

**MINISTERUL EDUCAȚIEI CULTURII ȘI CERCETĂRII**

**GRĂDINA BOTANICĂ NAȚIONALĂ (INSTITUT)  
„ALEXANDRU CIUBOTARU”**

Cu titlu de manuscris

C.Z.U: 581.14/.16:634.717(478)(043.2)

**LOZINSCHII MARIANA**

**MORFOBIOLOGIA ȘI MICROPROPAGAREA SOIURILOR DE  
MUR FĂRĂ SPINI ÎN REPUBLICA MOLDOVA**

**164.01 – BOTANICA**

Autoreferatul tezei de doctor în științe biologice

**CHIȘINĂU, 2019**

Teza a fost elaborată în Laboratorul de Embriologie și Biotehnologie al Grădinii Botanice Naționale (Institut) „Alexandru Ciubotaru”

Conducător științific:

**CIORCHINĂ Nina**, doctor în științe biologice, conferențiar cercetător.

Consultant științific:

**CALALB Tatiana**, doctor habilitat în științe biologice, conferențiar universitar.

#### Referenți oficiali:

**Pîntea Maria** – doctor habilitat în științe biologice, conferențiar cercetător, Institutul Științifico-Practic de Horticultură și Tehnologii Alimentare

**Bucațel Vasile** – doctor în științe biologice, conferențiar cercetător, Grădina Botanică Națională (Institut), „Alexandru Ciubotaru”.

#### Componenta consiliului științific specializat:

**Postolache Gheorghe**, președinte, doctor habilitat în științe biologice, prof. univ.,

**Colțun Maricica**, secretar științific, doctor în științe biologice, conf. cercetător,

**Grati Vasile**, doctor habilitat în științe biologice, prof. univ.,

**Șalaru Victor**, doctor habilitat în științe biologice, prof. univ.,

**Celac Valentin**, doctor habilitat în științe biologice, conf. cercetător,

**Roșca Ion**, doctor în științe biologice, conf. cercetător,

**Ghendov Veaceslav**, doctor în științe biologice, conf. cercetător,

**Comarova Galina**, doctor în științe biochimice, prof. univ.

Susținerea va avea loc la 15 martie, ora 10<sup>00</sup>, în ședința Consiliului științific specializat, D 164.01-06 din cadrul Grădinii Botanice Naționale (Institut) „Alexandru Ciubotaru” a Ministerului Educației Culturii și Cercetării, or. Chișinău, str. Pădurii, 18.

Teza de doctor și autoreferatul pot fi consultate la biblioteca Grădinii Botanice Naționale (Institut) „Alexandru Ciubotaru” și pe pagina web a ANACEC

#### Autoreferatul a fost expediat la 15 februarie 2019

Secretar științific al Consiliului științific specializat,

**Colțun Maricica**, doctor în științe biologice, conferențiar cercetător

Conducător științific:

**CIORCHINĂ Nina**, doctor în științe biologice, conferențiar cercetător.

Consultant științific:

**CALALB Tatiana**, doctor habilitat în științe biologice, conferențiar universitar.

Autor

**Lozinschii Mariana**

©Lozinschii Mariana, 2019

## REPERE CONCEPTUALE ALE CERCETĂRII

**Actualitatea cercetărilor.** Republica Moldova produce o cantitate impunătoare de fructe (mere, prune, caise, pere etc.), dar necesitatea în fructe de mur, considerate importante pentru alimentația sănătoasă și echilibrată, care conform OMS, constituie un component alimentar important cu proprietăți antioxidante, antiradiante, vitaminoase, rămâne actuală [7, 17]. Extinderea diversității culturilor pomicele poate fi efectuată prin introducerea în cultură a unor soiuri productive, provenite de la specia *Rubus fruticosus* L.: ‘Arapaho’, ‘Triple Crown’, ‘Loch Ness’, ‘Black Satin’, ‘Polar’, ‘Chester’, ‘Thornfree’, ‘Smoothstem’, ‘Reuben’, inclusiv a soiului ‘Thornless Evergreen’, în baza speciei *R. laciniatus* Willd [16]. Studiarea particularităților de dezvoltare ale acestor culturi și determinarea cerințelor față de factorii ecologici, ar constitui o posibilitate de a le introduce pe sectoare de producere în agricultura Republica Moldova [1]. În ultimele decenii pentru a satisface necesitățile crescânde ale populației în fructele de mur, se investește în ameliorarea genotipurilor de mur cu caracteristici biologice valoroase, adaptate la tehnologii moderne de creștere, cu proprietăți gustative și terapeutice înalte [11].

**Situația în domeniul de cercetare.** Fructele soiurilor de mur pot servi ca aliment sănătos și o sursă reală de materie primă pentru industria alimentară și farmaceutică [14, 16]. Astăzi sunt oportune lucrările științifice complexe și de cooperare ale specialiștilor din diferite domenii de activitate pentru extinderea soiurilor de mur în practica agricolă națională [5, 12]. R. Moldova este la o etapă incipientă în domeniul dezvoltării sectorului de pomușoare. Organizațiile „Pomușoarele Moldovei”, „Agricultura performantă în Republica Moldova”, „Centrul de consultanță în afaceri”, proiectul „Îmbunătățirea productivității în cultivarea arbuștilor fructiferi și a căpșunului” contribuie substanțial la susținerea și dezvoltarea acestui domeniu. Unul din obiectivele principale ale acestor organizații este asistența producătorilor, privind tehnologiile moderne de producere a materialului săditor, prin suport informațional specializat. Dezvoltarea sectorului de pomușoare din R. Moldova generează o cerere mare a materialului săditor, calitatea căruia influențează productivitatea plantelor. Sectorul de pomușoare, în special cultura murului, este foarte atractiv, suprafețele de plantații cresc an de an. Pentru dezvoltarea și susținerea pepinierelor de arbuști fructiferi, care comercializează soiuri autorizate de pomușoare performante și potrivite condițiilor climatice ale R. Moldova, o soluție ar fi multiplicarea plantelor prin microtehnici *in vitro*, care asigură obținerea culturilor sănătoase și viguroase într-o perioadă de timp mai redus, decât prin metode tradiționale.

Datorită conținutului sporit în compuși chimici naturali, fructul de mur este un produs înalt apreciat și frecvent solicitat, atât pe piața autohtonă, cât și cea mondială [14, 17]. În R. Moldova sunt solicitate soiurile de mur fără spini, rezistente la îngheț, secetă și cu diferite

perioade de coacere a fructelor, în special timpurie. Alte criterii de apreciere al fructelor de mur sunt fermitatea, productivitatea, aspectul și gustul. Cultivarea soiurilor de mur fără spini în R. Moldova, va contribui la dezvoltarea industriei, alimentare, farmaceutice și cosmetice bazate pe materie primă locală de calitate.

**Problema de cercetare:** analiza situației din domeniu constă în testarea, selectarea și introducerea în cultură a unor soiuri productive de mur fără spini și înmulțirea lor prin vitroplantule.

**Scopul tezei:** Elaborarea biotehnologiilor de micropropagare și microclonare ale soiurilor de perspectivă de mur fără spini și studiul biomorfologic în condițiile pedoclimatice ale Republicii Moldova.

Pentru realizarea acestui scop au fost trasate următoarele **obiective:**

1. Identificarea soiurilor de mur donatoare de explanți pentru inițierea culturilor *in vitro*.
2. Testarea factorilor biologici, fizici și chimici pentru cultura *in vitro* la soiurile de mur introduse. Elaborarea formulelor mediilor nutritive optime pentru calusogeneza și morfogeneza (caulogeneza, rizogeneza) fiecărui soi.
3. Studiarea particularităților biologice ale vitroplantulelor obținute la soiuri de mur, determinarea condițiilor de aclimatizare în seră și de inițiere a plantațiilor în teren.
4. Studiul anatomic și biochimic comparativ (flavonoide, taninuri, acid ascorbic) la soiurile de mur.
5. Elaborarea schemei tehnologice de micropropagare a materialului săditor la soiurile de mur de perspectivă și contribuția la fortificarea genofondului GBNI (crearea colecției de soiuri de mur).

#### **Noutatea științifică a rezultatelor obținute**

S-a elaborat schema tehnologiei de microclonare *in vitro* a materialului săditor necontaminat și uniform. S-au testat și selectat soiurile de mur fără spini, rezistente la condițiile pedoclimatice ale R. Moldova, cu calități tehnologice valoroase pentru înființarea plantațiilor industriale. S-au optimizat microtehnicile de cultivare *in vitro* ale calusogenezei și organogenezei la soiuri de mur fără spini de perspectivă. S-au obținut plantule de mur din masă calusală generată din fragmente de frunză iar plantulele au fost cultivate în condițiile *in vitro* și *ex vitro*.

S-a determinat complexul de structuri anatomice cu caracter diagnostic pentru identificarea soiurilor de mur fără spini. Au fost identificate structurile anatomice cu potențial adaptiv la condițiile pedoclimatice ale R. Moldova. Au fost determinate caracteristicile

biochimice (flavonoide, taninuri, acid ascorbic) în frunzele și fructele speciilor și soiurilor de mur.

**Problema științifică importantă soluționată** constă în *elaborarea tehnologiei* de obținere *in vitro* a materialului săditor sănătos și omogen la soiurile de mur fără spini ‘Arapaho’, ‘Triple Crown’, ‘Loch Ness’, ‘Black Satin’, ‘Polar’, ‘Chester’, ‘Thornfree’, ‘Smoothstem’, ‘Reuben’, ‘Thornless Evergreen’ de perspectivă pentru R. Moldova, *care a permis înființarea* de plantații moderne în R. Moldova cu materialul săditor obținut prin cultura *in vitro* și crearea în GBNI a colecției din 10 soiuri de mur. Rezultatele obținute au determinat *evidențierea și recomandarea* soiurilor valoroase de mur fără spini, cu potențial adaptiv la condițiile climatice ale R. Moldova.

**Importanța teoretică.** Rezultatele experimentelor biotehnologice au confirmat noțiunea de bioentitate organospecifică, bazată pe principiul totipotentei celulare în culturile *in vitro* pentru regenerarea vitroplantulelor (prin organogeneză și embriogeneză somatică).

**Valoarea aplicativă a cercetărilor.** A fost elaborată schema biotehnologică de obținere a materialului săditor sănătos și omogen la soiuri de mur fără spini de perspectivă pentru R. Moldova. Rezultatele cercetărilor sunt utilizate în Laboratorul de Embriologie și Biotehnologie a GBNI. Materialul săditor obținut a servit ca sursă pentru a iniția colecția din 10 soiuri de mur din GBNI: ‘Loch Ness’, ‘Chester’, ‘Arapaho’, ‘Triple Crown’, ‘Polar’, ‘Black Satin’, ‘Thornfree’, ‘Smoothstem’, ‘Reuben’ și ‘Thornless Evergreen’. Plantele de mur multiplicare *in vitro* au fost utilizate în calitate de material săditor pentru înființarea plantațiilor de mur pe arii extinse în R. Moldova.

**Aprobarea rezultatelor.** Rezultatele tezei au fost publicate în 23 de lucrări științifice, inclusiv 7 în reviste recenzate. Comunicările științifice au fost prezentate și aprobate în rapoartele anuale ale consiliului științific al GBNI în perioada studiilor doctorale (2013-2016). Rezultatele obținute au fost relatate în cadrul conferințelor științifice internaționale: Международная Научная Конференция. к 200-летию НБС, "Роль Ботанических Садов в Сохранении Разнообразия Растений", Ялта, Украина; 2012. Юбилейная Международная Научно-Практическая Конференция, посвященная 100-летию Ботанического Сада, Батуми, 2013; 12<sup>th</sup> International Symposium “Prospects for the 3<sup>th</sup> Millennium, Agriculture”, Cluj-Napoca, România, 2013; International Symposium "Conservation of plant diversity", 3 edition, Chisinau, 2014; Conferința Științifică Internațională a Doctoranzilor: "Tendințe contemporane ale dezvoltării științei: Viziuni ale Tinerilor Cercetători", ediția a III-a, Chișinău 2014, ediția a IV-a, 2015, ediția a V-a, 2016; International Symposium, dedicated to the 65<sup>th</sup> anniversary of the Botanical Garden (Institute) of the Academy of Sciences of Moldova

„Conservation of Plant Diversity”, Chișinău, 2015; Conferința națională cu participare internațională ”Știința în Nordul Republicii: realizări, probleme, perspective” (ediția a II-a) Bălți, 2016; Simpozionul științific „Conservarea diversității plantelor *in situ* și *ex situ*”, Iași, 2016; Simpozionul național cu participare internațională, „Biotehnologii avansate” – Realizări și Perspective ediția a IV-a, Chișinău 2016; International Symposium "Conservation of plant diversity", 5<sup>th</sup> edition, Chisinau, 2017.

## CONȚINUTUL LUCRĂRII

### 1. ISTORICUL, ORIGINEA ȘI TEHNOLOGIILE DE CULTIVARE *IN VITRO* A GENULUI *RUBUS* L.

#### 1.1. Etimologia și scurt istoric al taxonilor

Genul *Rubus* L. face parte din familia *Rosaceae*. Numele derivă de la cuvântul latin „*ruber*” ceea ce înseamnă roșu. Acest gen cuprinde zmeurul, murul și alte specii producătoare de fructe de tip polidrupă, deseori numite pomușoare. Fructele sunt cărnoase, imature – roșii și acrișoare, ulterior negricioase și dulci la coacere [16, 17]. Genul *Rubus* cuprinde multe specii arbustive și subarbustive cu tulpinile prevăzute cu ghimpi. Fructele de pădure au constituit primul aliment pentru om încă de la începutul evoluției sale, iar murul a fost întrebuințat în Europa încă din antichitate. Obținerea și selecția soiurilor de mur, hibridizarea și introducerea lor în cultură au o istorie nu prea lungă. Soiuri noi ce aparțin genului *Rubus* au fost înregistrate în America de Nord încă la începutul anilor 1800, ulterior cele de perspectivă au cucerit țările europene și asiatice.

#### 1.2. Tehnologii de multiplicare și cultivare a soiurilor de mur de perspectivă

Lucrări științifice privind micropropagarea *in vitro* a murului în literatura din domeniu, sunt limitate [9, 15]. În prezent, metoda culturii tisulare și celulare *in vitro* a creat o posibilitate reală pentru obținerea unui material săditor de calitate înaltă [13]. Biotehnologia *in vitro* aplicată, [2, 3] are un rol important în obținerea materialului săditor sănătos, omogen și în cantități nelimitate pentru înființarea plantațiilor industriale contemporane. S-a constatat, că toate tipurile de celule pot fi cultivate pe medii nutritive artificiale în laborator [4]. Cultivarea *in vitro* a celulei vegetale este capabilă să regenereze o plantă nouă, bazată pe totipotență, ce stă la baza biotehnologiilor moderne de multiplicare a materialului săditor în agricultura modernă.

Cultura de țesuturi *in vitro*, aplicată la mur, s-a dovedit a fi o cale eficientă și rapidă de obținere a materialului săditor în R. Moldova [13]. Această tehnică este utilizată în special când materialul biologic micropropagat este bine selectat și lipsit de virusuri [4-6]. Micropropagarea murului constă în fragmentarea lăstarilor proliferați din mugurii apicali și axilari. Această tehnică este cea mai eficientă metodă pentru proliferarea rapidă și evită variația somaclonală [3].

## 2. CARACTERISTICA MATERIALULUI BIOLOGIC ȘI METODE DE INVESTIGAȚIE

În calitate de material biologic au servit soiurile speciei *Rubus fruticosus* L. (agsp.): ‘Arapaho’, ‘Triple Crown’, ‘Loch Ness’, ‘Polar’, ‘Black Satin’, ‘Reuben’, ‘Chester’, ‘Thornfree’, ‘Smoothstem’ și soiul ‘Thornless Evergreen’ care provine de la specia *R. laciniatus* Willd. Toate soiurile au origine americană, excepție constituie soiurile ‘Polar’ de origine poloneză și ‘Loch Ness’ de origine scoțiană. Prin colaborare în cadrul proiectului bilateral a fost făcut schimbul de material biologic de la Stațiunea de Cercetare și Dezvoltare în Pomicultură din orașul Cluj-Napoca și USAMV, România.

Cercetările de micropropagare, microclonare *in vitro*, aclimatizarea vitroplantulelor au fost efectuate în Laboratorul de Embriologie și Biotehnologie al GBNI. Studiile biomorfologice au fost realizate în seră și pe lotul experimental al GBNI, care a stat la baza înființării colecției (10 soiuri de mur fără spini). Studiul anatomic și biochimic al unor clase de compuși (flavonoide, taninuri, acid ascorbic) a fost efectuat la Catedra de farmacognozie și botanică farmaceutică a USMF “Nicolae Testemițanu”.

**Pregătirea materialului vegetativ și prelevarea explantului.** Au fost selectate microtehnicele și reagenții sterilizanți, au fost determinate condițiile optime de prelevare a explanților (meristeme apicale, muguri apicali și axilari, fragmente de limb foliar) și de sterilizare, păstrând viabilitatea celulară.

**Compoziția și prepararea mediilor nutritive.** Prin multiple experimentări biotehnologice au fost elaborate și testate medii nutritive pentru creșterea și dezvoltarea culturii *in vitro* la speciile genului *Rubus* și a soiurilor luate în cercetare. Ulterior, au fost selectate și testate 25 medii nutritive, MS suplinite cu doze (0,1-2,0 mg/l) a diferitor regulatori de creștere (auxinici, citochininici, giberilnici) pentru inițierea calusogenezei *in vitro*, obținerea organogenezei din calus, micropropagare și multiplicare. Procesele de dezvoltare *in vitro* sunt dirijate, în special, de doza și coraportul regulatorilor de creștere administrați în mediu nutritiv de bază MS.

## 3. MICROPROPAGAREA ȘI DEZVOLTAREA *IN VITRO* A SOIURILOR VALOROASE DE MUR FĂRĂ SPINI

Pentru evidențierea caracteristicilor biologice și tehnice, în investigațiile științifice comparative, au fost mobilizate soiurile introduse de mur inaculeate ‘Arapaho’, ‘Triple Crown’, ‘Black Satin’, ‘Reuben’, ‘Chester’, ‘Thornfree’, ‘Smoothstem’ de origine americană,

‘Polar’ — origine poloneză, ‘Loch Ness’ – origine scoțiană provenite de la specia *R. fruticosus* L., și soiul ‘Thornless Evergreen’ al speciei *R. laciniatus*, familia *Rosaceae* [16].

### **3. 1. Inițierea culturilor avirotice de mur**

Pentru inițierea culturilor *in vitro* a fost prelevat materialul biologic de la plantele de mur. Materialul în condiții de laborator a fost supus procedurilor de aseptizare primară, după care s-au transferat în încăperi aseptice pentru aseptizarea propriu zisă și inocularea pe medii nutritive [13]. Pentru inițierea vitroculturilor de mur surse de explanți au servit: meristeme apicale cu primordii ale lăstarilor și meristeme laterale cu primordii.

Pentru a eficientiza aseptizarea materialului biologic au fost testați mai mulți agenți sterilizanți: hipocloritul de sodiu comercial, alcoolul etilic, clorura de mercuriu. Sterilizantul optim a fost clorura de mercuriu 0,1%, care asigură rata de viabilitate a plantulelor 75%. Condițiile de utilizare a clorurii de mercuriu (0,1%) în calitate de reagent aseptice sunt: 7 minute de expunere – meristeme apicale și laterale succesată de 3 clătiri cu apă autoclavată și soluție de 3% de peroxid de hidrogen (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Pentru inițierea culturilor, pe mediu MS modificat (acid ascorbic și BAP) au fost inoculate câte 36 fitoinoculi de fiecare tip de explant, la fiecare soi în trei repetări.

### **3.2. Morfogeneza *in vitro* la soiurile de mur**

Morfogeneza *in vitro* este un proces morfoanatomic și fiziologic complex, asociat cu fenomenul de diferențiere, din care rezultă constituirea unui organism integru [3]. Au fost testate diferite tipuri de explante prelevate de la vitroculturile de mur, utilizate în calitate de material biologic de inițiere a calusului. Rezultate eficiente s-au obținut pentru explantele din frunză, colectate de la plantule crescute *in vitro*. Inoculii s-au fragmentat în formă de triunghi cu dimensiuni 0,6-0,8 mm, inoculate pe medii nutritive, astfel partea abaxială și cele laterale ale limbului fiind în contact cu mediul nutritiv. Acest experiment a fost efectuat în 3 repetări, la 10 soiuri de mur (‘Arapaho’, ‘Triple Crown’, ‘Loch Ness’, ‘Polar’, ‘Black Satin’, ‘Reuben’, ‘Chester’, ‘Thornfree’, ‘Smoothstem’, ‘Thornless Evergreen’) a câte 36 probe. Mediile nutritive pentru calusogeneză și organogeneză au fost preparate conform metodelor de specialitate [3, 4]. Mediul de bază pe care s-au plasat fragmentele de limb foliar MS 100% modificat, cu 5 g/l agar, 25 g/l zaharoză, pH 6,0, suplinit cu diferite doze de regulatori de creștere. Pentru obținerea calusului regenerant, 15 variante de medii nutritive s-au suplinit cu diferite concentrații de auxine și citochinine în diferite combinații și proporții: BAP (2,0 mg/l; 1,50 mg/l; 1,0 mg/l); BAP 1,0 mg/l+ANA (0,2 mg/l; 0,5 mg/l; 1,0 mg/l); BAP 1,0 mg/l+AIA (0,2 mg/l; 0,5 mg/l; 1,0 mg/l); KIN (1,50 mg/l; 1,0 mg/l); KIN 1,0 mg/l+ANA 0,1 mg/l; 2,4-D (0,5 mg/l; 0,75 mg/l; 1,0 mg/l). Condițiile optime pentru menținerea culturilor calusale *in vitro* la soiurile cercetate au fost



temperatura  $23 \pm 2$  °C, fotoperiodismul de 16 ore lumină, 8 ore obscuritate și umiditatea aerului în încăperea nu mai joasă de 65%.

### **Calusogeneza**

Perioada de calusogeneză și a fazelor componente corelează cu natura țesutului și apartenența sistematică a taxonului antrenat în cultura *in vitro*. Prin experimentare biotehnologică a fost determinată durata perioadei de calusogeneză și organogeneză din frunzele prelevate de la vitroculturile de mur. Inițierea și dezvoltarea proeminențelor de celule calusale pe toate mediile de cultură s-a constatat după 5 zile de la inoculare. În rezultatul cercetărilor efectuate asupra dezvoltării calusului pe mediile menționate s-a demonstrat, că toate au proliferat masă calusală, însă nu tot a fost morfogen. Regulatorul de creștere cu cele mai bune rezultate în inducerea calusului a fost BAP (2,0 mg/l; 1,50 mg/l; 1,0 mg/l). Alt regulator care a generat calus a fost 2,4-D (1 mg/l în combinație cu KIN 1 mg/l). Calusul dezvoltat din limb foliar pe toate mediile testate, suplinite cu alți regulatori, variază ca formă, culoare, consistență, în dependență de tipul regulatorului de creștere, precum și doza, cantitatea cu care mediul nutritiv a fost suplimentat. Pe mediile nutritive MS 100%, cu adaos BAP (1,0 mg/l și 1,5 mg/l) după 11 zile de la plasarea pe mediile cercetate, fragmentele de limb foliar au devenit gofrate și s-au extins în dimensiuni, manifestând o diferențiere a calusului de culoare alb-verzuie, translucid și cu o consistență mai laxă. Acest calus s-a dovedit a fi non-morfogen și constă din celule mari și vacuolizate. Pe mediile suplimentate cu citochinina BAP, în combinații cu auxine (BAP 1,0 mg/l+ANA (0,2 mg/l; 0,5 mg/l; 1,0 mg/l); BAP 1,0 mg/l+AIA (0,2 mg/l; 0,5 mg/l; 1,0 mg/l); calusul derivat este albicios, unele conglomerate de celule fiind de culoare alb-lăptoasă, cu consistență friabilă, în totalitate non-morfogen, după 35-40 zile necrozează. Mediile suplinite cu 2,4-D în diferite concentrații (0,5 mg/l; 0,75 mg/l; 1,0 mg/l) prezintă un efect inhibitor non-regenerant, ceea ce și confirmă datele din literatura de specialitate [15]. Pe mediile suplinite cu citochinina KIN (1,50 mg/l; 1,0 mg/l); KIN 1,0 mg/l+ANA 0,1 mg/l; variantele experimentale nu au dat răspuns morfogen pozitiv. Un număr redus de probe (2%) după 35-40 zile au devenit cu productivitatea sporită în masă calusală de culoare alb-verzuie și galben-brun cu o consistență calusală preponderent friabilă, non-morfogenă.

### **Organogeneza**

Mediul nutritiv Nr. 1, suplinit cu BAP (2,0 mg/l) a provocat calus morfogen și procesul organogen s-a inițiat după 30 de zile de la inocularea fragmentelor de limb foliar. S-a constatat, că centrele morfogene se află la suprafața masei calusale, iar la periferii sunt protejate de celulele parenchimatice ale calusului cu pereții puțin îngroșați. Plantulele din fragmente de limb foliar se formează pe calusul inițiat pe fragmentele din frunze după 30 de zile de la inoculare. Rezultatele

cercetărilor asupra calusului morfogen, inițiat din fragmente de limb foliar, au arătat că din masa calusală derivă meristemoizi din care se dezvoltă tulpina și frunza. Pentru o dezvoltare completă a plantulelor, meristemoizii sunt transferați pe mediu nutritiv MS modificat, proaspăt pregătit.

Dintre soiurile cercetate se evidențiază soiurile ‘Chester’ cu un număr de 10,02 plantule iar ‘Black Satin’ – 9,4 plantule din explantul de limb foliar. Soiurile ‘Triple Crown’ și ‘Smoothstem’ au generat 8 plantule per explant. Cu 7,5 plantule generate s-au evidențiat fragmentele de limb ale soiurilor ‘Thornless Evergreen’ și ‘Arapaho’, iar cu 6,5 plantule generate – soiul ‘Loch Ness’. Un număr mai redus de plantule au generat soiurile ‘Polar’ și ‘Reuben’ (6,2 și 6,3 explanți per limb). Plantulele obținute din masă calusală, pe mediul suplinit cu BAP (2,0 mg/l), sunt sănătoase, robuste, viguroase, nu se contaminatează în cultura *in vitro* după pasări ulterioare și nici la transfer *ex vitro*. În decurs de 7 zile se formează un sistem radicular bine dezvoltat, iar tulpina din câteva internoduri. Dezvoltarea acestor plantule depășește cu 50% creșterea și formarea rizogenezei, comparativ cu plantele obținute tradițional din meristeme prin micropropagare. Aceste date confirmă faptul că plantule inițiate din masă calusală sunt avirolice și au un potențial mai mare de regenerare și dezvoltare la primele pasări, comparativ cu plantulele obținute din țesut meristematic.

### 3.3. Micropropagarea și multiplicarea *in vitro*

#### 3.3.1. Elaborarea și testarea mediilor nutritive eficiente pentru inocularea, creșterea, dezvoltarea, menținerea și înrădăcinarea explanților

Înmulțirea *in vitro* a plantelor de multiplicare vegetativă asigură obținerea unui randament superior, în comparație cu alte procedee practicate până în prezent [3, 5, 6,]. Au fost elaborate și testate 35 variante de medii nutritive, fiind selectate 11 variante optime și eficiente pentru multiplicare și microclonare și 4 variante de medii nutritive pentru inocularea explantelor (Tabelul 3.1).

Tabelul 3.1 Medii nutritive eficiente în regenerarea și multiplicarea murului

Nr. d/o	Medii nutritive testate		
	Inițierea plantulelor	Microclonarea	Rizogeneza plantulelor
1.	MS 100%	BAP (0,3; 0,5; 0,7 mg/l).	MS 50%
2.	MS+AIA 0,1 mg/l	BAP+AIB+GA <sub>3</sub> ,	MS 100%
3.	MS+ANA 0,1 mg/l	BAP+AIA+GA <sub>3</sub>	MS AIA 0,2 mg/l
4.	MS+BAP (0,1; 0,3; 0,5 mg/l)	BAP+ANA+AG <sub>3</sub> )	MS AIB 0,2 mg/l
5.	-	-	MS ANA 0,2 mg/l

Mediile nutritive pentru multiplicarea fost suplinate cu diferite concentrații de citochinine (0,3; 0,5; 0,7 mg/l); suplinate cu auxine (0,2 mg/l), giberiline (0,1 mg/l) au fost

utilizate balanțe ale regulatorilor de creștere cu combinații de citochinine, auxine și giberiline. Au fost testate mediile MS 100% modificat și MS 50% (cantitatea de vitamine, micro-, macroelemente înjumătățită) lipsite de regulatori de creștere. Pentru rizogeneza micropropagulelor a fost utilizat mediul lichid MS în două variante experimentale: 100% și 50%. Astfel, în dependență de scopul propus au fost utilizate următoarele medii: 1) Pentru inițierea culturii *in vitro* la soiurile aflate în studiu; 2) Medii pentru microclonare (proliferarea lăstarilor); 3) Medii pentru rizogeneza plantulelor.

### **3.3.2. Influența regulatorilor de creștere asupra procesului de multiplicare**

Pentru inițierea și optimizarea morfogenezei au fost analizate o gamă variată de medii nutritive. Mediul de bază pentru inducerea morfogenetică este mediul MS, adăugat cu 30 g/l zaharoză, BAP 0,5 mg/l, agar 5 g/l și pH-ul 5,8. Pentru creștere și multiplicare eficientă s-a folosit MS suplinit de regulator de creștere. Toate soiurile de mur luate în cercetare, au fost micropropagate pe mediul de bază MS 100% cu adaos de regulatori de creștere BAP, AIB, ANA, AIA, AG<sub>3</sub>. Pentru determinarea potențialului de înrădăcinare la soiurile luate în studiu s-au folosit diferite medii nutritive și procedee: 1. Înrădăcinarea în condiții aseptice pe medii nutritive, fără regulatori de creștere; 2. Utilizarea mediului nutritiv MS, suplimentat cu regulatori de creștere. În calitate de suport, explantele (plantulele), se amplasează pe punți din hârtie de filtru, astfel încât, partea bazală a tulpinii să fie încorporată în soluție, maxim 1,0 cm.

### **3.3.3. Microclonarea**

Microclonarea este faza în care se urmărește proliferarea și dezvoltarea mugurilor laterali, adventivi și regenerarea rapidă a lăstarilor [8]. Lăstarii de mur, care ating dimensiuni de 2,0-2,5 cm, pot fi utilizați pentru: trecerea la faza de înrădăcinare și în calitate de sursă de explant la alte subcultivări. Raportul dintre numărul de lăstari supuși multiplicării și cei obținuți la sfârșitul fazei reprezintă rata de multiplicare, care este în corelație cu compoziția substratului, doza și tipul regulatorului de creștere.

**Substratul de cultură.** În Laboratorul de Embriologie și Biotehnologie au fost testate mai multe medii nutritive în scopul optimizării lor pentru declanșarea procesului de morfogeneză. Mediul de bază pentru inducerea morfogenetică este mediul MS, suplimentat cu 30 g/l zahăr alimentară, 5 g/l de agar și pH 5,6-5,8.

**Regulatori de creștere.** Mediul MS modificat, lichid (lipsit de agar), suplinit cu regulatori de creștere a fost eficient în procesul de multiplicare la mur. Rezultate bune s-au obținut în cazul suplinirii cu doze (0,3; 0,5; 0,7 mg/l) de BAP. S-au testat și doze mai mari de citochinină (0,9 și 1,0 mg/l), însă ele provoacă creșterea neomogenă a lăstarului. Rezultatele denotă că creșterea cea mai bună a fost pe MS suplinit cu BAP 0,5 mg/l. Pe acest mediu au fost

micropropagate toate soiurile de mur. Rezultate eficiente s-au obținut la toate soiurile de mur, deosebirea constă doar în numărul de lăstari obținuți și vigurozitatea acestora. Cu cât numărul de lăstari formați per inocul este mai mare, cu atât vigurozitatea explantului este mai mică. Astfel au fost selectate pentru microclonare dozele optime de BAP (0,3; 0,5; 0,7 mg/l). Pe mediul cu o concentrație de BAP (0,3 mg/l), numărul cel mai mare de lăstari s-a atestat la soiul ‘Loch Ness’ (16 lăstari per explant inoculat). Soiurile ‘Triple Crown’ și ‘Polar’ au proliferat pe acest mediu 15 lăstari per explant, fiind urmate de soiul ‘Smoothstem’, Chester’ și ‘Arapaho’ cu 14 lăstari. Tot pe acest mediu soiurile ‘Thornless Evergreen’ și ‘Thornfree’ generează 12 lăstari per explant, ‘Black Satin’ – 13. Cele mai eficiente rezultate de multiplicare pe mediul suplinit cu BAP 0,5 mg/l au fost pentru soiurile ‘Loch Ness’ cu 29 lăstari proliferați și 24 la soiul ‘Polar’. Soiul de mur ‘Smoothstem’ generează în mediu 23 lăstari, fiind urmat de soiul ‘Chester’ cu 22 lăstari adventivi per explant. Soiurile ‘Arapaho’ și ‘Thornless Evergreen’ generează în mediu 19 lăstari adventivi, pe când soiul ‘Triple Crown’ 21 lăstari (Figura 3.2).

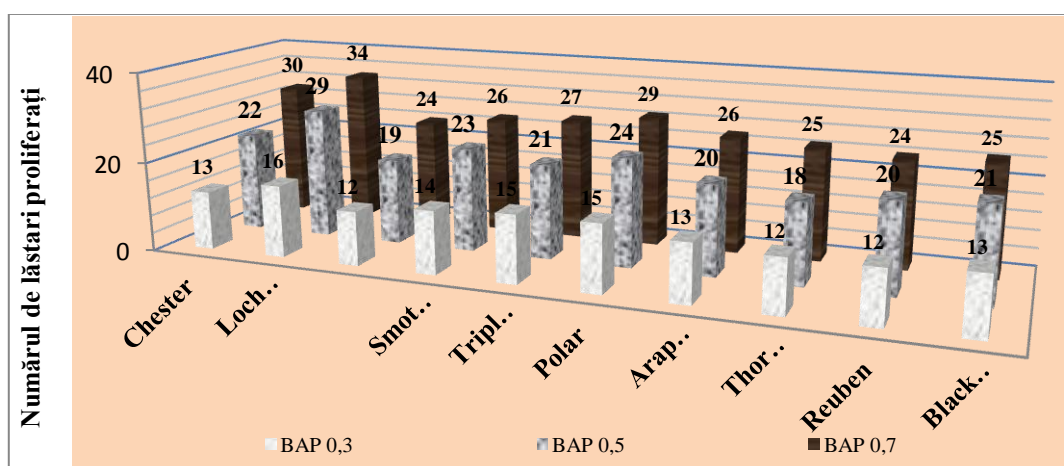


Fig. 3.2. Numărul lăstarilor proliferați de mur pe medii nutritive cu diferite concentrații de BAP (0,3; 0,5; 0,7 mg/l)

Pe mediul pentru multiplicare adiționat cu BAP 0,7 mg/l cele mai bune rezultate s-au remarcat la soiul ‘Loch Ness’ cu 34 lăstari adventivi generați, fiind urmat de soiurile ‘Chester’ cu 30 lăstari generați și soiul ‘Polar’ cu 29 lăstari adventivi. Soiurile de mur ‘Triple Crown’ și ‘Smoothstem’ dezvoltă câte 26, iar ‘Arapaho’ – 27 lăstari adventivi. La plasarea pe mediile de cultură adiționate cu BAP, se mărește considerabil inducerea mugurilor laterali pe axul plantulei, ceea ce favorizează o lăstărire multiplă, ce servește ca sursă de material biologic pentru micropropagare și sporirea masei vegetative. Mărirea concentrației de BAP (0,7 mg/l) induce un număr sporit de lăstari adventivi, care ating lungimea de 4-6 cm, ulterior sunt supuși fragmentării și micropropagării păstrându-și potențialul morfogenetic. În funcție de concentrație, BAP-ul favorizează și stimulează la soiurile de mur formarea de mugurași și tulpinițe (caulogeneza), fapt

ce constituie o modalitate de obținere rapidă a unui număr sporit de minibutași de o uniformitate genetică, multiplicați prin tehnici *in vitro*.

### 3.3.4. Influența balanței hormonale asupra creșterii și multiplicării vitroculturilor de mur

Toate soiurile de mur au fost micropropagate pe mediul de bază MS 100%, suplimentat cu formule hormonale din grupul citochininelor (BAP), auxinelor AIB, ANA, AIA, și giberilinelor (AG<sub>3</sub>). Studiul efectuat asupra soiurilor de mur cu combinația de trei tipuri de regulatori de creștere din grupul auxinelor, citochininelor, giberilinelor (BAP+AIB+GA<sub>3</sub>, BAP+AIA+ GA<sub>3</sub>, BAP+ANA+AG<sub>3</sub>) în doze 0,3; 0,2; 0,1 mg/l au dat rezultate promițătoare. Auxinele selectate (ANA, AIB, AIA), pe lângă rolul de stimulare a rizogenezii, favorizează și dezvoltarea plantei în ansamblu. Toate tipurile de auxine s-au luat în concentrație mai diminuată de 0,2 mg/l. Giberilina în doză de 0,1 mg/l este un regulator, care favorizează creșterea în lungime a internodurilor.

Pe mediul Nr. 4 MS 100% suplinit cu 0,3 mg/l BAP și 0,2 mg/l AIB și 0,1 mg/l AG<sub>3</sub> prevalează cu circa 3,0 lăstari proliferați soiurile ‘Arapaho’, ‘Loch Ness’, ‘Triple Crown’, ‘Black Satin’, ‘Thornfree’, un număr mai mic de lăstari de circa 2,66 se formează la soiurile ‘Polar’, ‘Smoothstem’, ‘Chester’, ‘Thornless Evergreen’ și ‘Reuben’. Cea mai redusă creștere pe mediul Nr. 4 este la soiul ‘Smoothstem’ (Tabelul 3.1).

Tabelul 3.1. Rolul balanțelor regulatorilor de creștere în multiplicarea *in vitro* la mur

Nr. d/o	Soiul	Medii nutritive cu diferite combinații și doze a regulatorilor de creștere					
		Nr. 4 – BAP+AIB+GA <sub>3</sub> 0,3+0,2 +0,1 mg/l		Nr. 5 – BAP +AIA+ GA <sub>3</sub> 0,3+0,2+0,1 mg/l		Nr. 6 – BAP+ANA+GA <sub>3</sub> 0,3 + 0,2 +0,1 mg/l	
		Lungimea lăstarului, cm	Numărul de lăstari	Lungimea lăstarului, cm	Numărul de lăstari	Lungimea lăstarului, cm	Numărul de lăstari
1.	‘Arapaho’	8,00 ± 0,62	3,00±1,52	9,00 ± 0,27	2,66±1,54	10,00 ±0,24	3,00±0,0
2.	‘Triple Crown’	8,66±0,97	3,00±1,0	7,00±0,61	2,00±1,0	9,00±0,73	2,00±1,0
3.	‘Loch Ness’	8,00±1,73	3,00±1,52	6,33±0,57	1,66±1,54	7,66±0,57	2,33±1,52
4.	‘Polar’	7,66 ±0,49	2,66±1,0	8,33 ± 0,62	1,66±1,54	8,33 ±0,62	2,00±0,0
5.	‘Black Satin’	7,33±0,51	3,00±1,0	8,66±0,33	3,00±1,0	9,00±0,27	3,00±0,0
6.	‘Thornless Evergreen’	7,00±0,35	2,66±1,54	7,33 ± 0,39	3,33±1,52	8,33 ±0,12	4,00±1,0
7.	‘Reuben’	7,66±0,3	2,66±1,54	7,00±0,35	3,33±1,52	8,00±0,35	3,33±2,08
8.	‘Chester’	9,66±0,64	2,66±1,52	9,66 ± 0,53	3,33±0,57	9,33 ±0,61	4,00±1,0
9.	‘Thornfree’	7,66±0,49	3,00±2,64	9,33 ± 0,30	2,66±0,57	8,33±0,45	3,33±2,08
10.	‘Smoothstem’	5,66±0,67	2,66±1,0	9±0,55	1,33±0,57	10,00 ±0,24	2,83±1,54

Pe mediul de cultivare Nr. 5, suplinit cu BAP (0,3 mg/l), AIA (0,2 mg/l), AG<sub>3</sub> (0,1 mg/l) cea mai dezvoltată proliferare se evidențiază la soiurile ‘Chester’, ‘Thornless Evergreen’,

‘Reuben’ de 3,33 lăstari. O pondere mai scăzută este la soiul ‘Black Satin’ – 3 lăstari, iar câte 2,66 lăstari se dezvoltă la soiurile ‘Arapaho’ și ‘Thornfree’. Cea mai mare lungime s-a constatat la soiurile ‘Chester’ de 9,66 cm per explant și soiul ‘Thornfree’ cu o lungime de 9,33 cm. Pe mediul Nr. 6 combinația BAP – 0,3 mg/l, ANA – 0,2 mg/l, AG<sub>3</sub> – 0,1 mg/l au fost următoarele rezultate: câte 4 lăstari, au proliferat soiurile ‘Thornless Evergreen’ și ‘Chester’, soiurile ‘Thornfree’ și ‘Reuben’ au dezvoltat doar 3,33 lăstari. Soiul ‘Arapaho’ a produs 3 lăstari, iar soiul ‘Smoothstem’ a proliferat 2,83 lăstari, mai puțin soiul ‘Loch Ness’ – 2,33 lăstari, iar soiurile ‘Polar’ și ‘Triple Crown’ câte 2,0 lăstari pentru fiecare soi în parte. Cea mai mare înălțime au atins soiurile ‘Arapaho’ și ‘Smoothstem’ de circa 10 cm, urmate de soiul ‘Chester’ cu 9,33 cm. A fost elaborată schema subcultivărilor pentru micropropagarea *in vitro* a soiurilor de mur.

Analiza datelor obținute ne permite să afirmăm, că prin experimentele efectuate cu combinarea diferitor regulatori din grupul citochininelor, auxinelor, giberinelor, a fost creată o balanță hormonală în raport de 3:2:1. În dependență de scopul propus – pentru sporirea materialului biologic se respectă toate etapele (Figura 3.4).

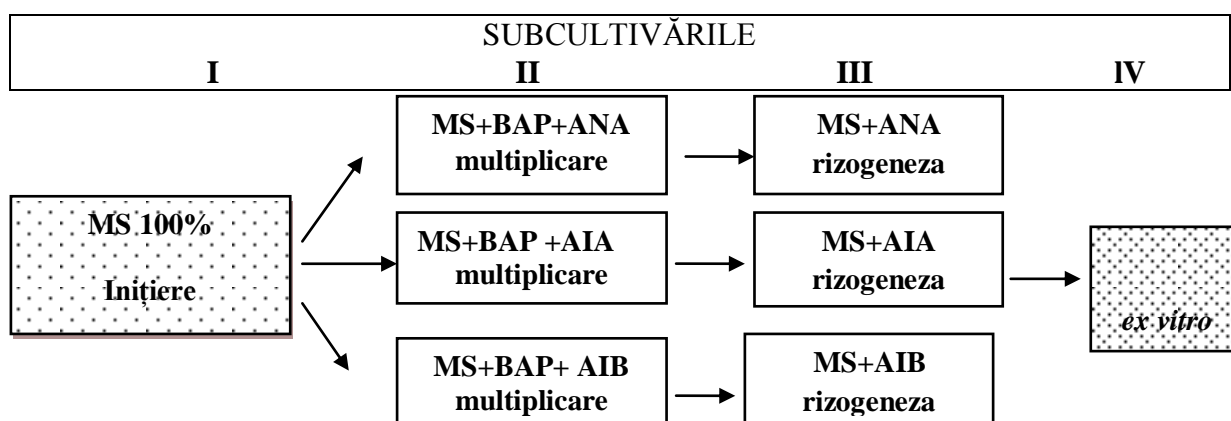


Fig. 3.4. Schema subcultivărilor pentru micropropagarea *in vitro* a soiurilor de mur

Astfel s-a demonstrat că prezența în mediul de cultură a citochininei alături de o auxină, stimulează selectiv procesul de proliferare a lăstarilor, dezvoltarea lor și procesul de rizogeneză. Suplinirea mediilor cercetate cu giberilină s-a efectuat cu scopul de a contribui la alungirea internodurilor și creșterea în lungime a plantulelor de mur.

### 3.3.5. Influența auxinelor asupra rizogenezei și creșterii vitroplantulelor la soiurile de mur

Au fost cercetate mediile nutritive suplinate cu 3 tipuri de regulatori de creștere din grupul auxinelor (AIB, AIA, ANA). Rezultatele cercetărilor denotă diferențe în ceea ce privește lungimea lăstarului (Figura 3.5), dezvoltarea frunzelor, vigurozitatea lăstarului, formarea

procesului de rizogeneză. Aceste caracteristici s-au manifestat bine la toate soiurile, abateri înregistrându-se la lungimea lăstarului și formarea masei calusale la baza lăstarului.

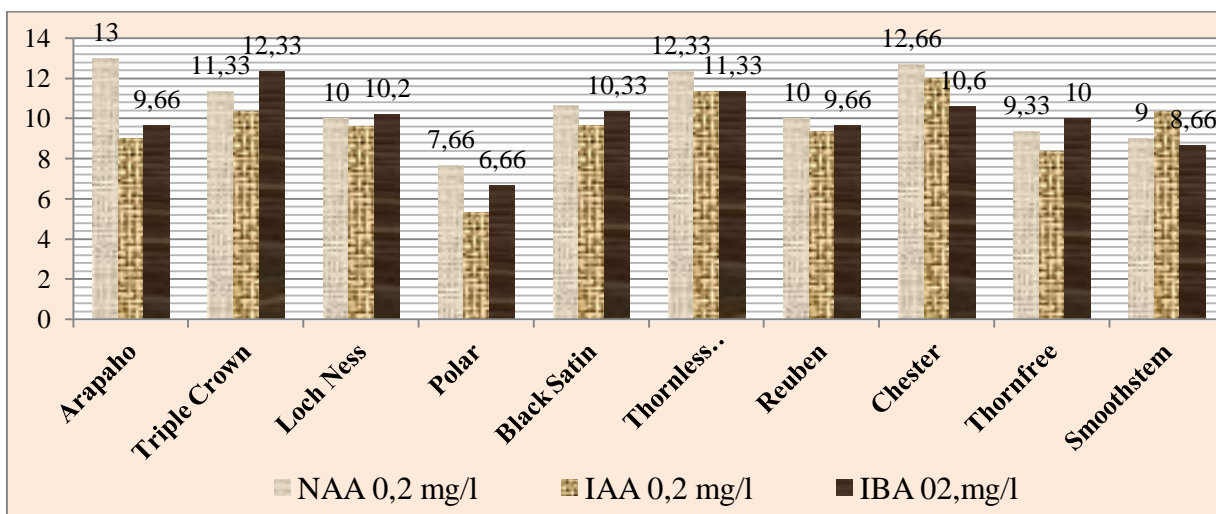


Fig. 3.5. Influența regulatorilor auxinici asupra lungimii lăstarilor (cm) la diferite soiuri de mur fără spini

Cel mai frecvent a fost sesizată dezvoltarea masei calusale pe mediile suplinite cu AIB, iar pe cele suplinite cu ANA s-a obținut calus verde la baza lăstarului. Pe mediile nutritive suplimentate cu AIA nu s-au observat formațiuni calusale, procesul rizogenetic a avut condiții de dezvoltare eficient. Prelucrarea și analiza datelor statistice a scos în evidență variația lungimii lăstarilor de mur micropropagați pe medii suplinite cu auxine. Pentru soiul ‘Arapaho’ cea mai efectivă creștere a fost pe mediul suplimentat cu ANA (0,2 mg/l), unde lăstarul atinge 13,0 cm lungime cu formațiuni calusare verzi, pe mediul suplimentat AIB (0,2 mg/l) înregistrează o scădere în creșterea lăstarului de 9,66 cm, la baza rădăcinii prezentând formațiuni calusale albe, iar pe mediul nutritiv suplimentat cu ANA (0,2 mg/l), lungimea lăstarului atinge 9,0 cm, planta fiind viguroasă, fără formațiuni calusale la bază.

Pentru micropropagarea minilăstarilor a fost testat mediul lichid (MS) în două variante experimentale: 100% și 50%. Prima variantă de mediu s-a utilizat pentru a obține cantități mai sporite de material vegetal. Varianta MS 50% este utilizată ca mediu de înrădăcinare, dar și ca mediu pentru menținerea plantulelor. Apariția primelor rădăcinuțe s-a observat la a 10-a zi după transfer pe acest mediu. În perioada de 21 zile planta atinge o lungime de 4 cm, sistem radicular alcătuit din 5-6 rădăcinuțe cu o lungime de 2,0-2,5 cm. Pe mediul nutritiv MS 100%, cu pH 5,8-6,0 s-a observat inițierea rădăcinuțelor în decurs de 14 zile de la transferul *in vitro*, peste 20-30 de zile se remarcă o creștere considerabilă a plantulei, care deja poate fi folosită ca material de butășire pentru o pasare ulterioară, partea inferioară a plantulei este transferată *ex vitro*.

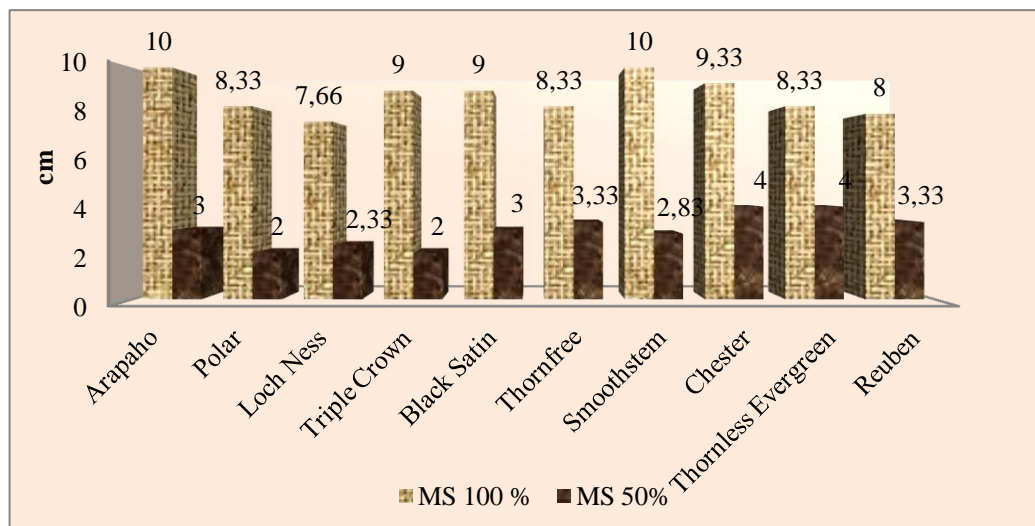


Fig. 3.6. Influența mediilor nutritive de cultivare MS (50%, 100%) asupra lungimii lăstarilor la diferite soiuri de mur

Lăstarul cultivat pe mediul nutritiv, când atinge lungimea de 8,0-10,0 cm este butășit și transferat pe alte medii nutritive pentru microînmulțirea ulterioară. În acest mod, în intervalul de 30-40 zile randamentul de material biologic se mărește de 4-5 ori. Astfel, s-a stabilit că mediul optim, MS 100%, lipsit de regulatori de creștere este rentabil și binevenit pentru rizogeneza soiurilor de mur.

### 3.4. Acclimatizarea materialului multiplicat *in vitro*

Acclimatizarea reprezintă o treaptă de pregătire a plantulelor pentru trecerea la condițiile *ex vitro* (seră și câmp). La transplantarea plantulelor multiplicare *in vitro*, la *ex vitro* se ține cont în mare măsură de substratul în care se plantează. Este necesar de a respecta unele condiții optime (gradul de umiditate și afânare a substratului, valoarea pH, compoziția substratului, expoziția și gradul de iluminare). Plantulele *in vitro* sunt crescute la intensitate mai redusă a luminii artificiale (2000 lucși) și temperatura aerului mai scăzută ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ). Acclimatizarea murului s-a efectuat în 3 etape în decursul a 40-50 de zile. Au fost testate și utilizate 3 tipuri de substrat: 1) substrat steril alcătuit din sol de gazon, turbă, perlit, nisip, în proporții de 1:1:0,25:0,25; 2) substrat steril din sol de gazon și turbă comercială în raport 1:1; 3) substrat alcătuit doar din turbă comercială.

### 3.5. Înființarea colecției de mur în Grădina Botanică Națională (Institut)

Acțiunea de înființare a unei plantații de mur este de importanță majoră. Pe lotul experimental al GBNI plantația, a fost fondată cu scopul de a mobiliza și diversifica cele mai valoroase și productive soiuri introductive de mur (Figura 3.8). În primăvara și toamna anului 2014 s-au plantat soiurile de mur fără spini luate în cercetare, completată ulterior în anul 2015.



Înființarea colecției de mur în GBNI s-a inițiat pe un teren cu acces la sursa de apă pentru irigare, adăpostit de vânturi puternice, situat în apropierea fâșiilor de arbori (pruni, tei, nuci). Cultura s-a înființat în perioada de conversie de 3 ani pentru a îmbogăți terenul cu humus.

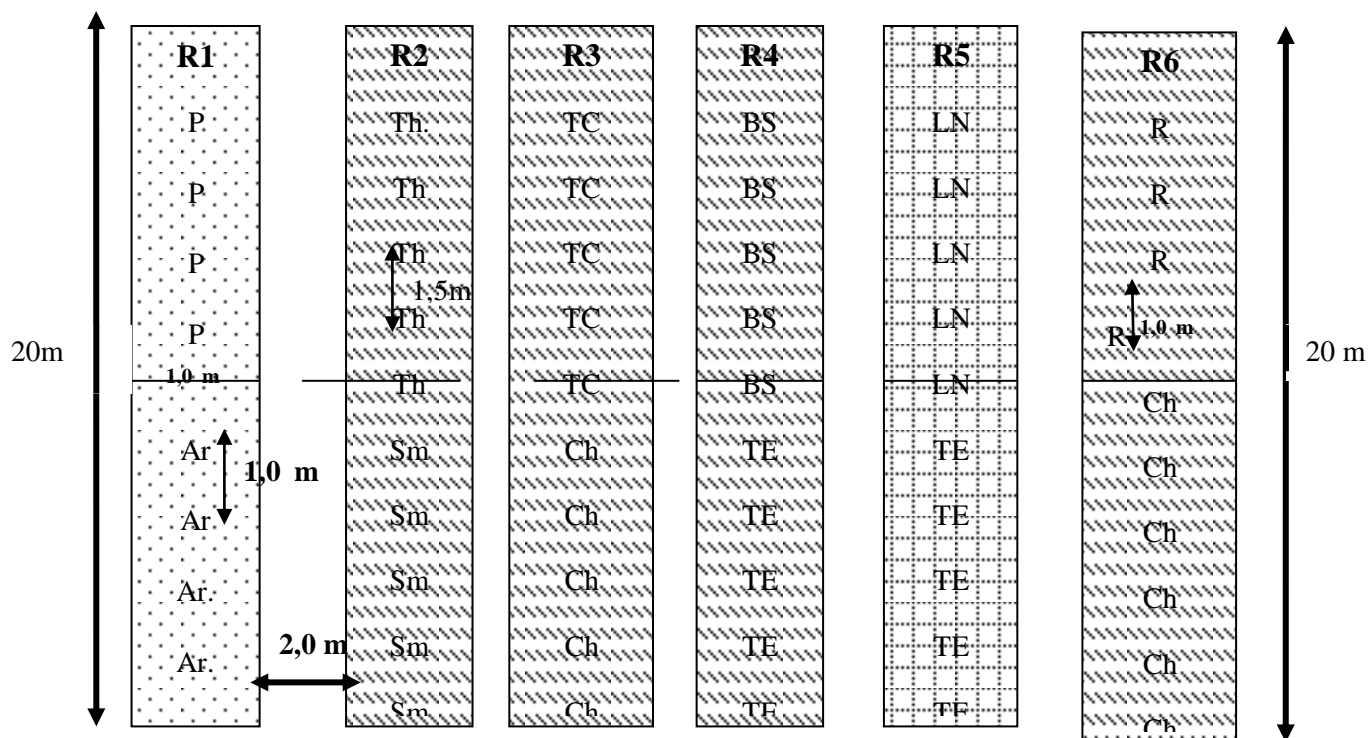


Fig. 3.8. Schema colecției de mur în Grădina Botanică

P – ‘Polar’, Ar – ‘Arapaho’, Th – ‘Thornfree’, Sm – Smoothstem, LN – ‘Loch Ness’, TC – ‘Triple Crown’, BS – ‘Black Satin’, Ch – ‘Chester’, TE – ‘Thornless Evergreen’, R – ‘Reuben’, 2,0 m – distanța dintre rânduri (pentru toate soiurile), 1,5 m – distanța dintre soiurile semierecte, repente, distanța dintre plante la soiurile erecte – 1,0 m, lungimea rândului 20 m.

În continuare, s-au trasat drumuri principale și s-a făcut pichetarea și parcelarea, ținându-se cont de orientarea rândurilor (obligatoriu să fie pe direcția nord-sud pentru crearea unui regim favorabil de iluminare și aerisire a lotului). Lotul pentru colecție a suportat un complex de lucrări agrotehnice: afânarea solului, distrugerea buruienilor, nivelarea, irigarea.

#### 4.0. PARTICULARITĂȚILE MORFO-ANATOMICE ȘI BIOCHIMICE ALE SOIURILOR DE MUR

##### 4.1. Descrierea morfologică a soiurilor de mur multiplicare *in vitro* pe lotul experimental al Grădinii Botanice Naționale (Institut)

Analiza rezultatelor, privind studiul biomorfologic al taxonilor de mur fără spini a scos în evidență caracteristicile distinctive: portul arbustului (erecte – ‘Arapaho’, ‘Reuben), semierecte – ‘Chester’, ‘Thornfree’, ‘Triple Crown’, ‘Loch Ness’ și plagiotrope – ‘Thornfree’); perioada de

coacere (timpurii – ‘Arapaho’, ‘Reuben’, medii – ‘Triple Crown’, ‘Black Satin’, ‘Loch Ness’ ‘Thornless Evergreen’, moderat-tardive – ‘Thornfree’, ‘Polar’, ‘Chester’, ‘Smoothstem’; gradul de fermitate al fructelor (sporită – ‘Arapaho’, ‘Triple Crown’, ‘Loch Ness’ ‘Thornless Evergreen’, destinate comercializării în stare proaspătă, medie – ‘Thornfree’, ‘Polar’, ‘Chester’, redusă – ‘Black Satin’, ‘Reuben’, pentru consumul proaspăt și prelucrare în industria alimentară, vinicolă, cosmetică și farmaceutică.

#### **4.2. Studiul anatomic comparativ al frunzelor unor specii și soiuri de mur**

A fost efectuată anatomia frunzelor (pe secțiuni transversale și preparate superficiale din material javelizat) la următorii taxoni de mur: specia *R. fruticosus* L. și soiurile derivate ‘Arapaho’ (erect), ‘Chester’, ‘Thornfree’ (semierect), iar soiul ‘Thornless Evergreen’ (repect), aparține speciei *R. laciniatus* Willd. Studiul a fost realizat în baza unui complex de indici anatomici: tipul anatomic al frunzei, tipul stomatelor, perilor, cristalelor de oxalat de calciu și modul de distribuire, tipul cuticulei și fasciculelor conducătoare, prezența/absența țesutului mecanic etc. *Screening*-ul rezultatelor anatomice a scos în evidență indici structurali cu caracter de indentificare a taxonilor de mur.

Astfel, pentru frunzele de *R. candicans* sunt specifici: peri tectori în mănunchi cu aspect stelat pe nervuri/limb și pe ambele epiderme, mezofil dorso-ventral, cuticula extern-internă, limb amfistomatic cu stomate de tip anizocitic, druze de oxalat de calciu în teacă și în mezofil, fascicul conducător colateral închis, însoțit de elemente mecanice. Aceleași structuri anatomice sunt caracteristice și pentru ceilalți taxoni studiați, doar cu mici diferențe: soiul ‘Arapaho’ dezvoltă doar 2 tipuri de peri tectori solitari (I – scurți și drepti, 2 – lungi, încolăciți cu celule bazale), druze mari din abundență; soiul ‘Chester’ – cuticulă externă, un tip de peri tectori, rari, solitari, lungi, încolăciți, cu soclu bazal, druze, preponderent, în teaca fasciculară; soiul ‘Thornfree’ – peri tectori în mănunchi și solitari, ultimii în soclul bazal brunificat, soiul ‘Thornless Evergreen’ – peri solitari și anomostozați câte 2-5, preponderent pe nervuri, druze în nervuri și mezofil, colenchim dezvoltat în zona nervurilor.

##### **4.2.2. Anatomia comparată a frunzelor taxonilor studiați (condiții de seră și teren)**

Pentru identificarea taxonilor cu potențial structural adaptiv la condițiile pedoclimatice de teren ale R. Moldova s-au efectuat măsurători ale componentelor limbului foliar și analizat coraportul lor la plantele de mur din seră și de pe lotul experimental.

Așa dar, toate soiurile analizate dezvoltă frunze cu grosimea limbului mai mare la plantele din teren, față de cele din seră. Grosimea epidermei superioare este mai mare, decât cea inferioară la toți taxonii analizați, dar indicele coraportului grosimii epidermei superioare/inferioare, care este și un indicator al rezistenței la acțiunea factorilor nefavorabili,

este cel mai mare pentru sp. *R. candicans* (2,4) și reprezintă o valoare dublă față de soiuri (Tabelul 4.1).

Tabelul 4.1. Caracteristicile anatomice ale frunzelor unor taxoni de mur

Nr d/ o	Specia, soiul	Grosimea limbului ( $\mu\text{m}\pm\text{n}$ )	Grosimea epidermelor ( $\mu\text{m}\pm\text{n}$ )		Grosimea mezofilului ( $\mu\text{m}\pm\text{n}$ )	Indicele coraportului grosimii		
			superioară	inferioară		Epiderma superioară/ inferioară	Epiderme /limb	Mezofil /limb
1	* <i>Rubus candicans</i>	114,0 $\pm$ 4,1	20,95 $\pm$ 1,5	8,53 $\pm$ 1,2	83,74 $\pm$ 4,2	2,45	3,87	0,73
2	*Arapaho	240,0 $\pm$ 14	44,3 $\pm$ 2,7	35,4 $\pm$ 2,0	168,2 $\pm$ 11	1,2	3,0	0,67
3	**Arapaho	121,0 $\pm$ 7,7	29,7 $\pm$ 4,4	21,14 $\pm$ 2,6	71,4 $\pm$ 3,0	1,33	2,32	0,58
4	*Chester	148,0 $\pm$ 3,8	27,4 $\pm$ 0,9	22,3 $\pm$ 1,1	98,9 $\pm$ 3,5	1,22	2,97	0,66
5	**Chester	130,0 $\pm$ 6,2	26,6 $\pm$ 1,7	22,63 $\pm$ 1,3	77,5 $\pm$ 3,8	1,17	2,64	0,59
6	*Thornfree	191,5 $\pm$ 2,6	34,3 $\pm$ 1,3	29,1 $\pm$ 0,8	125,0 $\pm$ 2,4	1,17	3,01	0,65
7	**Thornfree	117,0 $\pm$ 2,0	21,4 $\pm$ 1,2	11,88 $\pm$ 0,4	80,0 $\pm$ 5,2	1,8	3,51	0,68
8	*Thornless Evergreen	170,0 $\pm$ 7,7	35,0 $\pm$ 1,6	27,7 $\pm$ 0,7	107,0 $\pm$ 7,4	1,26	2,7	0,62
9	**Thornless Evergreen	142,0 $\pm$ 5,4	25 $\pm$ 1,5	18,95 $\pm$ 1,5	96,0 $\pm$ 4,54	1,31	3,23	0,67

**Notă:** n – abaterea; \* – plante din teren; \*\* – plante din seră

Comparativ, la soiuri valoarea maximă este pentru ‘Thornfree’ și ‘Arapaho’, caracterizate și cu cuticulă de tip extern-intern. Valoarea indicelui coraportului epiderme/limb demonstrează capacitatea structurală de adaptare a plantei la condiții de creștere. Astfel, specia *R. candicans* și soiurile ‘Thornfree’ și ‘Arapaho’ se deosebesc cu valori maxime ale acestui indice și denotă prezența unui potențial adaptiv înalt. Datele măsurătorilor scot în evidență că frunzele soiurilor de mur cultivate în teren au grosimea mai mare a mezofilului frunzei, decât la frunzele sp. *R. candicans*. Grosimea epidermelor și mezofilului, corelează cu valorile coraportului grosimii mezofilului față de limb. Cea mai mare valoare revine frunzelor de *R. candicans* (0,73), urmată de soiurile (în descreștere): ‘Arapaho’ (0,67), ‘Chester’ (0,66) și ‘Thornfree’ (0,65), ceea ce denotă un randament asimilator înalt fotosintetic. Datele anatomice cantitative/calitative și studiul anatomic comparativ al frunzelor taxonilor studiați printr-un complex de indicatori anatomici demonstrează că toți taxonii dezvoltă un potențial structural adaptiv la acțiunea condițiilor mediului suplinit atât de structuri externe: cuticula groasă de tip extern-intern, diferite tipuri de peri tectori, dimensiunile și gradul de împachetare al celulelor epidermei, coraportul grosimii epidermelor, cât și de cele interne: gradul de dezvoltate a mezofilului, prezența și modul de distribuire a druzelor oxalatului de calciu, coraportul grosimii epidermelor și mezofilului. Aceste structuri funcționează sinergic și alcătuiesc un complex histoanatomic compensator-protector al limbului [10] la acțiunea factorilor nefavorabili (deficit de umiditate, temperaturi sporite ale solului și aerului pe parcursul perioadei estivale și de iarnă).

### 4.3. Studiul biochimic comparativ al frunzelor și fructelor la soiuri și specii de mur

A fost efectuat studiul biochimic comparativ la unele clase de compuși chimici naturali (flavonoide, substanțe tanante, acid ascorbic) în fructele și frunzele soiurilor noi de mur de origine americană: ‘Arapaho’, ‘Thornless Evergreen’, ‘Chester’, ‘Thornfree’ și speciei *R. candicans* din flora spontană a R. Moldova.

#### 4.3.1. Studiul calitativ și cantitativ al flavonozidelor

Pentru studiul calitativ al flavonoidelor în extractele hidro-alcoolice au fost aplicate reacții specifice de identificare: reacția cianidului, soluție de acetat de plumb bazic, soluție de vanilină + HCl, soluție de amoniac 5%, soluție de FeCl<sub>3</sub> 2%. De menționat, că efectele reacțiilor analitice au avut un caracter gradual (reduc, moderat, bun, pronunțat), ce colerează cu organul (fructe sau frunze) și taxonul analizat. *Screening-ul* efectelor reacțiilor analitice denotă, gradul de expresie mai pronunțat pentru extractele din fructele și frunzele soiurilor ‘Thornless Evergreen’, ‘Arapaho’, ‘Chester’, specia *R. candicans*, urmate de soiul ‘Thornfree’. Efectele analitice, au fost mai evidente în extractele din frunzele de *R. candicans* și din fructele și frunzele soiului ‘Thornless Evergreen’, comparativ cu celelalte soiuri analizate. În extractele din fructe au fost evidente efectele analitice pentru antociani, pe lângă cele pentru flavone, flavonone, flavonoli și catehine, care au fost prezenți, atât în fructele, cât și frunzele taxonilor analizați.

Studiul cantitativ al flavonozidelor, a fost efectuat prin metoda spectrofotometrică [7]. Analiza rezultatelor arată că conținutul de flavonozide în fructe corelează cu taxonul: maxim în soiul ‘Chester’ (1,983%), urmat de soiurile ‘Thornless-Evergreen’ (1,640%) și ‘Thornfree’ (1,445%) (Tabelul 4.2).

Tabelul 4.2. Conținutul (%) de flavonoide, taninuri și acid ascorbic în frunzele și fructele unor taxoni de mur

Nr d/o	Specia, soiul	Conținutul (%)				
		Flavonoide		Taninuri		Acid ascorbic
		Frunze	Fructe	Frunze	Fructe	Fructe
1.	<i>Rubus candicans</i>	2,893	-	11,24	6,16	
2.	‘Arapaho’	2,703	-	10,51	2,12	0,23
3.	‘Chester’	3,152	1,983	8,79	2,02	0,26
4.	‘Thornfree’	2,950	1,445	10,75	1,22	-
5.	‘Thornless-Evergreen’	2,725	1,640	8,51	1,19	0,27

La compararea rezultatelor, privind conținutul de flavonozide în fructe și în frunze observăm că valorile sunt mai mari în frunze, decât în fructe la toți taxonii studiați. Cea mai mare

cantitate a fost determinată în frunzele soiului ‘Chester’ (3,152%), urmată de soiul ‘Thornfree’ (2,950 %) și specia *R. candicans* din flora spontană (2,893 %). În frunzele soiurilor ‘Thornless-Evergreen’ și ‘Arapaho’, aproape valori egale (respectiv 2,725 și 2,703%).

#### **4.3.2. Studiul calitativ și cantitativ al taninurilor**

Analizele rezultatelor reacțiilor chimice specifice, aplicate cu soluții de gelatină 1%, alauni de fier și amoniu, acid acetic + acetat bazic de Pb, FeCl<sub>3</sub>, NaNO<sub>2</sub> au demonstrat prezența, atât a taninurilor condensate, cât și hidrolizabile, dar ultimile prevalează în toate extractele apoase din frunzele și fructele taxonilor analizați. Pe cromatograme, în strat subțire ale extractelor din fructele și frunzele taxonilor de mur au fost identificați următorii constituenți: catehine (Rf=0,85) în toate extractele, cu excepția celor din fructele soiurilor ‘Chester’ și ‘Thornless Evergreen’; acid galactonic (Rf=0,83) în extractele din frunzele soiurilor ‘Arapaho’, ‘Thornless Evergreen’, ‘Chester’ și ‘Thornfree’; pirogalol (Rf=0,77), în extractele din frunzele soiurilor ‘Arapaho’, ‘Thornless Evergreen’, și fructelor soiurilor ‘Thornfree’ și ‘Thornless Evergreen’; acid galic (Rf=0,86). Studiul cantitativ al substanțelor tanante a fost efectuat, prin metoda permanganatometrică [7]. La analiza rezultatelor conținutului taninic (Tabelul 4.2), constatăm că cea mai mare valoare revine frunzelor de *R. candicans* (11,24%), puțin cedează conținutul din frunzele soiurilor ‘Thornfree’ (10,75%) și ‘Arapaho’ (10,51%), urmate de cele ale soiurilor ‘Chester’ (8,79%) și ‘Thornless-Evergreen’ (8,51%). Aceiași consecutivitate a descreșterii conținutului taninic se observă și pentru fructe, doar că valorile sunt mult mai mici: la specia *R. candicans* – 6,16%, soiurile ‘Thornfree’ – 1,22%, ‘Arapaho’ – 2,12%, ‘Chester’ – 2,02% și ‘Thornless-Evergreen’ cu 1,19%.

#### **4.3.3. Analiza cantitativă a acidului ascorbic**

Determinarea conținutului de acid ascorbic a fost efectuată prin metoda titrimetrică [7], bazată pe proprietatea acidului ascorbic de a reduce 2,6-diclorfenolindofenolul. Datele obținute (Tabelul 4.2.) denotă, că diferențe mari în conținutul acidului ascorbic la soiurile analizate nu sunt, dar totuși, cea mai mare cantitate revine fructelor soiului ‘Thornless-Evergreen’ (0,27%), puțin cedează fructele soiului ‘Chester’ (0,26%) și cea mai mică cantitate a fost în fructele soiului ‘Arapaho’ (0,23%).

Astfel, studiile biochimice au demonstrat că atât frunzele, cât și fructele speciei *R. candicans* și soiurile de mur, analizate produc flavonoide, taninuri, acid ascorbic și diferențiat pot servi ca surse de materie primă pentru valorificarea în industria farmaceutică.

## CONCLUZII GENERALE

1. A fost elaborată schema biotehnologică de producere a materialului săditor uniform, omogen, robust, sănătos la soiurile introducente de mur fără spini: ‘Arapaho’, ‘Triple Crown’, ‘Black Satin’, ‘Loch Ness’, ‘Polar’, ‘Thornfree’, ‘Smoothstem’, ‘Thornless Evergreen’, ‘Reuben’, ‘Chester’ prin microtehnici *in vitro*. Multiplicarea *in vitro* a plantulelor prin microbutășire constituie o metodă eficientă și profitabilă în condiții ecologice controlate și cu factori biologici, chimici, fizici determinați și manipulabili.
2. Au fost stabilite condițiile optime pentru organogeneza inoculilor, ca sursă de material biologic au servit meristeme ale lăstarilor apicali și laterali. Fortificarea capacității de proliferare a lăstarilor pe mediul nutritiv de bază MS suplinit cu diferite doze ale regulatorilor de creștere BAP (0,3; 0,5; 0,7 mg/l), microclonarea selectivă și creșterea lăstarilor a fost obținută pe combinații ale regulatorilor de creștere (BAP – 0,3; 0,5; 0,7 mg/l; BAP+AIB+AG<sub>3</sub> ; BAP +AIA+GA<sub>3</sub> mg/l; BAP+NAA+GA<sub>3</sub> – cu dozele de 0,3+0,2+0,1 mg/l) .
3. Calusogeneza a fost inițiată grație acțiunii selective a regulatorilor de creștere în suplینirea mediului nutritiv de bază MS asupra inoculilor din limb foliar: calusogeneza (BAP – 1,50 mg/l și 1,0 mg/l); BAP 1,0 mg/l+NAA (0,2; 0,5; 1,0 mg/l); BAP 1,0 mg/l+IAA (0,2; 0,5; 1,0); KIN (1,50 mg/l ,1,0 mg/l), KIN 1,0 mg/l+NAA 0,1 mg/l;) și inițierea plantulelor din calus (morfogeneza) pe mediul MS suplinit cu (BAP 2,0 mg/l).
4. Rizogeneza a fost indusă, atât pe mediul de bază MS suplinit cu regulatori de creștere AIB, AIA, ANA (0,2 mg/l), cât și pe mediile nutritive MS 100% modificat și MS 50%. Aclimatizarea *ex vitro* a fost efectuată în 3 etape prin testarea a 3 tipuri de substrat și optimizarea condițiilor de adaptare a plantulelor în seră și teren deschis. Soiurile de mur fără spini au fost aclimatizate cu o rată de viabilitate de 99%, iar perioadă mai potrivită revine lunilor de primăvară-vară.
5. Studiul anatomic al frunzelor a scos în evidență indicii structurali specifici taxonilor, iar cel comparativ al soiurilor de mur în condiții de teren protejat și deschis a evidențiat indicii anatomici cu caracter adaptiv la acțiunea condițiilor nefavorabile (excesul de temperaturi, secetă, îngheț): cuticula groasă de tip extern-intern, pubescența din peri tectori unicelulari scurți, lungi în soclu bazal brunificat, solitari sau în mănunchi, distribuiți pe nervuri și pe toată suprafața, druze de oxalat de calciu și modul de distribuire.
6. Studiul cantitativ al unor clase de compuși chimici arată că conținutul (%) corelează cu organul și taxonul: frunzele acumulează mai multe flavonoide și taninuri, decât fructele la toți taxonii analizați: flavonoide în frunzele soiurilor ‘Chester’ – 3,152 și ‘Arapaho’ – 2,703, iar în fructele soiurilor ‘Chester’ – 1,983, ‘Thornless-Evergreen’ – 1,640 și ‘Thornfree’ – 1,445; conținutul

maxim de taninuri a fost în frunzele speciei *R. candicans* (11,24), urmat de soiurile ‘Thornfree’ (10,75), ‘Arapaho’ (10,51), ‘Chester’ (8,79) și ‘Thornless-Evergreen’ (8,51), iar fructele – 6,16 la specia *R. candicans*, de 3 ori mai puțin la soiurile ‘Arapaho’, ‘Chester’ și de cca 5 ori mai mic la ‘Thornfree’ și ‘Thornless-Evergreen’. Fructele au aproape același conținut (%) de acid ascorbic la soiurile: ‘Thornless-Evergreen’ – 0,27, ‘Chester’ – 0,26 și ‘Arapaho’ – 0,23.

7. Au fost stabilite condițiile și elementele tehnologice primare de plantare și îngrijire a plantelor pentru înființarea colecției cu arbuști de mur în GBNI, destinată extinderii, conservării genofondului și cercetării științifice, care cuprinde 10 soiuri adaptate la condițiile pedoclimatice și sunt de perspectivă pentru ramura agro-industrială a R. Moldova. Au fost stabilite procedeele agrotehnice în corelație cu habitusul și potențialul de plasticitate structural-adaptivă pentru proiectarea, înființarea și întreținerea plantațiilor industriale.
8. A fost întocmit calendarul înfloririi și coacerii fructelor soiurilor de mur: ‘Arapaho’ – precoce; medie – ‘Loch Ness’, ‘Polar’, ‘Black Satin’, ‘Triple Crown’; semitardivă – ‘Thornfree’, ‘Smoothstem’, ‘Thornless Evergreen’, ‘Reuben’ – remontant; ce permite recoltarea eșalonată, asigurând consumatorul pe un termen de circa 20 săptămâni (140 zile), cu fructe proaspete bogate în compuși chimici valoroși și calități organoleptice înalt apreciate.

### RECOMANDĂRI PRACTICE

1. Se recomandă tehnologia de multiplicare *in vitro* a plantelor soiurilor introductive de mur (‘Arapaho’, ‘Triple Crown’, ‘Black Satin’, ‘Loch Ness’, ‘Polar’, ‘Thornfree’, ‘Smoothstem’, ‘Thornless Evergreen’, ‘Reuben’, ‘Chester’) în condițiile pedoclimatice ale R. Moldova cu scopul obținerii materialului săditor omogen, viguros, sănătos pentru înființarea de plantații industriale moderne.
2. Soiurile ‘Arapaho’, ‘Triple Crown’, ‘Black Satin’, ‘Loch Ness’, ‘Polar’, ‘Thornfree’, ‘Smoothstem’ sunt recomandate pentru grădini particulare ca sursă de fructe, iar soiurile ‘Thornless Evergreen’, ‘Reuben’ – în calitate de arbuști decorativi și ca sursă de fructe.
3. Soiurile ‘Arapaho’, ‘Triple Crown’, ‘Black Satin’, ‘Loch Ness’, ‘Polar’, ‘Chester’ sunt recomandate pentru fondarea de plantații industriale în R. Moldova. Sunt recomandate criteriile de selectare a terenului (expoziția, compoziția solului, pH-ul solului), metodologia de plantare, procedeele agrotehnice (plantarea, lucrările manuale/mecanice de întreținere a plantelor, tipurile de suporturi, modul de amplasare și de sprijin, condițiile și modul de irigare, tehnica și termenii de tăiere pentru formarea arbustului și de rod, tehnica și termenii de recoltare) în plantațiile de mur din R. Moldova.
- 4.

## Bibliografie

1. Balan V. ș.a Cultura arbuștilor fructiferi și căpșunului, Chișinău: „Bons Offices”, 2017, 434 p.
2. Cachiță-Cosma D. Metode *in vitro* la plantele de cultură. Baze teoretice și practice – București: Ceres, 1987. 276 p.
3. Cachiță-Cosma D., Sand C. Biotehnologie vegetală. vol I: Baze teoretice și practice, Ed. Mira Design, Sibiu, 2000. 288 p.
4. Cachiță-Cosma D. ș. a., Tratat de biotehnologie vegetală, Cluj-Napoca: Dacia, vol 1, 2004, 433 p.
5. Calalb T. *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliot: (structura, biotehnologia, biochimia fructelor), Chișinău: Digital Hardware SRL, 2010, 148 p.
6. Ciorchină N. Realizări și perspective privind cercetări biotehnologice în Grădina Botanică (I) a AȘM, În: Materialele simpozionului Internațional ”Conservarea diversității plantelor”, Chișinău, 2012, p. 89-91.
7. Nisteanu A., Calalb T. Analiza farmacognostică a produselor vegetale medicinale, Chișinău, Medicina, Elan Poligraf, Chișinău, 2016, 316 p.
8. Abd Alla M., Mostafa R. *In vitro* propagagtion of blakberry (*Rubus Fruticosus* L.) Assisut Journal agricultural Sciences, Egypt, (46) Nr. (3) 2015 pag. 88-99.
9. Calalb T., Lozinschii M., Ciorchina N. The comparative morfpho-anathomical study of new cultivars and some species of blackberry, In: Journal of botany, vol. IX, Nr. 1 (14), Chișinău, 2017, pag. 5-14.
10. Calalb T., Oroian S., Samirhitan M. The structures indicatos in definition of chokeberry fruit resistance to environment factors during storage. Modern Phytomorphology, 2<sup>nd</sup> International Scientific Conference on Plant Morphology, Lviv, vol. 4, 2013, pag. 185-188.
11. Calalb T., Ciorchina N., **Lozinschii M.**, Oprea V. Biological and phytochemical study of some new cultivars of blackberry, multiplied by biotechnology *in vitro*. In: The X<sup>th</sup> International Congress of Geneticistis and breeders, Chisinau, 2015, 181 p.
12. Ciorchină N. Cutcovschi-Muștuc A., Lozinschii M. Blackberry – importance, origin and value. In: Journal of botany vol. IX, nr. 2 (15), 2018, Chisinau, pag. 15-22.
13. Lozinschii M., Ciorchină N., Calalb T. Micropropagation of blackberry cultivars – perspectives for Republic of Moldova. In: Marisia, Studii și materiale, vol. XXXV, Științele naturii, 2015, Tîrgu Mureș, pag. 9-17.
14. Wang S., Lin H. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. In: Journal Agric. Food Chem. 2000; vol. 48, pag. 140-146.



15. Ružić D., Lazić T. Micropropagation as means of rapid of newly developed blackberry and black curant cultivars. In: Agriculture Conspects Science, vol. 71(4), 2006, pag. 149-153.
16. Rameshwar Verma, Tushar Gangrade, Rakesh Punasiya, and Chetan Ghulaxe, *Rubus fruticosus* (blackberry) use as an herbal medicine. In: Pharmacogn Rev. vol.8 (16), 2014, pag. 101-104.
17. Zia-Ul-Haq M., et al. *Rubus Fruticosus L.*: Constituents, biological activities and health related uses. In: Molecules, vol 19, 2014, pag.10998-11029.

#### **Publicații la tema tezei**

##### **Articole în diferite reviste științifice:**

1. **Lozinschii M.**, Ciorchină N., Calalb T. Micropropagation of blackberry cultivars – perspectives for Republic of Moldova. In: Marisia, Studii și materiale, Vol. XXXV, Științele naturii, 2015, pag. 9-17.
2. **Lozinschii M.**, Ciorchină N., Morphological and Biological Aspects on Blackberry varieties Acclimatization in *ex vitro*, In: Journal of botany, Chisinau, 2015 nr. 2 (11) Vol 7, pag 27-30.
3. Ciorchină N. Cutcovschi-Muștuc A., **Lozinschii M.** Features of cultivation of blackberry in the Republic of Moldova. In: Journal of botany vol. IX, nr. 2 (15), Chisinau, 2017, pag. 5-14
4. Ciorchină N. Cutcovschi-Muștuc A., **Lozinschii M.** Blackberry – importance, origin and value. In: Journal of botany vol. IX, nr. 2 (15), 2018, Chisinau, pag. 15-22.
5. Calalb T., **Lozinschii M.**, Ciorchina N. The comparative morpho-anatomical study of new cultivars and some species of blackberry, *In vitro* morphogenesis of *Rubus* species, IX, Nr. 1 (14), Chișinău, 2017, pag. 5-14.
6. **Lozinschii Mariana**, *In vitro* morphogenesis of Rubus Species In: Journal of botany vol. IX, nr. 2 (15), Chisinau, 2017, pag. 23-2.
7. **Lozinschii M.**, Ciorchină N. Particularitățile microclonării soiurilor de mur fără spini *Chester* și *Loch Ness*. În: Revista Botanică, vol.V, Nr.3 Chișinău, 2013, pag.15 – 25.

##### **Articole în culegeri științifice**

8. Лозинский М., Чоркинэ Н., Микроклонирование некоторых сортов бесшипной ежевики в культуре *in vitro*. В: Роль Ботанических садов в сохранении разнообразия растений. Материалы Юбилейной Международной Научно-Практической Конференции, 2013 стр. 295-297.

##### **Culegeri de lucrări ale conferințelor naționale**

9. **Lozinschii M.** Introducerea cultivarelor de mur în cultura *in vitro*. În: Tendințe contemporane ale dezvoltării științei, viziuni ale tinerilor cercetători, materialele conferinței internaționale a doctoranzilor, 2016, pag. 200-204.

10. Ciorchină N., **Lozinschii M.** Înmulțirea *in vitro* a unor noi specii de arbuști fructiferi de interes economic pentru Republica Moldova În: „Știința în Nordul Republicii Moldova: realizări, probleme, perspective”, materialele conferinței naționale cu participare internațională (ediția a doua), Bălți, 2016, pag. 50-54.

**Materiale/teze la forurile științifice Conferințe internaționale (peste hotare)**

11. Лозинский М., Чоркинэ Н., Клапа Д. Клонирование *in vitro* некоторых сортов ежевики. Материалы международной научной конференции к 200-летию НБС. Ялта, Украина 2012, стр. 128.
12. **Lozinschii M.**, Ciorchina N., Înființarea colecției de mur în Grădina Botanică, În: Conservarea diversității plantelor *in situ* și *ex situ*, Ediția a IX-a, Iași, 2016, p. 46-47.
13. **Lozinschii M.**, Ciorchină N., The particularities of microcloning blackberry cultivar *Chester*. In: 12<sup>th</sup> Symposium „Prospects for the 3<sup>rd</sup> Millenium Agriculture” 2013, pag. 149.

**Conferințe internaționale în republică**

14. Calalb T., Ciorchina N., **Lozinschii M.**, Oprea V. Biological and phytochemical study of some new cultivars of blackberry, multiplied by biotechnology *in vitro*. In: The X<sup>th</sup> International Congress of Geneticists and breeders, Chisinau, 2015, 181 p.
15. **Lozinschii M.**, Ciorchină N., The characteristics of the *Evergreen* cultivar multiplication through microcloning conservation of plant diversity, International symposium, Chisinau, 2015, pag. 75.
16. **Lozinschii M.**, Ciorchină N., Growth regulators influence on some varieties of blackberry cultivars during the micro-cloning process. International symposium 3<sup>rd</sup> edition `Coservation of plant diversity`, 2014, Chisinau, pag. 20.
17. **Lozinschii M.** Biological Aspects of varieties of blackberry *Chester* and *Thornless Evergreen*, In: Conservation of plant diversity, Internat. symposium, Chisinau, 2015, pag. 74.
18. Trofim M., Ciorchina N., **Lozinschii M.**, Cuzmin E. Adaptation of cultivars of the genus *Rubus* to *ex vitro* conditions, In: Conservation of plant diversity, International symposium, Chisinau, 2015, pag. 111.
19. **Lozinschii M.** Introducerea cultivarelor de mur în cultura *in vitro*. În: Tendințe contemporane ale dezvoltării științei, viziuni ale tinerilor cercetători, materialele conferinței internaționale a doctoranzilor. Chisinau, 2016, pag. 200-204.
20. **Lozinschii M.**, Ciorchina N., Calalb T. The comparative anatomical study of leaves of new blackberry cultivars Simpozionul "Conservation of plant diversity", Chisinau 2017, pag. 42.

## ADNOTARE

**Lozinschii Mariana.** „Morfobiologia și micropropagarea soiurilor de mur fără spini în Republica Moldova” teza de doctor în științe biologice, Chișinău, 2019.

**Structura tezei:** Teza constă din introducere, 4 capitole, concluzii generale și recomandări practice, bibliografie cu 184 de titluri, 10 anexe, 118 pagini text de bază, 19 tabele și 60 figuri. Rezultatele obținute sunt publicate în 23 de lucrări științifice.

**Cuvinte cheie:** Calusogeneză, organogeneză, rizogeneză, cultura *in vitro*, soiuri de mur cultura *ex vitro*, medii nutritive, anatomie, biochimie, *Rubus fruticosus* L.

**Domeniu de studiu:** 164.01 – Botanica

**Scopul tezei:** Elaborarea biotehnologiilor de micropropagare și microclonare a soiurilor de mur fără spini de perspectivă și studiul biomorfologic în condițiile pedoclimatice ale Republicii Moldova.

**Obiectivele tezei:** Identificarea soiurilor de mur donatoare de explant pentru inițierea culturilor *in vitro*. Testarea factorilor biologici, fizici și chimici pentru cultura *in vitro* la soiurile de mur introducte. Elaborarea formulelor mediilor nutritive optime pentru calusogeneză și morfogeneză (caulogeneză, rizogeneză) la fiecare soi. Studiarea particularităților biologice ale vitroplantulelor obținute din soiurile de mur și determinarea condițiilor de aclimatizare în seră și de înființarea a plantațiilor în teren. Studiu anatomic și biochimic comparativ (flavonozide, taninuri, acid ascorbic) la soiurile de mur. Elaborarea schemei biotehnologice de micropropagare a materialului săditor la soiurile de mur de perspectivă și contribuții la fortificarea genofondului GBNI (crearea colecției cu soiuri de mur fără spini).

**Noutatea științifică și originalitatea:** S-a elaborat schema tehnologiei de micropropagare *in vitro* a materialului săditor, necontaminat și omogen. S-au testat și selectat soiurile de mur fără spini rezistente la condițiile pedoclimatice ale R. Moldova și cu calități tehnologice valoroase pentru înființarea plantațiilor industriale. S-au optimizat microtehnicele de cultivare *in vitro* ale calusogenezei și organogenezei la soiuri de mur fără spini de perspectivă. Pentru prima dată a fost efectuat studiul biologic complex la soiurile de mur fără spini: (morfologia, anatomia, biochimia).

**Problema științifică soluționată** constă în elaborarea tehnologiei de obținere *in vitro* a materialului săditor sănătos și omogen la soiurile de mur fără spini ‘Arapaho’, ‘Triple Crown’, ‘Loch Ness’, ‘Black Satin’, ‘Polar’, ‘Chester’, ‘Thornfree’, ‘Smoothstem’, ‘Reuben’, ‘Thornless Evergreen’ de perspectivă pentru R. Moldova. Aceasta a permis înființarea plantațiilor moderne cu material săditor obținut prin cultura *in vitro* în R. Moldova și crearea în GBNI a colecției din 10 soiuri de mur. Rezultatele obținute au permis evidențierea și recomandarea soiurilor de mur fără spini, valoroase cu potențial structural-adaptiv la condițiile R. Moldova.

**Semnificația teoretică:** Rezultatele experimentelor biotehnologice au confirmat noțiunea de bioentitate organospecifică bazată pe principiul totipotenței celulare în culturile *in vitro* pentru regenerarea vitroplantulelor (prin organogeneză și embriogeneză somatică).

**Valoarea aplicativă a cercetărilor:** A fost elaborată schema biotehnologică de obținere a materialului săditor sănătos și omogen la soiuri de mur fără spini pentru R. Moldova. Rezultatele cercetărilor sunt utilizate în Laboratorul de Biotehnologie și Embriologie a GBNI. Materialul săditor obținut a servit ca sursă pentru a iniția crearea colecției din 10 soiuri de mur din GBNI: ‘Loch Ness’, ‘Chester’, ‘Arapaho’, ‘Triple Crown’, ‘Polar’, ‘Black Satin’, ‘Thornfree’, ‘Smoothstem’, ‘Reuben’ și ‘Thornless Evergreen’. Plantele de mur multiplicare *in vitro* au fost în calitate de material săditor pentru înființarea plantațiilor de mur pe arii extinse în R. Moldova.

**Implementarea rezultatelor științifice:** Rezultatele cercetărilor au fost implementate în cadrul programului de cercetare al GBNI. S-a realizat proiectul de transfer tehnologic 13.824.14.178T cu Agenția de Inovare și Transfer Tehnologic în colaborare cu SRL "Rotor". A fost elaborată tehnologia de obținere a materialului săditor avirotic de mur. Au fost realizate contracte cu beneficiari particulari, gospodării țărănești și amatori interesați de soiurile de mur fără spini.

## АННОТАЦИЯ

**Лозинский Мариана.** „Морфобиология и микроразмножение безшипных сортов ежевики в Республике Молдова”. Диссертация на соискание учёной степени доктор биологических наук, Кишинэу, 2019.

**Структура диссертации:** Введение, 4 главы, выводы, практические рекомендации, библиография из 184 наименований, 118 страниц основного текста, 10 приложений, 19 таблиц и 60 фигур, фотографий и диаграмм. Полученные результаты были опубликованы в 23 научных работах.

**Ключевые слова:** каллусогенез, органогенез, ризогенез, культура *in vitro*, культура *ex vitro*, оптимальные питательные среды, биохимия, анатомия, *Rubus fruticosus* L.

**Специальность:** 164.01 – Ботаника.

**Цель:** Биотехнологическая разработка микроразмножения и микроклонирования безшипных, перспективных сортов ежевики и изучение их биоморфологических особенностей в климатических условиях Р. Молдова.

**Задачи:** Определение сортов ежевики в качестве доноров для инициации культивирования *in vitro*. Тестирование биологических, физических и химических факторов безшипных сортов ежевики. Разработка оптимальных питательных сред для каллусогенеза и морфогенеза для каждого сорта. Изучение биологических особенностей витрокультур и определение условий акклиматизации в теплице и инициирование коллекции в НБСИ. Сравнительное анатомическое и биохимическое исследование сортов ежевики.

**Научная новизна и оригинальность:** Была разработана технология микроразмножения качественного посадочного материала, изучены процессы каллусо и морфогенеза. Впервые методом культуры тканей были размножены перспективные безшипные сорта ежевики для промышленного культивирования. Проведено сравнительное анатомическое и биохимическое исследование сортов ежевики с адаптивными признаками к условиям Р. Молдова.

**Решённая научная проблема:** Разработана технология получения однородного, безвирусного посадочного материала, у перспективных сортов, для выращивания в условиях Р. Молдова. Посадочный материал, полученный методом культуры *in vitro*, имеет несомненно важное значение в создании современных плантаций и инициировании в Ботаническом Саду коллекции из безшипных сортов ежевики. Полученные результаты позволили выявить продуктивные, ценные сорта с высоким адаптивным потенциалом.

**Теоретическое значение:** Результаты биотехнологических экспериментов подтверждают новизну органоспецифики, основанной на принципе клеточной тотипотентности культуры *in vitro* регенерации витрокультур (посредством органогенеза и соматического эмбриогенеза).

**Прикладное значение:** Разработана и описана микротехника мультиплицирования *in vitro* тестированных безшипных сортов ежевики. Результаты исследований широко используют в лаборатории Биотехнологии и Эмбриологии (Б. С.). Посадочный материал, полученный в результате исследований, использовали для инициирования коллекции из 10 наиболее перспективных сортов. Также растения культуры *in vitro* были предоставлены для инициирования промышленных плантаций в Республике Молдова.

**Внедрение научных результатов исследований:** Ежегодные отчёты включали разработку технологии размножения качественного посадочного материала. Осуществили ряд коммерческих контрактов с экономическими агентами и проект внедрения технологии 13.824.14.178Т совместно с Агентством по Инновациям и Внедрению Технологий и SRL "Rotor". Материалы исследования будут использованы для промышленного размножения качественного посадочного материала.

## ANNOTATION

**Lozinschii Mariana.** „Morphobiology and micropropagation of thornless blackberry cultivars in the Republic of Moldova”. PhD Thesis in Biology, Chisinau, 2019.

**Thesis structure:** The thesis consists of introduction, four chapters, conclusions and practical recommendations, a bibliography of 184 titles, 10 annexes, 118 basic text pages, 19 tables and 60 figures. The results obtained are published in 23 scientific papers.

**Key words:** Calusogenesis, organogenesis, rhizogenesis, *in vitro* culture, *ex vitro* culture, optimal environments, biologically active substances, anatomy, biochemistry, *R. fruticosus* L.

**Field of study:** 164.01 – Botany

**The aim of the thesis.** Elaboration of micropropagation and microcloning biotechnologies of the perspective cultivars of thornless blackberries and the biomorphological study in the conditions of the Republic of Moldova.

**Objectives of work.** The identification of new cultivars of blackberry to be used as donors of explants for the initiation of *in vitro* culture. The testing of biological, physical and chemical factors for the *in vitro* culture. The elaboration of formulas of growth media optimal for the callogenesis and the morphogenesis of each cultivars. The study of biological features of plantlets of newly created varieties of blackberry cultured *in vitro* and the determination of the necessary conditions for acclimatization under greenhouse conditions and for the creation of plantations in open field. The comparative anatomical and biochemical study of blackberry cultivars. The elaboration of the scheme of the micropropagation technology for the planting material of promising cultivars and contributions to the improvement of the gene pool of the NBGI.

**Scientific novelty and originality.** The scheme of the *in vitro* micropropagation technology for planting material has been elaborated. Cultivars which are resistant to the pedoclimatic conditions of R. Moldova and possess valuable technological characteristics for the creation of industrial plantations, have been tested and selected. The *in vitro* micropropagation techniques of callogenesis and organogenesis of promising thornless blackberry varieties were improved. The complex biological (morpho-anatomical and biochemical) study, of the thornless blackberry varieties has been carried out for the first time.

**The scientific problem solved** consists in the development of the *in vitro* culture technology of a healthy, uniform and homogeneous planting material of promising thornless blackberry cultivars: ‘Arapaho’, ‘Triple Crown’, ‘Loch Ness’, ‘Black Satin’, ‘Polar’, ‘Chester’, ‘Thornfree’, ‘Smoothstem’, ‘Reuben’, ‘Thornless Evergreen’. This fact has made it possible to create modern plantations, in the Republic of Moldova, with planting material obtained by *in vitro* culture and to create, in the NBGI, a collection of 10 blackberry cultivars. All these actions allowed highlighting the valuable varieties with potential for adaptation to the conditions of the Republic of Moldova.

**Theoretical significance.** The results of biotechnological experiments confirmed the notion of organospecific bio-entity, based on the principle of cellular totipotency of *in vitro* cultures for the regeneration of *in vitro* plantlets (by organogenesis and somatic embryogenesis).

**Applicative value.** Establishing *in vitro* multiplication procedures for blackberry cultivars. The results of the research are used in the Laboratory of Biotechnology and Embryology of GBNI. With the plantlets obtained was initiated the collection of 10 blackberry cultivars from GBNI: 'Loch Ness', 'Chester', 'Arapaho', 'Triple Crown', 'Polar', 'Black Satin', 'Thornfree' 'Smoothstem', 'Reuben', 'Thornless Evergreen'. *In vitro* multiplied plants have served as planting material for the establishment of blackberry plantations in the village of Holercani, Dubasari district, in collaboration with "Rotor" SRL.

**Implementation of scientific results.** The results of the research were implemented within the GBNI research program. The technology transfer project 13.824.14.178T was carried out in collaboration with the Agency for Innovation and Technology Transfer and SRL "Rotor". Have been developed the technology for obtaining avirotic seedlings. Contracts have been made with private beneficiaries, farmers and gardeners interested in the thornless cultivars.

**Lozinschii Mariana**

**MORFOBIOLOGIA ȘI MICROPROPAGAREA SOIURILOR DE  
MUR FĂRĂ SPINI ÎN REPUBLICA MOLDOVA**

**164.01 – BOTANICA**

Autoreferatul tezei de doctor în științe biologice

Aprobat spre tipar: 08.02.2019  
Hârtie ofset  
Coli de tipar: 1,6

Formatul hârtiei A4  
Tirajul 80 de exemplare  
Comanda Nr.

SRL „CAVAIOLI”  
Str. Doina, 104, tel. 0-2293-17-17