

**Хабилитационна разширена справка
за научните приноси
на доц. д-р Лиляна Руменова Начева**

във връзка с участие в конкурс за заемане на академична длъжност "професор" по област на висше образование: 6. Аграрни науки и ветеринарна медицина; професионално направление: 6.1 Растениевъдство; научна специалност: Овощарство, обявен от Институт по овощарство – Пловдив в ДВ бр. 45 от 28.05.2021 г.

През последните петдесет години биотехнологичните методи са неразделна част от селекцията и размножаването на овощните растения. Конвенционалните методи на селекция – хибридизация, мутации и отбор при многогодишните културни растения, и в частност при овощните, са бавни, трудоемки и недостатъчно ефективни. Тези видове имат дълъг младенчески период, високо ниво на хетерозиготност и са нужни години за получаване на потомство и оценка на хибридите. Бурното развитие на биотехнологичните методи като ембриокултури, регенерация, соматична хибридизация, мутагенез *in vitro*, генетична трансформация и получаване на хаплоиди може да предостави ефективни решения в сферата на земеделието. Интегрирането на конвенционалните методи с биотехнологичните подходи предоставят уникални възможности за ускоряване на селекционния процес и позволяват създаване на генотипи с желани качества, устойчиви на биотичен и абиотичен стрес, за бързо размножаване и запазване на ценни форми, за откриване и елиминиране на патогени и др. В овощарството широко приложение намира микроразмножаването и получаването на безвирусни растения от подложки и сортове, както и ускоряването на селекционния процес чрез прилагане на различни *in vitro* методи, включващи ембриокултури, регенерация от соматични тъкани, получаване на хаплоиди, генетична трансформация и др. В публикация 11.1. е направен обстоен преглед на биотехнологичните методи в селекцията и размножаването на ябълка, като специално внимание е отделено на постиженията на българските учени. Биотехнологичните методи, прилагани от нас в селекцията на устойчивост към болести при круша, са обобщени в публикация 8.11.

Изследванията с мое участие са свързани главно с изучаване на физиологията на овощните видове в условия на *in vitro* култура и при аклиматизацията им към *ex vitro* условия, с възможностите за контролиране и оптимизиране на растежа и морфогенезата. Част от изследователската работа е насочена към приложение на *in vitro* техниките за вирусно елиминиране, както и за предварителни скрининг тестове за влиянието на хербициди върху овощните видове. Немалка част от научната дейност е насочена към изучаване и опазване на генетичните ресурси. Изведени са експерименти, свързани със стимулиране растежа на млади дървесни овощни и декоративни растения чрез различни начини на торене и др.

В проучванията са включени разнообразни биологични обекти - ябълки, круши, сливи, череша, праскови, орех, малини, ягоди, роза, магнолия, тис, гинко билоба, липа и др.

А. Основни научни приноси при изследвания с *in vitro* растения

Култивирането на растителни тъкани в *in vitro* условия е едно от бързо развиващите се направления, имащи не само теоретични, но и приложни аспекти със значителен икономически ефект. Обичайно се приема, че отглеждането на растенията *in vitro*, при контролирани температура, осветление, хранителен и воден режим, стресовите фактори са сведени до минимум. В действителност, обаче, по време на *in vitro* култивирането растителните клетки и тъкани са поставени при специфични, в много аспекти стресови условия – висока относителна влажност, ниско осветление, големи денонощни колебания в концентрацията на CO₂, натрупване на токсични субстанции, високо съдържание на захари в хранителната среда, отсъствие на микроорганизми и др. Тези условия често водят до ниско ниво на транспирация и фотосинтеза, високо ниво на тъмнинно дишане и като резултат от това до формиране на растения с аномална морфология, анатомия и физиология. Такива растения трудно преодоляват стреса в процеса на адаптация към условията на външната среда.

Въпреки колосалните успехи на *in vitro* култивирането през последните години, много аспекти остават все още неизяснени. Оптимизирането на протоколите е ставало предимно по емпиричен път. Физиологичните изследвания на растенията в условия на *in vitro* култура все още не са адекватни на напредъка в технологичен аспект. Значително по-малко са изследванията за изясняване на причините и механизмите на наблюдаваните положителни или негативни ефекти. От друга страна, дървесните видове (овощни и декоративни) значително по-трудно се поддават на култивиране *in vitro*. Поради високото съдържание на феноли, при много видове въвеждането в култура е предизвикателство. Вкореняването *in vitro* при дървесните видове зависи много от генотипа и често е лимитиращ фактор при масовото микроразмножаване на ценни форми. С дълбокото убеждение, че успехът на вкореняването и аклиматизацията се залага на още по-ранни етапи от микроразмножителния процес, се опитахме да разберем как да подготвим *in vitro* растенията за по-лесна и успешна аклиматизация. Изпитани са различни подходи за това – прилагане на съдове с подобрен газообмен с околната среда, подходящо диодно осветление (LED), точно подбрани въглехидрати, иновативни растежни регулатори и биостимулатори и др.

1. Ефект на съдове с подобрен газообмен с околната среда

За да се ограничи заразата от въздуха, при *in vitro* култивирането на растителни клетки и тъкани се използват малки, плътно затворени културални съдове. Това гарантира стерилността и предотвратява

дехидратацията на тъканите, но води до поддържане на висока относителна влажност (почти 100%), големи денонощни колебания в концентрацията на CO₂, натрупване на газообразни токсични продукти на обмяната, вкл. етилен и др., които водят до физиологични проблеми като встъкляване, инхибиране на растежа и т.н. (Ziv, 1991). В нашите изследвания е установено, че култивирането на растения от ябълковата подложка MM106 и крушовата подложка ОНФ 333 в съдове с подобрен газообмен с околната среда, води до по-ефективна фотосинтеза, по-интензивна транспирация и натрупване на по-голяма биомаса в сравнение с тези, култивирани в плътно затворени стъклени съдове (публикации 8.25, 8.27 и 7.12.). При растенията от ябълковата подложка е установено и по-високо съдържание на фотосинтетични пигменти и по-голяма листна площ (публикация 8.25).

2. Влияние на различни светлинни източници върху *in vitro* растенията

Редица външни и вътрешни фактори регулират растежа и развитието на растенията *in vitro*, но светлината е един от най-важните. Системата за осветление на *in vitro* културите трябва да осигури светлина, благоприятстваща фотосинтезата и фотоморфогеничните отговори на растенията (Bula et al., 1991; Seabrook, 2005). В камерите за култивиране на растения отдавна се използват изкуствени светлинни източници, като флуоресцентни лампи, натриеви лампи, метал-халогенни лампи, лампи с нажежаема жичка, и др. като луминесцентните лампи са най-популярни (Economidou and Read, 1987). Въпреки това, тези светлинни източници са с ненужно широк спектър на дължини на вълната (350-750 nm) и консумират много електрическа енергия, като при това излъчват топлина. През последните години, като потенциален алтернативен източник на светлина за растеж и развитие на растенията в *in vitro* условия са предложени диоди, излъчващи светлина (light emitting diodes, LED, светодиоди) (Bula et al., 1991; Yeh and Chung, 2009; Nhut et al., 2003, 2005). LED осветителните системи притежават няколко уникални предимства в сравнение с конвенционалните системи. LED имат специфична дължина на вълната, малък размер, дълъг експлоатационен живот, сравнително хладна повърхност, както и възможност да се контролира спектралния състав (Hoenecke et al., 1992; Brown et al., 1995). Тъй като излъчват в специфични спектрални диапазони, светодиодите биха могли да бъдат използвани за прецизно регулиране на качеството и интензивността на светлината за оптимална производителност, влияеща върху морфологията и метаболизма на растенията (Kim et al., 2004a, b, c; Folta et al., 2005). По тази причина, тези източници са много подходящи за култивиране на растения в *in vitro* и *in vivo* условия. С помощта на светодиодните спектрални източници може да се контролира растежът и развитието на клетъчните, тъканните и органните култури чрез повлияване на различни физиологични реакции (Briggs and Olney, 2001; Kurilcik et al., 2008). През последните години са проведени редица изследвания за ефекта на

светлинния спектър, излъчван от LED системи, върху различни *in vitro* растения. Получените резултати са обещаващи и показват, че светодиодните осветителни системи са по-подходящи от флуоресцентните лампи (Gupta and Jatothu, 2013). При отглеждане на микрорастенията при LED осветление е установен по-добър растеж и морфогенез в сравнение с тези растения, култивирани при осветление с луминесцентни лампи. Ефектът е значителен при прилагане на червени и сини светлини, самостоятелно или в комбинация. Редица автори подчертават, че комбинирането на синя и червена светлина повишава растежа, свежата и сухата маса на растенията, в сравнение с монохроматичната LED светлина (Nhut et al., 2000, 2002; Lian et al., 2002; Duong et al., 2003; Kim et al., 2004a, b, c; Poudel et al., 2008; Shin et al., 2008; Li et al., 2010). Обобщавайки резултатите на много автори относно възможностите за приложение на LED осветлението като основно или допълнително осветление при *in vitro* култивирането на растения, можем да отбележим, че то е перспективно и енергийно ефективно. Почти всички експерименти, обаче, са проведени с тревисти растения - картофи, гербера, и др. Данните за влиянието на LED светлините при *in vitro* култивирането на дървесни видове са оскъдни (бор, Merkle et al., 2005), а за овощни при стартирането на нашия проект през 2019 година, липсваха такива. В резултат на интензивни изследвания през последните две години е установено, че при *in vitro* култивиране на малина (*Rubus idaeus* L. 'Lloyd George') при комбинирано светодиодно осветление (LED) растенията показват по-интензивна фотосинтеза и натрупват по-голяма биомаса, в сравнение с тези, отглеждани при конвенционални луминесцентни лампи (публикация 4.1.). При култивиране на крушовата подложка ОНF333 (*Pyrus communis* L. 'ОНF 333') по-добри резултати са постигнати при бяла LED светлина (публикация 7.1.). Смесената LED светлина стимулира растежа на височина и натрупването на биомаса при лечебния дървесен ендемитен вид с декоративна стойност *Camptotheca acuminata* Desne. (публикация 4.3.).

3. Възможности за оптимизиране на растежа в *in vitro* условия чрез подходящо подбрани въглехидрати

Въглехидратите имат важна роля за *in vitro* културите като източник на енергия и въглерод, осмотичен агент и модулатор на генната експресия. Захарозата е почти универсално използван източник на въглерод, макар че различните видове имат специфични потребности. Изследванията при видовете от род *Malus* и *Prunus* показват изключителното значение на включването на сорбитол в хранителните среди. Сорбитолът наред със захарозата е първичен продукт на фотосинтезата и основна транспортна форма на въглерода при дървесните видове от *Rasaceae* (Wallaart, 1980; Bielecki, 1982). Комбинирането на сорбитол и захароза (1:1) води до почти двойно повишаване в коефициента на мултипликация при черешовата подложка GiSela6 (*Prunus cerasus* L. × *Prunus canescens* L.) (публикация

8.23.). Аналогични резултати са получени и при GiSela5 (Nacheva and Gercheva, 2009).

При експерименти с ягодовия сорт „Селва” е установено, че замяната на захароза с глюкоза в хранителните среди води до двукратно увеличение на коефициента на мултипликация (публ. 8.22.).

Удължаването на среда с 4% захароза в съдове с газопроницаемо покритие стимулира вкореняването на *in vitro* растения от ябълковата подложка M26 на агарова хранителна среда без въглехидрати (публ. 8.13.).

4. Растежни регулатори

Ефективността на *in vitro* култивирането зависи до голяма степен от използването на оптимални концентрации растежни регулатори – ауксини, цитокинини и гибберелини. Те въздействат върху различни процеси, свързани с растежа и морфогенезата на растенията. Влиянието им при екзогенно приложение не е универсално, а в зависимост от спецификата на обекта и начина на приложение на използваните вещества.

4.1. Цитокинини

Ароматният цитокинин 6-benzyladenine (BAP) е най-широко използваният цитокинин в комерсиалното микроразмножаване, поради неговата ефективност и достъпност (Bairu et al., 2007; Vasil, 2008). Много автори, обаче, свързват трудностите при вкореняване и аклиматизация на редица видове, особено дървесни, с култивирането на среди, обогатени с BAP (Harrar et al., 2003; Magyar-Tabori et al., 2010; Werbrouck, 2010; Smulders and De Klerk, 2011). Има данни, че в основата на *in vitro* растенията се натрупва метаболитът [9G]BA ([6-benzylamino- b-D-glucopyranosyl]purine)], който впоследствие затруднява вкореняването (Auer, 1997; Moyu et al., 2011). Изследователите препоръчват хидроксилираните аналози на BAP – N6-(3-хидроксибензиламино) пурин (мета-тополин - mT) и негови производни като алтернативни заместители на BAP в растителните тъканни култури (Werbrouck et al., 1996; Strnad, 1997; Bairu et al., 2007; Amoo et al., 2011). Според тях, мултипликацията, вкореняването и аклиматизацията могат да бъдат повишени чрез заместване на BAP с мета-тополин. Нашите изследвания в това направление стартираха през 2014 година с крушовата подложка ONF 333, като при публикуването на статията през 2016 година (Dimitrova et al., 2016) това бе първото съобщение за успешно прилагане на mT при круша и до момента има повече от 17 цитата.

Растения от крушовата подложка ONF 333, отглеждани на хранителна среда с mT в полипропиленови съдове с газопроницаемо покритие при бяла LED светлина натрупват повече биомаса и листна площ и показват по-интензивна фотосинтеза в сравнение с тези, култивирани с BAP (публикация 7.1.).

Комбинирането на mT с LED светлини благоприятства развитието на *Camptotheca acuminata* Desne – лечебен дървесен ендемит от Тибет (публикация 4.3.).

4.2. Биостимулатори с естествен произход

Вкореняването и аклиматизацията към *ex vitro* условия при дървесните видове, и в частност при овощните, са трудни и не винаги успешни (Chevreau et al., 1992; Reed, 1995). Няма универсален метод, приложим при всички генотипи. Търсенето на субстанции, стимулиращи вкореняването и аклиматизацията, е една от стратегиите, насочени към подобряване на вкореняването с едновременното намаляване на приложението на екзогенни ауксини (Arthur et al., 2004; Pacholczak et al., 2012; Montero-Calasanz et al., 2013). Прилагането на природни продукти, стимулиращи вкореняването, би могло да ограничи загубите по време на *ex vitro* аклиматизацията (De Klerk et al., 1999; Kakani et al., 2009).

През последните години нараства интересът към биостимулантите като екологична алтернатива на химикалите за ускоряване на растежа на растенията в условия на стрес. Чаркор, Биолан, Агростимулин, Регоплант и Стимпо (Agrobiotech, Украйна, <http://www.agrobiotech.com.ua>) са част от ново поколение растежни биостимулатори, които съдържат метаболитни продукти от *in vitro* култивирането на ендодитни микромицети, изолирани от корени на женшен. Препаратите съдържат комплекс от аминокиселини, мастни киселини, захари, макро- и микроелементи и аналози на фитохормоните. Регоплант съдържа също аверсектин - биологичен продукт с антипаразитна активност. Според авторите, Чаркор е по-ефективен от индолил-оцетна и индолил-маслена киселина при вкореняване на резници от редица декоративни дървета и храсти (Ponomarenko et al., 2010). В рамките на проект за двустранно сътрудничество с Украйна, финансиран от Фонд „Научни изследвания“ изпитвахме влиянието на тези биостимулатори върху *in vitro* овощни и декоративни растения.

4.2.1. Влияние на Чаркор върху вкореняването и аклиматизацията на растенията

При проведените експерименти е установен положителен ефект на биостимулатора Чаркор върху вкореняването при няколко дървесни видове - круша, магнолия и др.

Включването на Чаркор самостоятелно или в комбинация с IAA в хранителната среда има дълготраен положителен ефект върху растежа и развитието на растенията от круша (подложката ОНФ 333) и в етапа на аклиматизация *ex vitro* (публикация 7.5.).

In vitro получени микрорезници от крушовата подложка ОНФ333 могат да бъдат едновременно вкоренени и аклиматизирани (над 85%) при нестерилни (*ex vitro*) условия чрез прилагането на IAA или Чаркор

(публикация 4.2.). Това би ускорило процеса и би спестило средства за труд като се изпълнява един етап по-малко.

Предварителните ни експерименти за вкореняване на магнолия *in vitro* бяха неуспешни и потвърдиха трудното вкореняване на растенията от този род (публикация 8.15.). За първи път изпитавме биостимулатора Чаркор в *in vitro* условия при вкореняване на два вида магнолия - *Magnolia grandiflora* L. и *Magnolia × soulangiana* Soul.-Bod., отличаващи се с особено трудно вкореняване (публикация 8.8.). В течна хранителна среда с перлит, Чаркор показва стимулиращ ризогенезата ефект и при двата вида, като бе отчетено почти 100% вкореняване. Това е първо съобщение за прилагане на Чаркор в *in vitro* условия.

4.2.2. Влияние на Регоплант и Стимпо

Прехвърлянето на *in vitro* растенията към условия *ex vitro* често е съпроводено от стрес вследствие на засушаване и/или фотоинхибиране (Semorádová et al., 2002; Carvalho et al., 2006). В серия от експерименти изпитавме възможностите на биостимулаторите Регоплант и Стимпо за понижаване стресовите ефекти и подобряване на аклиматизацията на овощните растения при прехода от *in vitro* към *ex vitro* условия.

Установено е, че третирането на *in vitro* вкоренени растения от крушовата подложка ОНФ333 чрез 10 минутно потапяне в разтвор на Регоплант ($50 \mu\text{l l}^{-1}$) преди засаждане в торфен субстрат значително стимулира растежа. На 30-ия ден след третиране и засаждане на растенията свежата маса на растенията, третирани с Регоплант, е три пъти по-голяма, а сухата маса два пъти в сравнение с контролните растения (публикация 7.8.).

Положителният ефект на Регоплант е потвърден и при *ex vitro* аклиматизацията на черешовата подложка GiSelA 6 (*Prunus cerasus* 'Schattenmorelle' × *Prunus canescens*) - обогатяването на хранителния разтвор с Регоплант ($100 \mu\text{l l}^{-1}$) в условията на флоатинг система води до най-висок процент на аклиматизирани растения (86%) с максимална биомаса, дължина на стъблото, брой листа и листна площ (публикация 7.2.).

Изследвано е влиянието на Регоплант върху развитието на микроразмнжени и аклиматизирани крушови растения (*Pyrus communis* L. 'Packham's Triumph'), инокулирани с бактерията *Erwinia amylovora* Burrill., причиняваща огнен пригор. При инокулиране с бактерията пет дни след третирането с Регоплант ($100 \mu\text{l l}^{-1}$) е отчетен и най-нисък индекс на нападение - 18,46% и не са наблюдавани симптоми на заразяване с *Erwinia* десет дни след инокулирането (публикация 7.4.).

5. Влияние на биотор Лумбрикал върху аклиматизацията

Растенията от крушовата подложка ОНФ 333, аклиматизирани към *ex vitro* условия в субстрат, обогатен с биотор Лумбрикал, показват по-добър растеж (дължина на стъблото, брой листа, листна площ и свежа маса) и

фотосинтетични характеристики в сравнение с контролните растения (публикация 4.7.).

6. Влияние на гранулирани торове с контролирано освобождаване Osmocote върху растежа и развитието на микроразмножени растения от магнолия.

Установено е, че прилагането на гранулиран тор с контролирано освобождаване Osmocote в субстрата за доотглеждане на *in vitro* размножени растения от *Magnolia grandiflora* L. и *Magnolia × soulangiana* Soul.-Bod. влияе положително върху растежа и развитието на растенията. За растенията от *Magnolia grandiflora* L. най-подходящо е прилагането на 4-то поколение Osmocote (Exact Hi End), докато за *Magnolia × soulangiana* Soul.-Bod. по-добър ефект има включването в субстрата за култивиране на Osmocote Pro 3-4M (2-ро поколение) и Osmocote Exact Standart (3-то поколение) (публикация 8.6.).

7. Основни научни приноси, свързани с прилагане на биотехнологични методи за опазване на генетичните ресурси

Напредъкът в растителните биотехнологии предоставя нови възможности за събиране, размножаване и опазване на растителното биоразнообразие, използвайки *in vitro* техники за култивиране и тази тенденция вероятно ще продължи, тъй като все повече видове са изправени пред риск от изчезване (Sarasan et al., 2006). Постигнат е значителен напредък за опазване на застрашени, редки декоративни, лечебни и горски видове чрез прилагане на *in vitro* методи, като се подчертава ефективността им за опазване на биоразнообразието като допълнение или алтернатива на конвенционалните методи за размножаване (Reed et al., 2011; Cruz-Cruz, 2013; Coelho, 2020).

В рамките на няколко проекта към ССА и ФНИ сме работили с различни редки, застрашени и ендемитни овощни, лечебни и декоративни видове. Въведени в *in vitro* култура и размножени са 4 образци от стари местни круши (*Pyrus*) (публикация 8.19.), както и 3 сорта с потенциална устойчивост към огнен пригор (публикация 8.11.). Разработена е ефективна система за микроразмножаване на 3 местни форми орех (*Juglans regia* L.) (публикация 8.9.). Създадени са успешни протоколи за *in vitro* размножаване на лечебните дървесни видове с декоративна стойност *Ginkgo biloba* L. (публикация 8.17.), *Taxus baccata* L. (публикации 8.16 и 8.18.), *Magnolia* (публикации 8.7 и 8.8), *Camptotheca acuminata* Desne (публикация 4.3.). Оптимизирани са методите за *in vitro* култивиране на застрашените лечебни растения *Haberlea rhodopensis* (публикация 4.4.), *Helichrysum italicum* (публикация 7.6.). Всички тези видове се поддържат в *in vitro* генбанката на научната лаборатория по растителни биотехнологии на Институт по овощарство - Пловдив.

8. Основни научни приноси при прилагане на *in vitro* методи за вирусно елиминиране

Използването на свободен от вируси посадъчен материал е от изключителна важност за съвременното овощарство. Съчетаването на *in vitro* техники с термотерапия и/или хемотерапия може да се използва за получаване на свободен от вируси изходен материал.

При ябълковия сорт 'Ремо' с цел вирусно елиминиране сме провели експерименти за термотерапия *in vitro*. При 75% от растенията е постигнато успешно освобождаване на ACLSV и ArMV, а елиминиране на ASGV е постигнато при 50% от тестираните клонове. Получените резултати показват, че съчетаването на термотерапията с *in vitro* техниките е подходящ начин за получаване на безвирусни изходни растения за кратък период, но е необходимо на всеки един етап от процеса да се извършва серологичен или молекулярен контрол за наличие на вируса (публикация 7.14.).

За елиминиране на вирусите ACLSV, ArMV и ASGV от микроразмножени растения на ябълковия сорт 'Ремо' е приложена и хемотерапия с рибавирин (20 - 100 mg l⁻¹). Рибавирин в концентрация 20 mg l⁻¹ слабо повлиява растежа на микрорастенията, без да причинява хлороза или некроза. ELIZA тестовете не показват наличие на ACLSV, ArMV или ASGV. По-високите концентрации на рибавирин са фитотоксични (публикация 8.21.).

9. Основни научни приноси, свързани с разработване на бърз *in vitro* скрининг за влиянието на почвени хербициди върху растежните прояви на овощни видове.

Приложението на хербициди в овощните разсадници като елемент от добрата агротехника често крие рискове от проявяване на фитотоксични симптоми при растенията. Затова са необходими предварителни изследвания за въздействието на различните хербициди върху вегетативните прояви на подложките.

Разработена е моделна система с *in vitro* растения за проследяване влиянието на почвени хербициди върху развитието на подложки за овощните видове. Сред най-важните предимства тази система са: извеждане на опити с еднороден растителен материал при контролируеми условия, възможност за целогодишно приложение, отчитане на голям брой варианти за кратко време и малка площ, възможности за приложение на биохимични и молекулярни методи за изясняване механизма на действие на активното вещество (публикации 4.8; 4.9.; 4.10.; 4.11.; 8.14.; 8.24.). Детайлно е изследван и стресовият отговор на микроразмножени растения от черешовата подложка GiSela 5 в условията на съдов опит. Получените резултати са изключително важни с оглед приложението на почвените хербициди в разсадниците (публикации 4.8. и 4.9.).

В условия на моделен съдов опит е проучено влиянието на почвените хербициди пендиметалин, метолахлар, оксифлуорофен и изоксафлутол върху растежните прояви на *in vitro* размножени и вкоренени растения от

ремонтантния малинов сорт 'Люлин' (публикация 8.14.). Установено е, че третирането с почвените хербициди пендиметалин, напропамид и метолахлор не причинява външни симптоми на фитотоксичност и не потиска растежа на малиновите растения. Две седмици след третиране с високи дози оксифлуорфен растенията проявяват симптоми на хлороза по листата, преминаващи в некроза, последвана от увяхване на некротичните области. Третирането с изоксафлутол води до появата на хлороза. Установени са пониски стойности на фотосинтетични пигмента в листата след третиране с метолахлор, като при по-високи дози е наблюдавано и потискане на растежа.

10. Приноси от методологичен характер

10.1. Оптимизиране на дезинфекционните процедури при въвеждане в *in vitro* култура на експлантите от дървесни видове

Известно е, че по повърхността на дървесните видове, растящи на открито, се развива голямо количество съпътстваща микрофлора. Дезинфекцията на повърхността на експлантите с химични агенти е критична стъпка за премахване на контаминацията с минимално увреждане на растителните клетки преди въвеждането им в *in vitro* култура. Например, установено е, че при растенията от различни видове *Taxus in vivo* се развиват голям брой ендofитни микроорганизми, включващи представители на повече от 300 гъбни и бактериални родове (Strobel et al., 2001) и това е основната причина за трудностите, свързани с въвеждането му в *in vitro* култура (Kulkarni, 2007). Разработени са различни методи за елиминиране на микроорганизмите от повърхността на растенията при въвеждане *in vitro*. Най-широко използваните дезинфектанти са натриев хипохлорит, калциев хипохлорит, етанол, живачен двухлорид, водороден пероксид, сребърен нитрат. Тъй като тези стерилизиращи агенти са токсични за растителните тъкани, замърсяването трябва да се отстрани, без да се убиват растителните клетки. Няма стандартен метод на стерилизация, подходящ за всички растения и за дезинфекция на тъкани от дървесни видове се прилагат специфични методи в зависимост от растителните видове и типа на експлантите. Разработени са методи за дезинфекция на връхни експлантите от слива (*Prunus domestica* x *Prunus cerasifera* 'Docera 6'), *Ginkgo biloba* L., *Taxus baccata* L. и ембриони от череша (*Prunus avium* 'Rosalina') чрез самостоятелно или комбинирано въздействие със сребърен нитрат, хлорхексидин диглюконат и/или калциев хипохлорит (публикации 7.7 и 8.18.).

10.2. Адаптиране на методи за анализ на хлорофилната флуоресценция при *in vitro* и *ex vitro* растения

При създаването на конвенционалната система за *in vitro* култивиране се е смятало, че микрорастенията имат ниска фотосинтетична активност, за да осъществяват положителен въглероден баланс и се нуждаят от захари като въглероден и енергиен източник (Grout and Ashton, 1978).

Изследванията през последните години доказаха, че микрорастения от различни растителни видове показват значителна фотосинтетична активност, близка до тази на кълнове и млади растения. Нето фотосинтезата на микрорастения, извадени от културалните съдове и измерена при оптимални условия на околната среда, може да бъде малко по-ниска, сравнима и дори по-висока от тази на семеначета от съответния вид (Pospisilova, 1996). *In vitro* растенията притежават потенциал за фотосинтеза, но тя е ограничена от специфичните условия в културалните съдове - висока въздушна влажност, ниска интензивност на светлината, ниска концентрация на CO₂ през голяма част от светлинния период, както и наличие на екзогенни захари в хранителната среда. Физиологичните изследвания на *in vitro* растенията са сравнително ново направление. През последните години все по-широко приложение намира методът за анализ на хлорофилната флуоресценция, който при недеструктивни (*in vivo*) анализи дава значителна качествена информация за организацията и функционирането на фотосинтетичния апарат.

За първи път в България са адаптирани методи за анализ на хлорофилната флуоресценция (OJIP тест) при *in vitro* растения (публикация 4.1.) и аклиматизирани към *ex vitro* условия растения (публикации 7.2.; 7.8; 8.1.).

10.3. Третиране на *in vitro* тъкани със студена атмосферна плазма

През последните години нискотемпературната атмосферна плазма под налягане (наричана още студена атмосферна плазма, CAP) се изследва за възможни приложения за инактивиране на патогени в медицината (Woedtke et al., 2019), хранителните технологии (Pankaj et al., 2018), пречистване на води и в земеделието (Stryczewska, 2020). Чрез използване на обикновени газове като въздух или аргон, биха могли да се получат реактивни кислородни и азотни видове, както и озонни оксиди, пероксиди и моноксиди, които за кратко време на третиране от няколко секунди биха оказали силно въздействие върху патогените. В рамките на проект към ФНИ е разработена моделна система за третиране на *in vitro* тъкани със студена атмосферна плазма с потенциално приложение за дезинфекция и вирусно инактивиране (публикация 4.5.).

Б. Основни научни приноси при изследвания, свързани с размножаване и оптимизиране на растежа на семеначета и млади растения.

1. Орех (*Juglans regia* L.)

1.1. Орехът (*Juglans regia* L.) е трудно размножаваш се овощен вид. Това се дължи на високото му съдържание на фенолни компоненти и тяхното оксидиране при нараняване, което възпрепятства доброто калусообразуване след присаждане. Поради тази причина, в света се търсят различни методи за производство на посадъчен материал. Присаждането по метода “топъл калус“

води до висок процент на прихващане, като по този начин може да се удължи срока на присаждане (Gandev, 2008). Посредством радиоизотопен експеримент с ^{14}C е проучен транспортът и разпределението на фотоасимилатите в орехови растения, присадени по метода „топъл калус“. Доказано е, че присаждането по този метод осигурява добър транспорт и разпределение на новоизработените ^{14}C -фотоасимилати в рамките на цялото присадено растение (публикация 7.13.).

1.2. Изследвано е въздействието на азотно торене върху растежа и физиологичните характеристики на млади орехови растения, отглеждани в контейнери. Растенията от сорт Извор 10, присаден върху орехова подложка (*Juglans regia* L.) са размножени по метода „топъл калус“. Установено е, че подхранването с амониев нитрат (NH_4NO_3), в диапазона от 2-4g N/контейнер значително стимулира растежа им, натрупването на биомаса и допринася за по-ефективно развитие и структуриране на фотосинтетичния апарат. Получените резултати показват, че торенето е задължително за производството на посадъчен материал от орех в контейнери (публикация 4.6.).

2. *Ginkgo biloba* L.

2.1. Възможности за присаждане на *Ginkgo biloba* L. по метода „топъл калус“

Ginkgo biloba L. се използва повече от 3000 години в родината си Китай за храна, украса и като лечебно растение. В Китай, както и в цяла Азия, ядките на гинко традиционно се консумират като храна, богата на протеини. За разлика от Европейските страни, където женските дървета се отбягват поради неприятната миризма на зрелите плодове, в Китай те се отглеждат масово за храна, като за производство на ядки са отбрани около 44 сорта. От различни части на растението (листа и семена) се извличат голям брой активни съединения, най-важните от които са флавоноли, гликозиди и терпенови трилактони.

В рамките на проект за двустранно сътрудничество с Китайската Народна Република (ДНТС /Китай 01/4) „ГИНКО БИЛОБА ДАР ОТ ДРЕВНОСТТА ЗА БЪДЕЩЕТО. Биотехнологични и екологични подходи за изучаване и размножаване на *Ginkgo biloba* L. с цел приложението му в градското озеленяване, рекултивиране на промишлени и неплодородни терени и производство на биоактивни вещества“ изпитвахме различни методи за размножаване, включително и *in vitro*, на форми с ценни качества. За първи път е установено, че методът за присаждане „Топъл калус“ може успешно да бъде прилаган при вегетативно размножаване на ценни форми от *Ginkgo biloba* L. (публикация 7.10.).

2.2. Възможностите за стимулиране растежа на семеначета от *Ginkgo biloba* L. чрез прилагане на гранулирани торове с контролирано освобождаване Osmocote.

Установено е, че прилагането на Osmocote Exact Standart (3-то поколение) в субстрата за култивиране на *Ginkgo* стимулира растежа на едногодишни семеначета (публикация 7.9.).

В. Основни научни приноси при изследвания, свързани със стимулиране кълняемостта на семена от лечебни и декоративни видове

1. *Magnolia grandiflora* L.

Магнолиите са едни от най-предпочитаните декоративни видове заради красивите цветове и листа. Разпространението им е ограничено поради трудностите при размножаването им. Семената на магнолиите имат ниска кълняемост, а вегетативното размножаване среща редица трудности поради проблемното им вкореняване. В нашите експерименти изпитавме възможностите за стимулиране кълняемостта на семената чрез третиране с растежни регулатори – ауксин (IAA) и гибберелин (GA₃), както и споменатите по-горе природни биостимулатори Биолан и Агростимулин. Предсеитбеното третиране на семена от *Magnolia grandiflora* L. за 24 часа в разтвор на GA₃ самостоятелно или в комбинация с IAA (2500 ppm) повишава двукратно кълняемостта им в сравнение с контролата (публикация 8.20.). Обработката на семената на *Magnolia grandiflora* L. с Биолан и Агростимулин не подобрява покълването на семената при конкретните условия, но влияе благоприятно върху по-нататъшното развитие на семеначетата (публикация 7.3.). Растенията, получени от третирани с Биолан (0,02%) семена, имат по-голяма листна площ и свежа маса на листата в сравнение с останалите варианти. Третиране на семената след стратификацията им с Агростимулин (0,005%) оказва положително влияние върху развитието на кореновата им система.

2. *Limonium bulgaricum* Anchev и *Goniolimon dalmaticum* (C. PRESL) RCHB. F. са Балкански ендемитни видове с ценни декоративни качества, включени в Червената книга на България. Семена от 11 генотипа от двата вида са третирани с разтвор на Биолан (0.01%) за 12 часа (публикация 8.2.). Установено е, че това третиране значително стимулира кълняемостта на семената и при двата вида, като ефектът е генотипно специфичен. Освен това, и при двата вида се наблюдава положителен ефект върху дължината на семеначетата и броя на формираните листа, особено при някои от генотипите от *Goniolimon*.

Г. Експерименти в други направления

1. Установено е, че червенолистният прасковен хибрид № 9-205, изучаван като нова клонова подложка, е подходящ за сортовете праскови от

типа нектарини, за прясна консумация и за преработка. Той предизвиква по-слаб темп на растеж на присадените сортове от трите групи, в сравнение с клоновата подложка GF-677 и семенната подложка. Полученият посадъчен материал е изравнен по височина и дебелина на стъблото и отговаря на стандартите за качество (публикация 8.4.).

2. В рамките на проект за двустранно сътрудничество с Китайската Народна Република (ДНТС /Китай 01/4) „Гинко билоба – дар от древността за бъдещето“ е проведено мащабно екологично проучване за инвентаризиране и оценка на генетичните ресурси и състоянието на дърветата от *G. biloba* в България (публикация 7.11.). Установено е, че представителите на този вид се развиват успешно при почвено-климатичните условия на страната ни и би било уместно да се търсят възможности за разширяване на приложението му като декоративен и стопански вид.

3. Във връзка с обширното проучване на методите за размножаване на липа, извършвани съвместно с докторант Валентин Панчев от АУ-Пловдив, са изследвани растежните параметри на семеначета в зависимост от времето на събиране на семената и предтретирането им (публикации 8.3 и 8.5.).

4. Изследвано е влиянието на органичния тор "Laktofol Flower" (ЕСОFOL, България) върху добива и качеството на семената от четири малко известни едногодишни цветя от семейство *Asteraceae*, подходящи за озеленяване - *Cacalia coccinea* Curt, *Brachycome iberidifolia*, *Crepis rubra* L., *Ursinia anethoides* L. Pair. Установено е, че листното прилагане на "Laktofol Flower" има подчертан положителен ефект върху добива на семена от вида *Cacalia coccinea* Curt. и *Crepis rubra* L. Ефектът върху добива на семена при *Brachycome iberidifolia* е по-слаб, докато при *Ursinia anethoides* L. Pair. – незначителен (публикация 8.12.).

Цитирана литература

- Amoo, S., Finnie, J., Van Staden, J. 2011. The role of meta-topolins in alleviating micropropagation problems. *Plant Growth Regul.* 145, 150-161.
- Arthur, G., Stirk, W. and van Staden, J. 2004. Screening of aqueous extracts from gelling agents (Agar and Gelrite) for root-stimulating activity. *South African Journal of Botany* 2004, 70(4): 595–601
- Auer, C. 1997. Cytokinin conjugation: recent advances and patterns in plant evolution. *Plant Growth Regul.* 23, 17-32.
- Bairu, M., Stirk, W., Dolezal, K., Van Staden, J. 2007. Optimizing the micropropagation protocol for the endangered *Aloe polyphylla*: can meta-topolin and its derivatives serve as replacement for benzyladenine and zeatin. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 90, 15-23.
- Bieleski, R. 1982. Sugar alcohols, p. 158-192. In: *Encyclopedia of plant physiology, new series*, vol. 13A, Springer Verlag, Berlin.
- Briggs, W. and Olney, M. 2001. Photoreceptors in plant photomorphogenesis to date, five photochromes, two cryptochrome, one phototropin and one superchrome. *Plant Physiol.* 125, 85-88.
- Brown, C., Schuerger, A., Sager, J. 1995. Growth and photomorphogenesis of pepper under red light-emitting diodes with supplemental blue or far-red light. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 120(5), 808-813.

- Bula, R., Morrow, R., Tibbitts, T., Barta, J., Ingnatius, R., Martin, S. 1991. Light-emitting diodes as a radiation source for plants. *HortScience*. 26, 203–205.
- Carvalho, L., Vilela, B., Vidigal, P., Mullineaux, P., Amâncio, S. 2006. Activation of the ascorbate-glutathione cycle is an early response of micropropagated *Vitis vinifera* L. explants transferred to ex vitro. *Int. J. Plant Sci.*, 167, 759-770.
- Chevreau E., B. Thibault and Y. Arnaud. 1992. Micropropagation of Pear. In: Bajaj, Y. (ed.) *Biotechnologi in Agriculture and Forestry* 18, High-Tech and Micropropagation. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 244-261.
- Coelho, N., Gonçalves, S., and Romano, A. 2020. Endemic Plant Species conservation: Biotechnological Approaches. *Plants*,9, 345; doi:10.3390/plants9030345
- Cruz-Cruz, C., González-Arno, M. and Engelmann, F. 2013. Biotechnology and Conservation of Plant Biodiversity, *Resources* 2013, 2, 73-95; doi:10.3390/resources2020073.
- Dimitrova, N., Nacheva, L. and Berova, M. 2016. Effect of meta-Topolin on the shoot multiplication of pear rootstock OHF-333 (*Pyrus communis* L.). *Acta Scientiarum Polonorum - Hortorum cultus* 15 (2): 43-53.
- Duong, T., Hong, L., Watanabe, H. Goi, M. Tanaka, M. 2003. Efficiency of a novel culture system by using light-emitting diode (LED) on *in vitro* and subsequent growth of micropropagated banana plantlets. *Acta Horti*. 616, 121–127
- Economou, A. and Read, P. 1987. Light treatments to improve efficiency of *in vitro* propagation systems. *HortScience* 22, 751-754.
- Folta, K., Koss, L., McMorrow, H. Kim, H., Kenitz, J., Wheeler, R., Sager, J. 2005. Design and fabrication of adjustable red-greenblue LED light arrays for plant research. *BMC Plant Biol.* 23, 5-17.
- Gandev, S. 2008. Extending the period for propagation of walnut (*Juglans regia* L.) by combining hot callusing, hypocotyl grafting and patch budding methods. *Vocarstvo*, 42: 49-53.
- Grout, B. and Ashton, M. 1978. Transplanting of cauliflower plants regenerated from meristem culture. II. Carbon dioxide fixation and the development of photosynthetic ability. *Hortic Res.* 17, 65-71.
- Gupta, S. and Jatothu, B. 2013. Fundamentals and applications of light-emitting diodes (LEDs) *in vitro* plant growth and morphogenesis. *Plant Biotechnol Rep.* 7, 211-220.
- Harrar, Y., Bellec, Y. Bellini, C. Faure, J. 2003. Hormonal control of cell proliferation requires *Pasticcino* genes. *Plant Physiol.* 132, 1217-1227.
- Hoenecke, M., Bula, R., Tibbitts, T. 1992. Importance of ‘blue’ photon levels for lettuce seedlings grown under red-lightemitting diodes. *HortScience* 27(5), 427-430.
- Kakani, A., G. Li, Z. Peng. 2009. Role of AUX1 in the control of organ identity during *in vitro* organogenesis and in mediating tissue specific auxin and cytokinin interaction in *Arabidopsis*. *Planta* 229, 645-657.
- Kim, H., Goins, G., Wheeler, R., Sager, C. 2004a. Green light supplementation for enhanced lettuce growth under red and blue light emitting diodes. *HortScience* 39, 1617-1622.
- Kim, H., Goins, G., Wheeler, R., Sager, J. 2004b. Stomatal conductance of lettuce grown under or exposed to different light qualities. *Ann Bot.* 94, 691-697.
- Kim, S., Hahn, E., Heo, W. 2004c. Effects of LEDs on net photosynthetic rate, growth and leaf stomata of chrysanthemum plantlets *in vitro*. *Sci. Horti*. 101,143-151.
- Klerk, D. G. J., W. Krieken, J. Jong. 1999. Review the formation of adventitious roots: New concepts, new possibilities. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant* 35, 189-199.
- Kulkarni, A., Kelkar, S., Watve, M. and Krishnamurthy, K. 2007. Characterization and control of endophytic bacterial contaminants in *in vitro* cultures of *Piper* spp., *Taxus baccata* subsp. *wallichiana*, and *Withania somnifera*. *Can. J. Microbiol.*, 53: 63–74.
- Kurilcik, A., Canova, M., Dapkuniene, S., Zilinskaite, S. Kurilcik, G., Tamulaitis, G., Duchovskis, P., Zukauskas, A. 2008. *In vitro* culture of *Chrysanthemum* plantlets using light emitting diodes. *Cent Eur J Biol* 3, 161-167.
- Li, H., Xu, Z., Tang, C. 2010. Effect of light-emitting diodes on growth and morphogenesis of upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) plantlets *in vitro*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 103, 155-163.
- Lian, M., Murthy, H., Paek, K. 2002. Effects of light emitting diodes (LED) on the *in vitro* induction and growth of bulblets of *Lilium oriental* hybrid ‘Pesaro’. *Sci Horti* 94, 365-370
- Magyar-Tabori, K., Dobranszki, J., Teixeira da Silva, J., Bulley, S., Hudak, I. 2010. The role of cytokinins in shoot organogenesis in apple. *Plant Cell Tiss Organ Cult.*, 101, 251–267.

- Merkle, S., Montello, P., Xia, X., Upchurch, B., Smith, D. 2005. Light quality treatments enhance somatic seedling production in three southern pine species. *Tree Physiol.* 26, 187-194.
- Montero-Calasan, M. C., C. Santamaría, M. Albareda, A. Daza, J. Duan, B. R. Glick, M. Camacho. 2013. Alternative rooting induction of semi-hardwood olive cuttings by several auxin-producing bacteria for organic agriculture systems. *Spanish Journal of Agricultural Research* 11, 146-154.
- Moyo, M., Finnie, J., Van Staden, J. 2011. Recalcitrant effects associated with the development of basal callus-like tissue on caulogenesis and rhizogenesis in *Sclerocarya birrea*. *Plant Growth Regul* 63, 187-195.
- Nacheva, L. and Gercheva, P. 2009. Micropropagation of Gisela 5 (Cherry Dwarf Rootstock): The effect of the type and the concentration of the carbohydrates in the nutrient medium. *Acta Hort. (ISHS)* 825:261-268.
- Nhut, D., Hong, L., Watanabe, H., Goi, M., Tanaka, M. 2000. Growth of banana plantlets cultured *in vitro* under red and blue light-emitting diode (LED) irradiation source. *Acta Hort.* 575, 7-23.
- Nhut, D., Takamura, T., Watanabe, H., Murakami, A., Murakami, K., Tanaka, M. 2002. Sugar-free micropropagation of *Eucalyptus citriodora* using light-emitting diode (LEDs) and film-rockwool culture system. *Environ Control Biol* 40, 147-155.
- Nhut, D., Takamura, T. and Watanabe, H. 2003. Responses of strawberry plantlets cul-tured *in vitro* under superbright red and blue light-emitting diodes (LEDs). *PlantCell Tissue Organ Cult.* 73(1), 43-52.
- Nhut, D., Takamura, T., Watanabe, H., Okamoto, K., Tanaka, M. 2005. Artificial light source using light-emitting diodes (LEDs) in the efficient micropropagation of *Spathiphyllum* plantlets. *Acta Hort.* 692, 137-142.
- Pacholczak, A., Szydło, W., Jacygrad, E., Federowicz, M. 2012. Effect of auxins and the biostimulator algaminoplant on rhizogenesis in stem cuttings of two dogwood cultivars (*Cornus alba* 'Aurea' and 'Elegantissima'). *Acta Scientiarum Polonorum Cultus* 11, 93-103.
- Pankaj, S.K.; Wan, Z.; Keener, K.M. Effects of Cold Plasma on Food Quality: A Review. *Foods* 2018, 7, 4. <https://doi.org/10.3390/foods7010004>
- Ponomarenko, S., Anishin, P., Babayants, O., Hrytsaenko, V., Terek, O., Wenxiu, H., Borovikov, Y., Nowick, W., Zhminko, P., Moiseeva, T. 2010. Bioregulation of plant growth and Development. In: Ponomarenko, S., Anishin, L. (ed). *New plant growth regulators: basic research and technologies of application*. Kyiv: Nichlava p. 14.
- Pospíšilová, J., Catsky, J., Sestak, Z. 1996. Photosynthesis in plants cultured *in vitro*. In: *Handbook of photosynthesis*, eds. M. Pessarakli, N. Dekker, NY.
- Poudel, P., Kataoka, I., Mochioka, R. 2008. Effect of red- and blue-light-emitting diodes on growth and morphogenesis of grapes. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 92,147-153.
- Reed, B. 1995. Screening Pyrus Germplasm for *in vitro* Rooting Response. *HortScience* 30, 1292-1294.
- Reed, B., Sarasan, V., Kane, M., Bunna, E., Pence, V. 2011. Biodiversity conservation and conservation biotechnology tools. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 47, 1-4.
- Sarasan, V., Cripps, R., Ramsay, M., Atherton, C., Mcmichen, M., Prendergast, G., Rowntree, J. 2006. Conservation *in vitro* of threatened plants-progress in the past decade. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 42, 206-214.
- Seabrook, J. 2005. Light effects on the growth and morphogenesis of potato (*Solanum tuberosum*) *in vitro*: A review. *Am. J. Pot Res* 82, 353-367. <https://doi.org/10.1007/BF02871966>.
- Semorádová, Š., Synková, H., Pospíšilová, J. 2002. Responses of tobacco plantlets to changes of irradiance during transfer from *in vitro* to *ex vitro* conditions. *Photosynthetica*, 40, 605-614.
- Smulders, M. and De Klerk, G. 2011. Epigenetics in plant tissue culture. *Plant Growth Regul.* 63, 137-146
- Strnad, M., Hanus, J., Vanek, T., Kaminek, M., Ballantine, J., Fussell, B., Hanke, D. 1997. *Meta*-topolin, a highly active aromatic cytokinin from poplar leaves (*Populus canadensis* Moench, cv. Robusta). *Phytochemistry*, 45, 213-218.
- Stryczewska, H. 2020. Supply Systems of Non-Thermal Plasma Reactors. *Construction Review with Examples of Applications. Appl. Sci.* 2020, 10, 3242. <https://doi.org/10.3390/app10093242>
- Strobel, G., Stierle A. and Stierle D. 2001. Taxol production by a microbe. US Patent: 6,329,193.
- Shin, S., Murthy, N., Heo, W., Hahn, J., Paek, Y. 2008. The effect of light quality on the growth and development of *in vitro* cultured *Doritaenopsis* plants. *Acta Physiol Plantae* 30, 339-343.
- Yeh, H. and Chung, J. 2009. High-brightness LEDs-energy efficient lighting sources and their potential in indoor plant cultivation. *Renew Sust Energy Rev* 13, 2175-2180.

- Vasil, I. 2008. A history of plant biotechnology: from the cell theory of Schleiden and Schwann to biotech crops. *Plant Cell Rep.*, 27, 1423-1440.
- Wallaart, R. 1980. Distribution of sorbitol in Rosaceae. *Phytochemistry*, 19: 2603-2610.
- Werbrouck, S. 2010. Merits and drawbacks of new aromatic cytokinins in plant tissue culture. *Acta Hortic.* 865, 103-108
- Werbrouck, S., Strnad, M. Van Onckelen, H. Debergh, P. 1996. *Meta*-topolin, an alternative to benzyladenine in tissue culture. *Physiol. Plant.* 98, 291-297.
- Woedtke, T., Schmidt, A., Bekeschus, S., Wende, K., Weltmann, K. 2019. Plasma Medicine: A Field of Applied Redox Biology. *In Vivo* July 2019, 33 (4) 1011-1026; DOI:<https://doi.org/10.21873/invivo.11570>
- Ziv, M. 1991. Vitrification: morphological and physiological disorders of *in vitro* plants. In: Debergh, P and Zimmerman, R. (eds) *Micropropagation: Technology and Application*, 45-69. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.