

IN VITRO REGENERATION SYSTEMS TO MEDICINAL PLANTS

Diana Ioana ALEXAN

West University of Timisoara, Faculty of Chemistry, Biology, Geography, Department of Biology-Chemistry, Pestalozzi 16, Timișoara

*Corresponding author e-mail: diana.alexan98@e-uvt.ro

Received 20 June 2018; accepted 20 July 2018

ABSTRACT

It is believed that in vitro regeneration of the medicinal plants would be an effective and future-proof solution over a short period of time for large-scale pharmaceutical use. In vitro regeneration systems of medicinal plants that have been proven to be highly reproducible and effective using a working protocol are those using root crops and those using tuber cultures. Micropropagation, regeneration using root explants and somatic embryogenesis are the in vitro processes described in studies that have allowed large-scale regeneration of curative plants. The methods have been optimized by improving all the factors that influence cloning: culture medium, phytohormones and pH, all in order to achieve the highest survival rate of the new plants.

KEY WORDS *in vitro* regeneration, micropropagation, somatic embryogenesis, cytokinin, medicinal plants.

Există foarte puține plante care nu au valoare medicinală. De asemenea, există o cerere tot mai sporită a obținerii plantelor identificate ca fiind benefice în farmacologie, homeopatie, medicină, fapt ce a dezvoltat o mare nevoie pentru efectuarea studiilor prin care să se identifice cele mai eficiente metode de clonare a plantelor din țesuturile deja existente. Atâta timp cât cererea și nevoia de plante cu proprietăți farmaceutice s-au mărit, este nevoie de metode optime de obținere a unor cantități cât mai mari prin intermediul proceselor standardizate de clonare. Astfel, biotehnologia a devenit principalul domeniu în vederea clonării diferitelor plante medicinale din țesuturi, precum și a păstrării acestora în banca de țesuturi și gene, pentru conservare (Chaturvedi et al. 2007; Grudnicki & Ianovici, 2014). Pentru ca procesele de clonare să se desfășoare cât mai eficient, plantele medicinale au nevoie de condiții de mediu uniforme și de un substrat de creștere cu caractere genetice identice cu cele ale clonelor de mare randament.

O astfel de clonare, care ține cont de condițiile de mediu este micropropagarea, o metodă desfășurată *in vitro*. Metoda *in vitro* a asigurat un număr mare de plante medicinale obținute din diferite părți vegetale, dar o evaluare mai amănunțită a demonstrat că doar o parte s-a regenerat total și o

mai mică parte a realizat cu succes transferul pe substrat (Chaturvedi et al. 2007).

Începuturile micropropagării au fost bazate pe descoperirea chinetinei (Miller et al. 1955), un hormon vegetal care sporește diviziunea celulară. Astfel, procesele *in vitro* au fost axate pe regenerarea de țesut la *Nicotiana tabacum* L. (tutun), atingând un nivel ridicat prin descoperirea capacității de a controla procesul de diferențiere la tulpini și rădăcini, capacitate bazată pe raportul chinetină-auxină (Skoog & Miller 1957). Au urmat studii privind cultivarea de *Daucus carota* L. (morcov), precum și descoperirea totipotenței celulare, care a dus la regenerarea unor indivizi complet formați din celulele floemului în timpul înfloririi (Steward et al. 1964). În ceea ce privește regenerarea plantelor medicinale, micropropagarea acestora a rămas neglijată până în momentul reușitei formării unei plante întregi de *Rauvolfia serpentina* (L.), obținută din calus somatic. Aceasta a fost crescută și menținută în condiții *ex vitro*, înflorind și fructificând normal.

În prezent, se cunosc numeroase studii privind diferențierea organogenetică a calusului somatic aparținând plantelor medicinale. Studiile privind cultivarea plantelor medicinale importante la scară largă sunt puține, necunoscându-se prea multe situații de obținere și multiplicare de plante întregi în cantități mari prin metoda *in vitro* (Chaturvedi et al. 2007).

1. Sistemul de regenerare in vitro care utilizează culturi de rădăcini

Un sistem de regenerare rapidă în condiții *in vitro* care s-a dovedit a fi extrem de eficient a fost desfășurat utilizând ca plantă medicinală *Albizia lebbbeck*. Această metodă utilizează, pentru obținerea de tulpini, culturi de rădăcini excizate de la răsaduri care au fost ținute în condiții aseptice, pe o perioadă de 15 zile, într-un mediu special de cultură Murashige și Skoog (MS), suplimentat cu diferite concentrații de 6-benziladenină (BA), chinetină (Kn), 2-izopentilin adenină (2-iP), sau un amestec al acestora suplimentat cu acid acetic α -naftalenic. Ulterior s-au efectuat teste privind efectele mediului de cultură MS, a pH-ului și a tipului de subkultură asupra procesului de formare a tulpinilor și a evoluției acestora. Rata de supraviețuire a plantelor care au fost trecute în ghivece cu pământ în cadrul serelor în urma acestui proces a fost de 80%.

Obiectivul principal devine optimizarea procesului *in vitro*, realizarea unei metode eficiente cu ajutorul îmbunătățirii mediului de cultură, a hormonilor vegetali-citochinina și auxina, precum și a nivelului de pH din mediu, finalizând procesul prin oferirea stabilității plantelor regenerate.

Embriogeneza somatică este una dintre cele mai comune căi de regenerare a speciilor care aparțin familiei Fumariaceae (Kavathekar et al. 1977). Genul *Corydalis* beneficiază de potențial din punct de vedere morfologic și genetic (Ikuta et al. 1974). Astfel, bazele acestei metode au fost puse prin aplicarea ei la *C. yanhusuo* și tuberculilor derivați din calus. Embriogeneza somatică a fost indusă la această specie de plantă medicinală prin subcultivarea calusului primar timp de 2 săptămâni, pe un mediu Murashige și Skoog (MS), cu adăugare de N-benziladenină, chinetină sau zeatină, în condiții de lumină. Tuberculii acestei plante aparținând familiei Fumariaceae au utilizări pentru tratarea ulcerului duodenal și gastric, a aritmiei cardiace și a reumatismului (Sagare et al. 2000). Tuberculii conțin substanțe precum DL-tetrahidropalmitina, D-cordalina, alcaloizi cu o puternică activitate anti-trombică, analgezică, anti-inflamatorie, anti-hipertensivă și anti-alergenică (Huang 1993).

Fiind o specie predispusă unor boli (mucegaiul *downey*), este necesară deținerea de material lipsit de patogeni în vederea regenerării plantei (Gao et al. 1991). Astfel, pentru a nu fi afectate productivitatea, homogenitatea și calitatea tuberculilor, materialul cel mai potrivit în cazul acestei specii aparține seminței. Un dezavantaj întâlnit în cazul semințelor de *C. yanhusuo* este capacitatea scăzută de germinare, mai ales în primul an, când acest proces de germinare se desfășoară extrem de lent datorită imaturității tuberculilor. Astfel, semințelor le-a fost indusă germinația cu ajutorul tratamentelor stratificate la temperaturi scăzute și ridicate (Hu & Liang 1996).

Sistemul de regenerare in vitro care utilizează culturi de rădăcini excizate de la specia *Albizia lebeck* în vederea obținerii de noi tulpini este constituit din mai multe etape, ținându-se cont de mediul de cultură și de factorii care influențează procesul. Așadar, prima etapă o constituie germinarea semințelor și stabilirea tratamentului de sterilizare.

Metoda de lucru a constat în îndepărtarea semințelor din fructele mature de *Albizia lebeck* și spălate sub jetul de apă 30 de minute. A urmat trecerea lor timp de 15 minute printr-o soluție fungică Bavistin 1% (soluție dezinfectantă). Acestea au fost tratate 20 de minute cu soluție Teepol 5%. Semințele trec, mai apoi, prin procesul de sterilizare, realizat cu apă distilată sterilizată și o soluție de HgCl sub flux laminar timp de 15 minute. După sterilizare, semințele au fost trecute pe mediul de cultură Murashige și Skoog pentru a germina. Explantele obținute reprezintă segmente ale rădăcinilor din zona subapicală până la regiunea bazală. Segmentarea rădăcinilor s-a realizat pentru răsadurile în vârstă de 15 zile.

După ce au fost optimizate mediul și condițiile de cultură, s-a putut realiza inducerea și multiplicarea tulpinilor adventive.

Condițiile de cultură: mediu de cultură de tip MS, suplimentat cu 3% sucroză și 0,8% agar. Deoarece influențează procesul, pH-ul a fost ajustat cu ajutorul soluțiilor de NaOH sau HCl. După sterilizarea solului prin autoclavare, culturile au fost incubate la $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ și o fotoperioadă de 16/8 h (alternanță lumină-întuneric), la o umiditate relativă de 55-60%.

Pentru a stabili mediul optim și pH-ul favorabil producerii și multiplicării a cât mai multor tulpini s-au testat mai multe medii de cultură de bază: MS, $\frac{1}{2}$ MS, Woodz Plant (WPM), $\frac{1}{2}$ WPM, B5 și $\frac{1}{2}$ B5 (Gamborg et al. 1968). Valorile pH-ului diferă între 5.0, 5.4, 5.8, 6.2 și 6.6. Influențe au avut și regulatorii de creștere adăugați fiecărui mediu de bază încercat.

A urmat înrădăcinarea in vitro a tulpinilor și transferul plantulelor obținute pe substrat. De la nivelul rădăcinii explantelor s-au excizat tulpinile cu frunze deja bine dezvoltate, de pe care se spală agarul. Acestea s-au transferat pe jumătate din mediul MS suplimentat cu NAA sau cu acid indol 3-butiric, în recipiente din plastic steril. A urmat incubarea lor în condiții de lumină difuză și acoperirea acestora pentru păstrarea umidității optime. După 4 săptămâni s-au făcut observații referitoare la procentul înrădăcinărilor și la aspectul acestora, plantele fiind aclimatizate și transferate în sere, la condiții normale de luminozitate.

Datele obținute în urma repetării de 3 ori a fiecărui experiment (10 replicare) au fost interpretate statistic utilizând ANOVA (One Way Analysis of Variance). Rata de supraviețuire a fost de 80%, fără sesizarea vreunei diferențe față de aplicarea metodei de regenerare pe cale naturală.

În ceea ce privește sistemul de regenerare utilizând rădăcinile excizate ale *Albiziei lebbek*, datele finale au fost prelucrate statistic utilizând ANOVA și testul Duncan (Duncan 1955). După finalizarea regenerării s-au exprimat rezultate cu privire la:

- numărul rădăcinilor explantelor care au produs tulpinile,
- numărul mediu de tulpini regenerate,
- lungimea tulpinilor regenerate,
- procentul tulpinilor regenerate.

Cel mai mare procent obținut (74,6%) în regenerarea și multiplicarea rădăcinilor s-a produs în mediul de cultură MS care conținea $7,5 \mu\text{M}$ 6-benziladenină (BA). Se consideră că BA nu are o influență semnificativă deoarece procesul este influențat și de alți factori precum: genotipul, nivelul endogen al fitohormonilor, pH-ul, sau carbohidrații asimilați (Ovecka et al. 2000). O creștere a cantității de BA a determinat scăderea tuturor rezultatelor, dimensiuni și procente.

În urma unor studii, s-a remarcat o creștere a numărului de tulpini regenerare dintr-un singur explant în urma unei combinații eficiente a citochininelor și a auxinelor în mediul de cultură al plantelor. O astfel de combinație reușită s-a demonstrat a fi mediul MS suplimentat cu BA și NAA, în urma unui experiment realizat de Mamun et al. (2004)

Mediul de cultură a influențat rata de reușită a regenerării, deoarece au fost puse la dispoziție 3 medii de bază, atât în cantități inițiale totale, cât și înjumătățite, eficiența sporită realizându-se la nivelul cantităților înjumătățite. Mediul MS s-a dovedit a fi cel mai propice datorită conținutului ridicat de amoniu și nitrați, ioni de potasiu și vitamine.

pH-ul influențează, la rândul lui, obținerea de tulpini prin procesul *in vitro*. Oscilațiile pH-ului culturilor se datorează asimilării de amoniu (scade) și de nitrat (crește). Lipsa unui pH la valori favorabile duce la ionizarea acizilor și a bazelor, ceea ce duce la modificări majore asupra structurilor studiate (Sakano 1990). În urma supunerii explantelor la diferite valori ale pH-ului, cel care a asigurat cea mai bună performanță a fost cel de 5,8. Karim et al. (2007) a documentat faptul că o creștere sau scădere a acestei valori optime are un efect direct asupra elongației tulpinilor. De asemenea, pH-ul are rol în îmbunătățirea activității enzimelor dependente de el (Scholten & Pierik 1998). Agarul este și el sub influența pH-ului, solidificându-se la valori scăzute.

2. Sistemul de regenerare in vitro care utilizează culturi de tuberculi

Un studiu finalizat cu succes în urma regenerării prin micropropagare este cel de clonare rapidă al speciei de plantă medicinală *Dactyladenia floribunda* (Chaturvedi 1975). Acest procedeu a reușit formarea unei culturi de plante ramificate, pornind doar de la un meristem lateral, într-un interval de incubare de 60 de zile. Din fiecare ramificație se pot obține prin înrădăcinare, în urma tăierii acesteia, 40 de plantule. Plantulele se individualizează în urma aclimatizării ex vitro într-o soluție salină anorganică timp de 15 zile. Succesul procesului fiind de 100%, în urma micropropagării unei culturi inițiale, rezultă, într-un an, 2.560.000 de plante.

Metoda micropropagării reprezintă o metodă mult mai eficientă și rapidă decât cea naturală. Dintr-un singur mugure axilar de *Dactyladenia floribunda* se obțin 2.560.000 de explante în intervalul a 12 luni, în timp ce propagarea pe cale naturală, având ca proces segmentarea tuberculilor plantei poate asigura maximul de 10 plante dintr-una singură, după o creștere în teren de aproximativ 3 ani.

Multiplicarea anumitor plante medicinale folosind procedeul micropropagării a fost testată pe scară medie și largă. Plantele medicinale realizează procesul cu randament ridicat în cazul cantităților reduse de

material, dar prepararea lor necesită o cantitate foarte mare de material vegetal de prelucrat. De exemplu, în cazul speciei *Catharantus roseus* (L.), este nevoie de 2 tone de frunze pentru a asigura obținerea doar a unui gram de alcaloid extras pentru tratarea leucemiei, proces ce durează timp de 6 săptămâni (Wickens 2001).

Micropropagarea mai este folosită și în cazul speciilor vulnerabile sau periclitare. Planta medicinală *Dioscorea deltoidea* conține un procent ridicat de diosgenină, un fitosteroid din care se sintetizează cortizon. Micropropagarea, deși este o metodă rapidă, aici se desfășoară lent, ținând cont de faptul că regenerarea acestei plante în condiții naturale poate să ajungă la o perioadă de 10 ani (Martin & Gaskins 1968).

Cele mai importante plante medicinale clonate *in vitro* și crescute *ex vitro* sunt: *Allium sativum* L. (Ayabe & Sumi, 1998), *Aloe vera* L. (Cavallini et al 1991), *Atropa belladonna* L. (Zenker 1971, Chaturvedi et al 1982), *Carina papaya* (Agnihotri et al 2004), *Cassia fistula* L. (Bajaj et al 1988), *Chlorophytum borivillianum* Sant. et Fernand (Dave et al 2003), *Cinchona ledgeriana* Moens ex Trimen (Koblity et al 1983, Hunter 1988), *Digitalis lanata* Ehrh. (Erdei et al 1981), *D. deltoidea* Wall. ex Kunth (Mascarenhas et al 1976), *Hyocyanus niger* L. (Cheng & Raghwan 1985), *M. peperita* (Rech & Pires 1986), *Papaver somniferum* (L.) (Nessler 1982), *Rosmarinus officinalis* L. (Chaturvedi 1979), *Tylophora indica* (Burm. F.) Merrill (Sharma & Chandel 1992) etc.

Embriogeneza somatică-studiul are scopul de a prezenta metoda de producție utilizând calusul tuberculilor de *Corydalis yanhusuo*. Primul pas al acestui proces este inducerea embrionilor somatici. Tuberculii maturi de *C. yanhusuo* sunt curățați sub jet de apă, mai apoi dezinfectați cu ajutorul unei soluții de etanol 70% timp de 1 minut și a unei soluții de hipoclorit de Na 0,5%. Tuberculii sunt supuși unei vibrații de tip ultrasonic timp de 10 minute și sterilizați prin 5 clătiri cu apă distilată sterilă. Urmează secționarea tuberculilor în fragmente de dimensiuni 5x5x2 mm. Fragmentele s-au cultivat în tuburi de sticlă ce conțin mediul de cultură de bază MS (conține săruri anorganice și vitamine) (Murashige & Skoog 1962), 3% sucroză și 0,9% agar. Timp de 4 săptămâni, fragmentele au fost incubate la 25±1°C, în întuneric. După subcultivarea timp de 20 de zile a calusului primar, acesta a fost transferat pe un mediu de cultură MS asemănător cu primul, dar suplimentat cu chinetină sau zeatină. Recipientii utilizați au fost acoperiți cu 2 straturi de folie de Al și sigilați cu 3 straturi de parafină. PH-ul a fost ajustat la 5,7±0,1 cu soluții de NaOH sau HCl, urmând procesul de autoclavare în condiții specifice. Timp de

5 săptămâni, culturile au fost incubate sub o lumină fluorescent albă, cu o fotoperioadă de 16 h pe zi.

Următoarele etape, adică obținerea embrionilor somatici și dezvoltarea plantulelor au avut loc cu ajutorul ajustării pH-ului la $5,2 \pm 0,1$ și a trecerii embrionilor somatici cu cotiledoane pe mediu lichid MS în vase Erlenmeyer. Baloanele au fost trecute în agitator la 100 rotații/minut. Urmează incubarea lor timp de 2 săptămâni, în condițiile anterioare de incubare.

Au rezultat embrioni somatici cu tulpini și rădăcini foarte bine dezvoltate. Aceștia au fost trecuți individual prin tuburi de sticlă într-un nou mediu MS suplimentat cu 6% sucroză și 0,9% agar. După autoclavare s-au adăugat la mediul de cultură soluții de ancimidol, ABA și paclobutrazol. S-au obținut 5 embrioni în urma fiecărui tratament.

Evaluarea numărului de tulpini și rădăcini produse de plantulele dezvoltate din embrioni s-a realizat după o lună. Au fost realizate și observații asupra lungimii medii și a diametrului tuberculilor și embrionilor somatici.

Procesul de embriogeneză somatică s-a finalizat prin dezvoltarea *ex vitro* a plantulelor. Se spală 60 de plante a căror organe s-au dezvoltat din embrionii somatici, pentru a îndepărta agarul. A urmat plantarea lor în vase de plastic înalte de 6 cm, pe un strat format din nisip autoclavat și mușchi de turbă. S-a asigurat păstrarea umidității prin acoperirea vaselor și udarea săptămânală a acestora timp de 15 săptămâni. După 2 luni s-a calculat rata de supraviețuire a plantelor.

În cazul embriogenezei somatice, inițierea formării calusurilor obținute din părți de tuber matur s-a produs la amplasarea explantelor pe mediul de cultură MS tratat cu 2,0 mg/L 6-benziladenină și 0,5 mg/L NAA. Calusul, odată îndepărtat de explant și transferat pe un mediu proaspăt, s-a dezvoltat normal, permițând subcultivarea la 20 de zile.

Citochininele stimulează formarea embrionilor somatici, acționând ca regulatoare de creștere, fără a fi nevoie de acțiunea auxinelor în completarea procesului (Rangaswamy 1986). Mediul de cultură suplimentat cu 4,0 mg/L de chinetină sau 0,5 mg/L zeatină a favorizat obținerea celui mai mare număr de embrioni somatici (Sagare et al. 2000).

Pe mediul de bază MS lichid, la cantitate înjumătățită și suplimentat cu ribosid-zeatină s-a realizat cel mai ușor transferul de calusuri și formarea embrionilor. Datorită stării lichide a mediului de cultură, embrionii au putut fi separați fără a fi deteriorați. Astfel, procesul de transformare al embrionilor în rădăcini și tulpini a avut un randament de 96% (Sagare et al. 2000).

ABA, paclobutrazolul și ancimidolul au influențat, de asemenea, rata de succes a procesului de regenerare. Mediul lichid suplimentat cu ribosid-zeatină nu a permis supraviețuirea embrionilor la mutarea în nisip și mușchi de turbă.

Adăugarea de sucroză, ABA, paclobutrazol și ancimidol (inhibitori de creștere) a dus la inducerea rapidă a dezvoltării tulpinilor, rădăcinilor și tuberculilor *in vitro*. Embrionii primari cultivați pe mediul lipsit de regulatori de creștere nu au realizat formarea de embrioni somatici nici la nivelul tuberculului, nici în zona bazală a cotiledoanelor.

Beneficiind de condiții optime, atent combinate, rata de aclimatizare a plantelor pentru dezvoltarea *ex vitro* a fost de 80% după 2 luni petrecute în camerele de creștere.

În cazul acestei proceduri de embriogeneză somatică prin care s-au obținut plante din embrionii speciei *Corydalis yanhusuo* se pot enumera condițiile care au condus la eficiența și optimizarea ei:

-păstrarea timp de 3 luni a fragmentelor de tuberculi în mediu MS suplimentat cu 2,0 mg/L BA și 0,5 mg/L NAA, în întuneric, ceea ce a dus la obținerea culturilor primare;

-cultivarea calusului primar, obținut anterior, în mediu MS cu 0,1 mg/L zeatină, în condiții de luminozitate, având ca finalitate inducerea embrionilor somatici;

-plasarea în mediul ½ MS lichid tratat cu ribosid-zeatină a embrionilor somatici, care au fost convertiți în proporție de 96%;

-înainte de translocarea pe substrat, plantele au fost cultivate pe ½ MS cu 2% sucroză, pe un interval de 3 săptămâni.

Așadar, după translocarea pe substratul de nisip și mușchi de turbă, 80% dintre plante au supraviețuit. Procesul durează, în mod normal, 8 luni, dar perioada poate fi diminuată la 5 luni, în funcție de obținerea culturilor de calus primar. După ce a avut loc aclimatizarea, se poate afirma finalitatea procesului, adică obținerea a 25 de exemplare dintr-un singur gram de calus primar derivat din fragmentele tuberculilor de *C. yanhusuo* (Sagare et al. 2000).

În acest material au fost scoase în evidență câteva metode referitoare la procesele de clonare și regenerare ale unor plante medicinale, precum și factorii care influențează evoluția și eficiența proceselor. Metodele de regenerare au nevoie de o continuă dezvoltare, documentare asupra lor și realizarea a cât mai multe studii. Importanța farmaceutică pe care unele plante o dețin, trebuie să constituie o preocupare la nivel științific, pentru a realiza regenerarea lor la scară largă, folosind cele mai bune metode.

Bibliografie

- Agnihotri S, Singh S K, Jain M, Sharma M, Sharma A K & Chaturvedi H C. 2004. In vitro cloning of female and male *Carica papaya* through tips of shoots and inflorescences, Indian J Biotech, 3: 235.-240.
- Ayabe M & Sumi S, 1998. Establishment of a novel tissue culture method, stem-disc culture, and its practical application to micropropagation of garlic (*Allium sativum* L.), Plant Cell Rep, 17: 773.

- Bajaj Y P S, Furmanowa M & Olszowska, 1988. Biotechnology of the micropropagation of medicinal and aromatic plants, in *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol 4, Medicinal and Aromatic Plants I, edited by Y P S Bajaj (Springer-Verlag, Berlin).
- Cavallini A, Natali I, & Sanchez I C. 1991. Aloe barbadensis Mill. (*Aloe vera* L.) in *Biotechnology in Agriculture & Forestry* Vol. 15. Medicinal & Aromatic Plants III, edited by Y P S Bajaj (Springer-Verlag Co, New York)
- Chaturvedi H C & Sinha M. 1979. Mass Propagation of *Dioscorea floribunda* by Tissue Culture. Extension Bulletin No. 6, EBIS (National Botanical Research Institute, Lucknow, India).
- Chaturvedi H C, Madhu Jain, Kidwai N R. 2007. Cloning of medicinal plants through tissue culture–A review, *Indian Journal of Experimental Biology*, 45: 937-948.
- Chaturvedi H C. 1979. Tissue culture of economic plants, in *Progress in Plant Research*, Vol 1, edited by T N Khoshoo & P K K Nair (Today and Tomorrow's Printers and Publishers, New Delhi).
- Cheng J & Raghavan V. 1985. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Hyoscyamus niger*, *Am J Bot*, 72: 580-587.
- Dave A, Bilochi G & Purohit S D. 2003. Scaling-up production and field performance of micropropagated medicinal herb 'Safed Musli' (*Chlorophytum borivilianum*), *In Vitro Cell Dev Biol-Plant*, 39:419-424.
- Duncan D B. 1955. Multiple range and multiple F tests. *Biometrics*, 11: 1-42.
- Erdei I, Kiss Z & Maliga P. 1981. Rapid clonal multiplication of *Digitalis lanata* in tissue culture, *Plant Cell Rep*, 1: 34-35.
- Gamborg O L, Miller R A, Ojima K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soyabean root cells. *Experimental Cell Research*, 50: 151-158.
- Gao Q., G. Li, Z. Wan, K. Yang, X. Cheng, J. Tang, H. Zhou, X. Ju, 1991. Preliminary infection source of downymildew of *Corydalis yanhusuo* W.T. Wang [Chi], *Chung-Kuo-Chung Yao Tsa Chih-China* 16 211–213.
- Grudnicki M., Ianovici N. 2014. *Noțiuni teoretice și practice de Fiziologie vegetală*, Ed. Mirton, Timișoara, 289 p.
- Hu K., Y. Liang, Studies on tuber and first age plants of yanhusuo (*Corydalis yanhusuo*), *Chung-Tsao-Yao* 27(1996) 687–689 in Chinese.
- Huang K.C., *The Pharmacology of Chinese Herbs*, CRC Press, Boca Raton, FL, 1993, pp. 141–142.
- Hunter C S. 1988. Micropropagation and the in vitro production of quinine and quinidine, in *Biotechnology in Agriculture & Forestry*, Vol. 4, Medicinal & Aromatic Plants edited by Y P S Bajaj (Springer-Verlag, Berlin, New York).
- Ikuta A., K. Syono, T. Furuya, 1974. Alkaloids of callustissues and redifferentiated plantlets in Papaveraceae, *Phytochemistry* 13: 2175–2179.
- Karim M Z, Yokota S, Rahman MM, Eizawa J, Saito Y, Azad MAK, Ishiguri F, Iizuka K, Yoshizawa N, 2007. Effect of the sucrose concentration and pH level on shoot regeneration from callus in *Araria elata* Seem, *Asian Journal of Plant Science*, 6(4): 715-717.
- Kavathekar A.K., P.S. Ganapathy, B.M. Johri, 1977. Chilling induces development of embryoids into plantlets in *Eschscholzia*, *Z. Pflanzenphysiol.* 81: 358–363.
- Mamun A N K, Matin M N, Bari M A, Siddique N A, Sultana R S, Rahman M H, Musa A S M. 2004. Micropropagation of woody legume (*Albizia lebbek*) through tissue culture. *Pakistan Journal of Biological Science*, 7(7): 1099-1103.
- Martin F. W & Gaskins M H, 1968. Cultivation of the sapogenin bearing *Dioscorea* species, in *Production Research Report No 103*. (Agricultural Research Service, USDA, Washington).
- Mascarenhas A F, Hendre R R, Nadgir A L, Ghugole D D, Godbole D A, Prabhu R A & Jagannatham V. 1976. Development of plantlets from cultured tissue of *Dioscorea deltoidea* Wall, *Indian J Exp Bot*, 14 604.
- Miller C O, Skoog F, Okumura F S, Von Saltza M H & Strong F M. 1955. Structure and synthesis of kinetin, *J Am Chem Soc*, 77: 2662.
- Murashige T., Skoog F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Physiol. Plant* 15: 473–497.
- Nessler C L. 1982. Somatic embryogenesis in the opium poppy, *Papaver somniferum*, *Physiol Plant*, 55 453-458.

ALEXAN: In vitro regeneration systems to medicinal plants

- Ovecka M, Bobak M, Samaj J. 2000. A comparative structure analysis of direct and indirect shoot regeneration of *Papaver somniferum* L. in vitro. *Journal of Plant Physiology*, 157: 281-289.
- Rangaswamy N.S. 1986. Somatic embryogenesis in an-giosperm cell tissue and organ cultures, *Proc. Indian Acad. Sci. (Plant Sci.)* 96: 247–271.
- Rech E L & Pires J P. 1986. Tissue culture propagation of *Mentha* spp. by the use of the axillary buds, *Plant Cell Rep*, 5:17-18.
- Sagare A P, Lee Y L, Lin T C, Chen C C, Tsay H S. 2000. Cytokinin-induced somatic embryogenesis and plant regeneration in *Corydalis yanhusuo* (Fumariaceae) — a medicinal plant, *Plant Science*.
- Sakano K. 1990. Proton/Phosphate stoichiometry in uptake of inorganic phosphate by cultured cells of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Plant Physiology*, 93: 479-483.
- Scholten H J, Pierik R L M. 1998. Agar as a gelling agent: chemical and physical analysis. *Plant Cell Reports*, 17: 230-235.
- Skoog F & Miller C O. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured in vitro, *Symp Soc Exp Biol*, 11: 118-130.
- Steward F C, Mapes M O, Kent A E & Holston R D, 1964. Growth and development of cultured plant cells – Biochemical and morphogenetic studies with cells yield new evidence on their metabolism and totipotency, *Science*, 143: 20.
- Wickens G E. 2001. *Economic Botany – Principles and Practices* (Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London)
- Zenktler M, 1971. Development of new plants from leaves and root of *Atropa belladonna* L. in the in vitro culture, *Acta Soc Bot Pol*, 40: 305-313.