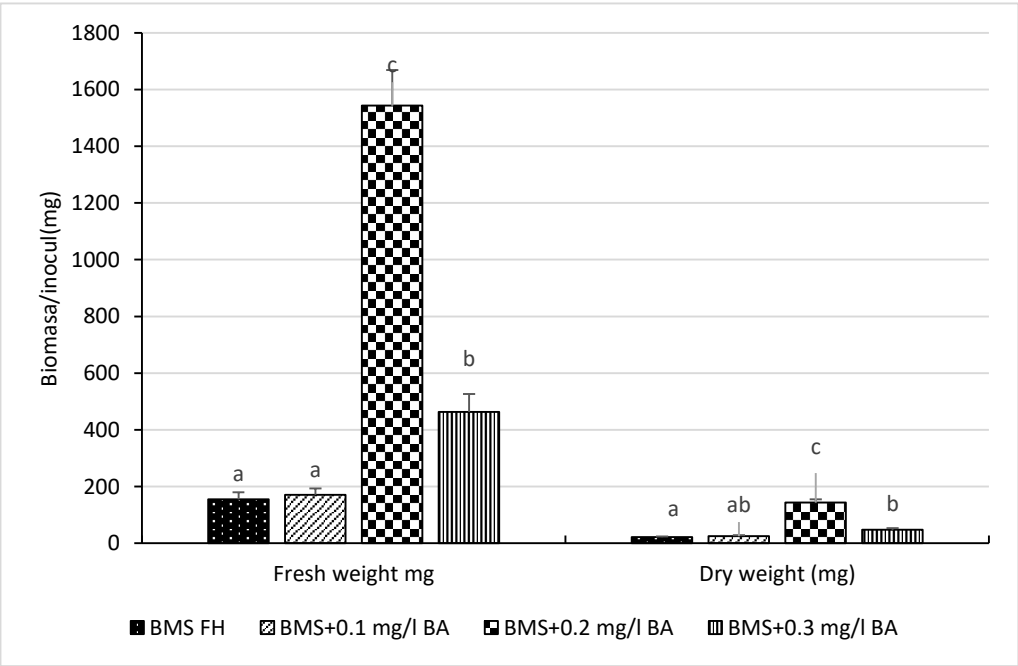


Figura 10. Cantitatea de biomasă verde și uscată de *Stevia rebaudiana* cultura in vitro în bioreactoare pe mediul de cultura MS fără regulatori de creștere și suplimentat cu 0,1; 0,2 și 0,3 mg/l BA

II. Proiectarea unității de control și de decizie (UCD) și a unității de bază (UB) a bioreactorului, optimizarea parametrilor de funcțíonare în vederea asamblării

Etapa de proiectare a bioreactorului s-a realizat în două faze:

1. *proiectarea unității de bază a bioreactorului*
2. *proiectarea unității de control și decizie*

În acest sens, s-a realizat schema de ansamblu a bioreactorului (figura 1), unde s-a avut în vedere coroborarea informațiilor din literatura de specialitate legate de procesele și mecanismele de micropropagare cu necesitățile și posibilitățile tehnice actuale. Astfel, s-a decis proiectarea a două compartimente separate: unitatea de bază sau compartimentul steril (UB) și compartimentul nesteril sau unitatea de control și de decizie (UCD).

III. Diseminarea rezultatelor prin publicarea națională și internațională de articole stiinfice

1.Lucrari publicate:

În reviste ISI cu factor de impact:

1. Clapa, D., Borsai, O., Hârța, M., Bonta, V., Szabo, K., Coman, V., & Bobiș, O., 2020, Micropropagation, Genetic Fidelity and Phenolic Compound Production of Rheum rhabarbarum L. *Plants*, *9*(5), 656.
   Accession Number: WOS:000542286900039, FI=2.762 Q1

2. Hârţa, M., Pamfil, D., Borsai, O., Rodica, Pop., Clapa, D., Diaconeasa, Z., Sisea, C. R. (2020). Molecular and phytochemical characterization of F1 Streptocarpus hybrids and antioxidant potential of their flower extracts. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, *48*(3).
   Accession Number: WOS:000579744100019, IF= 1.168 Q3

2.În reviste indexate ISI:

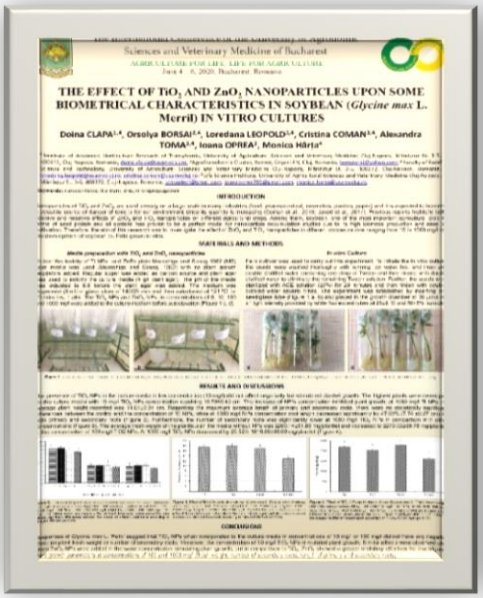
1. Orsolya BORSAI, Doina CLAPA, Andrei MAGDEA, Monica Hârța, Andreea ANDRECAN, Viorel MITRE, 2020, effects of different culture media and plant growth regulators on micropropagation of 'Gisela 5' cherry rootstock, Scientific Papers. Series B. Horticulture Vol. XXIV, No. 1: 33-40

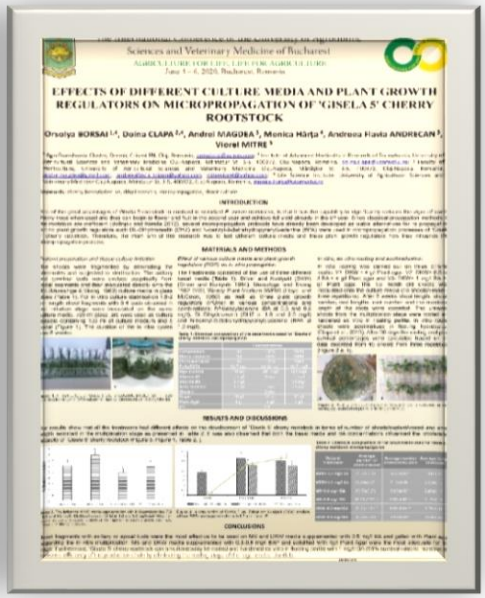
3. În reviste indexate BDI:

1. Doina Clapa, Orsolya Borsai, Loredana Leopold, Cristina Coman, Alexandra Toma, Ioana Oprea, Monica Hârța, 2020, The effect of Tio2 and ZnO2 nanoparticles upon some biometrical characteristics in soybean (*Glycine max* L. Merril) *in vitro* cultures, Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies, Vol. XXIV, No. 1:32-37.

4.Participări la conferințe on line:

1. *International Conference "Agriculture for Life, Life for Agriculture"*, organizată de Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară din Bucuresti 4-6 iunie 2020.
   Au fost prezentate doua postere:

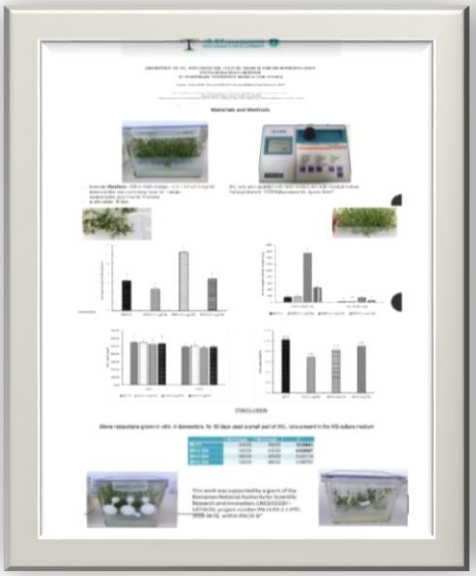


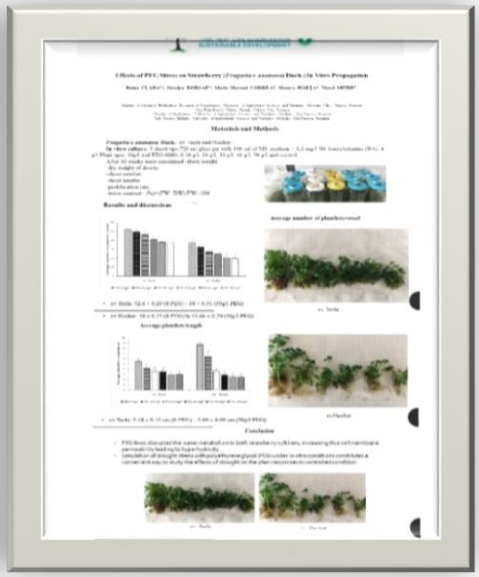


2. *19th International Conference "Life Sciences for Sustainable Development"* organizată de Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară din Cluj-Napoca, 24-25 septembrie 2020.

Au fost prezentate două postere:

- Effects of PEG Stress on Strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) In Vitro Propagation. Autori: Doina CLAPA, Orsolya BORSAI, Maria-Maruni CODREA, Monica HÂRȚA, Viorel MITRE
- Absorption of NO_3^- ions from the culture medium for micropropagation *Stevia Rebaudiana* Bertoni in temporary immersion bioreactor system, Autori: Cornel Viorel POP, Răzvan ȘTEFAN, Orsolya BORSAI and Doina CLAPA





- **Concluzii:**

Obiectivele propuse în etapa 1 2020 au fost realizate după cum sunt descrise în prezentul raport și anume:

- S-a realizat o documentare privind bioreactoarele existente pentru analiza și definirea caracteristicilor tehnice ale tehnologiilor de micropropagare în sisteme cu imersie temporară în bioreactoare (TIBS)
- S-au achiziționat toate componentele necesare atît pentru proiectarea unității de control și de decizie (UCD) cît și a unității de bază (UB) a bioreactorului.
- S-a realizat proiectarea sistemului de imersie temporară în bioreactoare cu unitate de decizie și control digitalizată pentru micropropagare, optimizarea parametrilor de funcționare și s-au elaborarat diferite documentații necesare pentru realizarea prototipului și validarea lui în decursul etapei 2.
- Diseminarea rezultatelor s-a realizat prin participarea la două simpozioane cu patru postere (*19th International Conference "Life Sciences for Sustainable Development"* organizată de Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară din Cluj-Napoca, 24-25 septembrie 2020; *International Conference "Agriculture for Life, Life for Agriculture"*, organizată de Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară din Bucuresti 4-6 iunie 2020) și prin publicarea a patru articole științifice cu acknowledgment-ul proiectului (Panificat: 2 articole ISI și 1 articol BDI; Realizat: 3 articole ISI și 1 articol BDI).