



UNIVERSITATEA TEHNICĂ A MOLDOVEI
ȘCOALA DOCTORALĂ

Cu titlu de manuscris
C.Z.U: 634.8:631.7:634.835

DUBCEAC MARCELA

BIOTEHNOLOGIA DE OBȚINERE A CLONELOR SĂNĂTOASE
DE VIȚĂ-DE-VIE

411.09 Protecția plantelor

Rezumatul tezei de doctor în științe agricole

CHIȘINĂU, 2026



Teza a fost elaborată în cadrul Laboratorului de Virusologie și Control Fitosanitar a Culturilor Horticole al Institutului Național de Cercetări Aplicative în Agricultură și Medicină Veterinară (IP INCAAMV), Chișinău, Republica Moldova.

Autor: Marcela DUBCEAC

Conducător științific: Victor BONDARCIUC, dr., conf. cercet., IP INCAAMV

Comisia de susținere publică:

1. Valerian BALAN, doctor habilitat, profesor universitar – **președinte**, Universitatea tehnică a Moldovei;
2. Victor BONDARCIUC, doctor, conferențiar cercetător – conducător de doctorat, **membru**, Institutul Național de Cercetări Aplicative în Agricultură și Medicină Veterinară;
3. Olga SOLDATENCO, doctor habilitat, conferențiar cercetător – **membru**, Institutul Național de Cercetări Aplicative în Agricultură și Medicină Veterinară;
4. Leonid VOLOȘCIUC, doctor habilitat, profesor cercetător – **referent**, Universitatea de Stat din Moldova, Institutul de Genetică, Fiziologie și Protecția Plantelor
5. Nichita CROITORU, doctor, conferențiar universitar – **referent**, Universitatea Tehnică a Moldovei;
6. Leonid PRODANIUC, doctor, conferențiar cercetător – **referent**, Institutul Național de Cercetări Aplicative în Agricultură și Medicină Veterinară.

Susținerea publică a tezei va avea loc la 30 ianuarie 2026, ora 14:00, în cadrul ședinței Comisiei de susținere publică din cadrul Universității Tehnice a Moldovei (www.utm.md), la adresa: mun. Chișinău, str. Strada Mircești 42, blocul 14A, sala 100, MD 2049.

Teza de doctorat și rezumatul acesteia pot fi consultate la biblioteca UTM (repository.utm.md) și pe pagina web a ANACEC (www.anacec.md).

Autor:

Marcela DUBCEAC

Conducător științific:

Victor BONDARCIUC, doctor în științe agricole, conferențiar cercetător

© Dubceac Marcela, Universitatea Tehnică a Moldovei, 2026

CUPRINS

REPERELE CONCEPTUALE ALE LUCRĂRII	4
1 BOLILE CRONICE ALE VIȚEI-DE-VIE ȘI NOCIVITATEA ACESTORA	6
2 MATERIALE ȘI METODE DE CERCETARE	8
2.1 Evidențierea candidaților în clone de viță-de-vie	8
2.2 Evaluarea stării fitosanitare a materialului viticol colectat	8
2.3 Metode de asanare a candidaților în clone de viță-de-vie	9
2.4 Cultura <i>in vitro</i> și multiplicarea accelerată a clonelor de viță-de-vie	10
2.5 Evaluarea influenței spectrelor luminoase LED asupra dezvoltării plantelor de viță-de-vie în cultură <i>in vitro</i>	10
3 OBTINEREA CLONELOR ASANATE DE VIȚĂ-DE-VIE	11
3.1 Evaluarea infecțiilor virale în materialul săditor de viță-de-vie din Republica Moldova	11
3.2 Evaluarea cancerului bacterian în materialul săditor de viță-de-vie din Republica Moldova	13
3.3 Obținerea clonelor sănătoase de viță-de-vie prin metoda selecției fitosanitare	14
3.3.1 Evidențierea candidaților în clone de viță-de-vie prin metoda de observare vizuală	14
3.3.2 Diagnosticarea candidaților în clone de viță-de-vie	15
3.4 Asanarea candidaților în clone de viță-de-vie de infecții virale și cancer bacterian	17
3.4.1 Asanarea candidaților în clone de viță-de-vie prin metoda termoterapiei cu apă fierbinte	17
3.4.2 Asanarea candidaților în clone de viță-de-vie împotriva infecțiilor virale	19
3.5 Multiplicarea accelerată a clonelor de viță-de-vie prin metoda culturii <i>in vitro</i>	20
3.6 Înființarea plantațiilor-mamă de categorii biologice Prebază și Bază	24
3.7 Schema biotehnologică pentru obținerea și multiplicarea clonelor sănătoase de viță-de-vie în condițiile Republicii Moldova	25
4 OPTIMIZAREA ELEMENTELOR TEHNOLOGICE DE PRODUCERE A CLONELOR ASANATE DE VIȚĂ-DE-VIE	26
4.1 Evaluarea și implementarea metodelor moleculare de diagnostic al cancerului bacterian la materialul viticol	26
4.2 Influența spectrelor de lumină LED asupra dezvoltării plantelor de viță-de-vie în cultura <i>in vitro</i>	27
4.3 Selectarea mediilor nutritive pentru regenerarea și multiplicarea accelerată <i>in vitro</i> și aclimatizarea <i>ex vitro</i>	29
CONCLUZII GENERALE	29
RECOMANDĂRI PRACTICE	30
BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ	31
LISTA LUCRĂRILOR ȘTIINȚIFICE LA TEMA TEZEI	32
ADNOTARE	33

REPERELE CONCEPTUALE ALE CERCETĂRII

Actualitatea și importanța problemei cercetate. În domeniul viticulturii, apariția unor noi tipuri de boli cronice ale viței-de-vie, îmbunătățirea metodelor de diagnosticare și aplicarea biotehnologiilor pentru obținerea plantelor sănătoase reprezintă direcții de cercetare aflate într-un proces continuu de dezvoltare. Obiectivul principal în acest context este de a elabora clone de viță-de-vie cu randament crescut de struguri de calitate superioară și lipsite de boli precum cele virale, fitoplasmice și cancerul bacterian, pentru a le putea introduce în plantațiile de producție cât mai rapid posibil. În prezent la vița-de-vie au fost depistați mai mulți de 100 de agenți infecțioși, printre care se enumeră virusuri, fitoplasme și bacterii, responsabili de boli sistemice și cronice [8]. În rezultat, țesuturile și plantele atacate rămân bolnave pe durata întregului ciclu vital, iar fiecare organ al acestora devine un vector de infecție în procesul de înmulțire vegetativă, rezultând în obținerea de material de plantare contaminat. Aceste boli se transmit prin intermediul materialului de înmulțire și săditor viticol, prin multiplicarea vegetativă de pe butucii infectați și prin procesul de altoire al unor componente infectate de viță-de-vie [11]. Prin procesul de altoire, există posibilitatea combinării mai multor virusuri sau boli, ale căror efecte sunt dificil de anticipat. Importul de material săditor, schimbul de material săditor sau introducerea necontrolată a unor soiuri noi și portaltoi poate mări considerabil numărul de boli, care în combinație cu noile condiții de mediu, pot avea consecințe grave.

În Republica Moldova, cercetările fitosanitare efectuate în ultimii ani au evidențiat prezența a 11 virusuri care afectează vița-de-vie, precum și a *Candidatus Phytoplasma solani* (*Ca. P. solani*'), agentul cauzal al bolii înnegrirea lemnului (Bois noir), și a bacteriei *Agrobacterium vitis* (*A. vitis*), responsabilă de cancerul bacterian [12]. Printre virusurile identificate, cele mai frecvent întâlnite sunt Grapevine leafroll-associated virus (GLRaV-1, GLRaV-3), Grapevine fleck virus (GFkV) și Grapevine fanleaf virus (GFLV). Cele mai dăunătoare virusuri pot duce la pierderi de 20-70% din toată recolta. Răspândirea virusului GLRaV-3 într-o podgorie franceză, a provocat creșterea incidenței bolii asociate răsucirii frunzelor de la 5% la 86% pe parcursul a opt ani [9]. De asemenea, au fost estimate pierderile economice în statul California (SUA) cauzate de același virus, care au constituit de peste 90 milioane de dolari anual [1]. În cazul virusului GFLV, pierderile de recoltă pot atinge până la 77%, iar daunele economice sunt estimate la circa 16.600 USD/ha, ceea ce face ca această viroză să reprezinte o amenințare majoră pentru viile din întreaga lume [2].

Este cunoscut că unele plante de viță-de-vie pot fi purtătoare de agenți patogeni într-o formă asimptomatică, ceea ce înseamnă că acestea nu prezintă simptome evidente ale bolii. Acest fenomen poate fi influențat de mai mulți factori, cum ar fi concentrația scăzută a agentului patogen, condițiile climatice nefavorabile sau starea generală de sănătate a plantei. Cu toate acestea, chiar și în absența simptomelor vizibile, plantele asimptomatice pot reprezenta o sursă de infecție și pot contribui la diseminarea bolilor cronice. Materialul săditor infectat (coarde altoi, coarde portaltoi, butași altoi, butași portaltoi și butași altoiți) contribuie la răspândirea acestor boli pe întregul areal viticol al Republicii Moldova. Deoarece combaterea bolilor cronice prin aplicarea măsurilor agrotehnice sau chimice nu este eficientă, singura măsură de combatere a acestor boli este obținerea de clone sănătoase de viță-de-vie și cultivarea lor în condiții, care previn reinfectarea și asigură menținerea stării fitosanitare a materialului biologic [10]. Selecția fitosanitară reprezintă o metodă eficientă de prevenire a extinderii bolilor de etiologie virotică, fitoplasmatică și bacteriană,

prin eliminarea indivizilor afectați. Acest proces implică o serie de etape interconectate, având ca rezultat obținerea de clone sănătoase, destinate înființării plantațiilor-mamă de categorii biologice superioare Prebază și Bază.

Descrierea situației în domeniul de cercetare. La sfârșitul anilor '60, Uniunea Europeană a coordonat eforturile țărilor membre pentru a standardiza selecția și certificarea materialului săditor viticol printr-o directivă (68/193/CE din 1968), care reglementa comercializarea butașilor de viță-de-vie. Actualmente, procesul de producere este guvernat de un cadru legislativ unitar (Regulamentul (UE) 2016/2031, Directiva 2008/90/CE, Regulamentul (UE) 2017/625) și de standardele EPPO (seria PM 4), care detaliază modalitățile de menținere și multiplicare a plantelor testate negativ la principale boli ale viței-de-vie. Pe parcursul anilor, legislația Uniunii Europene a fost actualizată, iar prin Regulamentul de punere în aplicare (UE) 2019/2072 al Comisiei a fost instituită obligația absenței totale (toleranță zero) a unor virusuri reglementate în materialul viticol destinat plantării. Astfel, pentru virusurile GFLV, ArMV, GLRaV-1, GLRaV-3, precum și GFkV (doar pentru portaltoi), nu este admisă prezența acestora [7].

Republica Moldova a făcut pași importanți spre integrarea în spațiul european și internațional, adoptând un program național de certificare a materialului de înmulțire viticol, prin care au fost stabilite standarde și proceduri stricte pentru a asigura că materialul viticol destinat multiplicării este sănătos și lipsit de virusurile GLRaV, GFLV, GFkV, GRSPV [9]. Legislația națională face referire și la prezența unor boli de importanță fitosanitară majoră, precum cancerul bacterian și îngălbenirea aurie (*Flavescence dorée*). Conform sistemului național de certificare, materialul este clasificat în următoarele categorii: Prebază, Bază, Certificat și Standard, fiecare cu cerințe specifice privind starea fitosanitară.

În prezent, producția de butași altoiți se bazează pe vițele colectate din plantațiile industriale, ceea ce face ca starea fitosanitară a materialului săditor cultivat să reflecte starea plantațiilor de viță-de-vie din țară. O analiză recentă a plantațiilor viticole din Republica Moldova a relevat prezența bolii fitoplasmatică înnegrirea lemnului în toate zonele de cultivare a viței-de-vie, cu o incidență variind între 1% și 100%.

Testările fitosanitare efectuate în Laboratorul de Virusologie și Control Fitosanitar Culturilor Horticole (LVCFC) au evidențiat o incidență înaltă a bolilor de etiologie virotică, ce persistau în plante în forma latentă. Virusurile GLRaV-1 și GLRaV-3, au fost detectate în proporții cu valori cuprinse între 8-26% și 7-39% respectiv. Testările efectuate au evidențiat o incidență considerabilă a agentului patogen *A. vitis*, responsabil de cancerul bacterian al viței-de-vie, cu rate de infecție variind între 26% și 44% [3].

Reieșind din cele expuse, pentru a asigura o producție viticolă sustenabilă și competitivă, este necesar de înființat plantații-mamă de categorii biologice superioare, care să asigure baza pentru obținerea materialului săditor certificat, în conformitate cu normele și standardele naționale și europene. Această abordare este esențială pentru reducerea riscului de infecție în plantațiile viticole, contribuind la sporirea productivității și longevității viței-de-vie.

Scopul lucrării este perfecționarea tehnologiei de obținere a clonelor sănătoase de viță-de-vie, în baza metodelor moderne de diagnostic, asanare și multiplicare, în scopul înființării plantației-mamă de categorie biologică Bază.

Obiectivele propuse pentru realizarea scopului lucrării au fost următoarele: determinarea spectrului agenților patogeni fitosanitari și a gradului de infectare a materialului săditor viticol în condițiile Republicii Moldova; elaborarea regimurilor optime de termoterapie pentru asanarea

plantelor inițiale infectate cu agenți patogeni ai bolilor cronice ale viței-de-vie; perfecționarea metodelor de diagnostic fitosanitar al cancerului bacterian la vița-de-vie; optimizarea condițiilor de cultivare a viței-de-vie în cultură *in vitro* pentru creșterea eficienței de multiplicare prin metoda de microbutășire; obținerea și multiplicarea accelerată a clonelor inițiale de viță-de-vie pentru plantarea plantației-mamă de categoria biologică Bază.

Ipoteza științifică: aplicarea biotehnologiilor moderne va permite reducerea semnificativă a perioadei necesare pentru obținerea clonelor asanate de viță-de-vie, facilitând astfel înființarea rapidă a plantațiilor-mamă de categoria biologică Bază.

Metodologia cercetărilor științifice: cercetările au fost realizate în baza unei metodologii științifice complexe, structurate în etape succesive de planificare, organizare, desfășurare a experimentelor și interpretare a rezultatelor, în conformitate cu obiectivele generale și specifice ale lucrării. Activitatea științifică s-a axat pe evaluarea stării fitosanitare a materialului săditor de viță-de-vie și aplicarea biotehnologiilor pentru obținerea și multiplicarea clonelor sănătoase, destinate înființării plantațiilor-mamă de categorie biologică superioară.

Semnificația teoretică: lucrarea contribuie la fundamentarea științifică a diagnosticului și tratamentului bolilor virale și cancerului bacterian ale viței-de-vie, oferind metode eficiente pentru identificarea și eliminarea agenților patogeni; de asemenea, dezvoltă baza teoretică aplicabilă pentru utilizarea culturii *in vitro* în multiplicarea accelerată a materialului asanat.

Valoarea aplicativă: clonele inițiale obținute au fost utilizate la înființarea plantației-mamă de categorie biologică Prebază. Materialul obținut din aceste plantații servește ca sursă pentru fondarea plantațiilor de categorie Bază, asigurând producerea de material săditor certificat, în conformitate cu standardele naționale.

Implementarea rezultatelor științifice: butașii de viță altoi și portaltoi din plantația-mamă de categorie biologică Bază sunt livrați către pepinierele viticole din Republica Moldova pentru producerea materialului săditor certificat și înființarea plantațiilor viticole comerciale.

1 BOLILE CRONICE ALE VIȚEI-DE-VIE ȘI NOCIVITATEA ACESTORA

Bolile cronice ale viței-de-vie, cum ar fi bolile virale, fitoplasmatică și cancerul bacterian, afectează plantele într-un mod sistemic și persistent, ceea ce înseamnă că țesuturile infectate rămân bolnave pe toată durata vieții plantei. Aceste boli împiedică vița-de-vie să își atingă potențialul maxim al soiului, reducând rezistența la factorii de mediu nefavorabili și crescând susceptibilitatea la alți agenți patogeni. În plus, ele afectează calitatea altoilor și a portaltoiurilor, scad randamentul și calitatea recoltei, precum și capacitatea de depozitare a acestora [10]. Plantele infectate prezintă modificări fiziologice complexe, cum ar fi: alterarea expresiei genelor, dezechilibre hormonale, modificări în metabolismul carbohidraților, scăderea potențialului fotosintetic, creșterea ratei respirației și interferențe în transportul electronilor în fotosistemele I și II. De asemenea, virusurile determină reducerea nivelurilor de clorofilă, acumularea de zaharuri în frunze și dificultăți în translocarea acestor zaharuri către țesuturile de depozitare sau către boabele de struguri. Deoarece aceste boli sunt cronice și sistemice, înmulțirea vegetativă din butucii infectați duce la producerea de material săditor contaminat, favorizând astfel răspândirea virusurilor în plantațiile viticole.

Este cunoscut faptul că virusurile, viroizii, fitoplasmele și bacteriile sunt principalii agenți patogeni ai culturilor agricole în ansamblu, dar în special ai celor înmulțite vegetativ. Vița-de-vie, fiind o cultură lemnoasă, găzduiește cel mai mare număr de astfel de agenți infecțioși intracelulari.

Acest material diseminează patogenii și vectorii acestora, pe distanțe lungi astfel încât, atunci când este plantat în câmp, servește drept sursă de inocul pe locul nou pentru răspândirea secundară mediată de vectori. Până în prezent, la vița-de-vie au fost identificați peste 100 de agenți patogeni intracelulari, inclusiv 101 virusuri, 5 viroizi, 8 fitoplasme și diverse specii de bacterii. Acesta reprezintă cel mai mare număr de astfel de patogeni raportat vreodată la o singură cultură [8].

1.1 Studiul bolilor virale și bacteriene ale viței-de-vie în Republica Moldova.

Schema de producere a clonelor devirozate

Cercetarea virusurilor care afectează vița-de-vie în Republica Moldova a început în perioada postbelică. Prima boală virală identificată a fost scurt-nodarea, descrisă de savantul Verderevșchi D.D. Ulterior, în anul 1973, Marinescu V.G. a studiat în detaliu izolatul moldovenesc al acestui virus, determinând temperatura de inactivare în suc (50-52 °C). Utilizând microscopul electronic, a observat particule virale de formă izometrică, cu diametrul de aproximativ 28-30 nm, caracteristice virusului scurt-nodare. Pentru combaterea bolilor de etiologie virotică și bacteriană, a fost aplicată metoda termoterapiei cu apă fierbinte, utilizată de Țurcan I.G. și Bondarciuc V.V. Iar la începutul anilor 80, a fost elaborată o tehnologie pentru producerea clonelor de viță-de-vie libere de agenți patogeni de etiologie virotică (fig. 1.1).

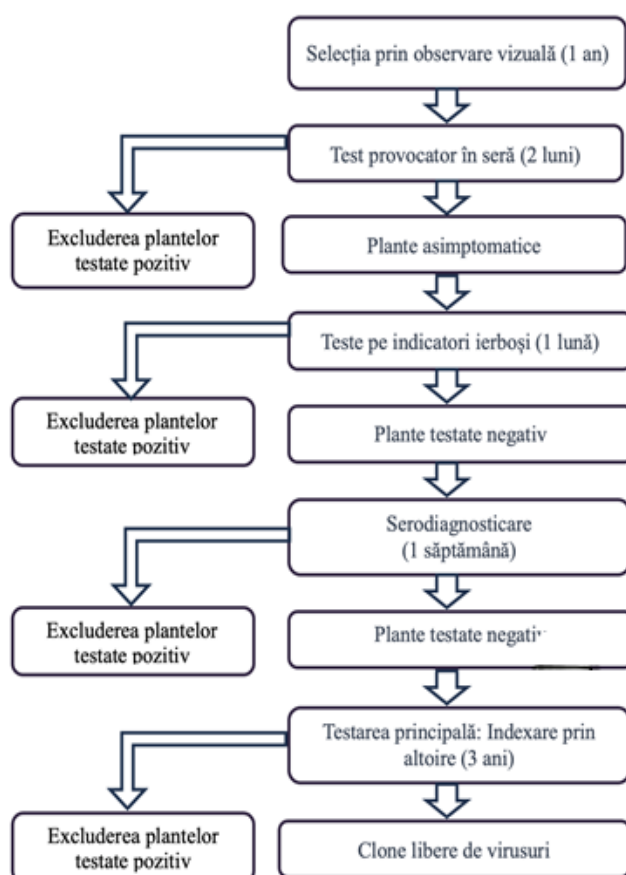


Fig. 1.1 Schema de producere a clonelor de viță-de-vie libere de boli virotice în Republica Moldova, implementată în 1980 [12]

2 MATERIALE ȘI METODE DE CERCETARE

Cercetările au fost realizate în perioada 2018–2025 în cadrul Laboratorului de Virusologie și Control Fitosanitar a Culturilor Horticole (LVCFCH) al IP INCAAMV (fostul IP IȘPHTA). Studiile au fost desfășurate în condiții de laborator, utilizând material vegetal provenit din plantații viticole, seră și camere termostate. Materialul biologic utilizat în studiu a inclus genotipuri de viță-de-vie aparținând speciei *Vitis vinifera* L., din familia *Vitaceae*, ordinul *Vitales*. De asemenea, au fost incluși hibrizi interspecifici utilizați ca portaltoi.

2.1 Evidențierea candidaților în clone de viță-de-vie

În scopul selectării materialului biologic inițial pentru obținerea clonelor fitosanitare de viță-de-vie, au fost efectuate inspecții ale parcelor de selecție și ale plantațiilor viticole amplasate în diferite regiuni ale Republicii Moldova. Lucrările de evidențiere a candidaților în clone s-au realizat prin metoda inspecției vizuale a parcelelor de selecție din cadrul IP INCAAMV, a plantațiilor comerciale de soiuri europene și autohtone de viță-de-vie, precum și a plantațiilor-mamă de portaltoi. Vârsta plantațiilor evaluate a variat între 30 și peste 40 de ani, acestea reprezentând un material valoros pentru aprecierea potențialului genetic și fitosanitar al soiurilor.

În cadrul cercetării au fost utilizate genotipuri de viță-de-vie din trei categorii de soiuri. **Soiuri autohtone:** Busuioaca de Bohotin, Busuioaca de Moldova, Copceac, Feteasca albă, Feteasca regală, Fetească neagră, Frâncușa, Negru de Căușeni, Plăvaie, Rară neagră, Telti Curuc, Zghihara de Huși; **soiuri de selecție nouă:** Apiren roz, Basarabia, Chișmiș lucistâi, Codrinschii, Legenda, Luminița, Meleag, Moldova, Muscat de Ialoveni, Onițcanschii belâi, Tudor; **soiuri europene:** Pinot noir, Pinot gris, Chardonnay, Cabernet Sauvignon, Merlot. Evidențierea candidaților în clone din soiurile de portaltoi Berlandieri × Riparia SO4, Berlandieri × Riparia Kober 5BB și Riparia × Rupestris 101-14 Mgt a fost efectuată în colecția de soiuri din cadrul IP INCAAMV. Soiul Maleque manifestă o combinație favorabilă de trăsături: toleranță la factori abiotici, comportament bun în altoire și a provenit din plantația de portaltoi din localitatea Geamăna, raionul Anenii Noi.

2.2 Evaluarea stării fitosanitare a materialului viticol colectat

Pentru realizarea evaluării fitosanitare a materialului săditor viticol, a fost analizat un eșantion format din 383.350 de butași altoiți de viță-de-vie, proveniți din 26 de loturi comerciale, colectate din pepiniere viticole amplasate în diferite regiuni ale Republicii Moldova. Testările au vizat identificarea principalilor agenți patogeni de etiologie virotică și bacteriană: virusul scurt-nodării (GFLV), virusul răsucirii frunzelor tip 1 (GLRaV-1), virusul răsucirii frunzelor tip 3 (GLRaV-3), precum și bacteriile patogene din complexul *Agrobacterium spp.* Repartiția eșantionului analizat, în funcție de categoria biologică a soiurilor, a fost următoarea: soiuri autohtone – 118.400 buc.; soiuri de selecție nouă – 62.100 buc.; soiuri europene – 202.850 buc.

Evaluarea stării fitosanitare a candidaților în clone a fost realizată în două etape distincte, desfășurate pe parcursul perioadei de vegetație. Prima etapă de monitorizare a fost efectuată în faza de înflorire a viței-de-vie. În această perioadă, au fost excluși butucii care prezentau simptome de boli: scurt-nodarea viței-de-vie, mozaicul galben, mozaicul nervurilor, boala fleck și enaștinea.

În a doua etapă, au fost eliminați candidații care manifestau simptomele bolilor: răsucirea frunzelor mozaicul galben, îngălbenirea aurie, strierea lemnului și cancerul bacterian al viței-de-vie.

Pregătirea probelor pentru testare. Coardele de viță-de-vie prelevate au fost fragmentate mecanic, iar rumegușul rezultat a fost repartizat în două recipiente separate. În primul recipient s-au adăugat 5 ml de soluție tampon extractivă Liske (utilizată pentru izolarea agentului *A. vitis*). În cel de-al doilea recipient a fost introdusă soluția tampon PBST-Tween (Phosphate buffered saline cu Tween 20), destinată extracției antigenului viral.

Testarea pentru virusuri. Testarea materialului biologic pentru prezența virusurilor a fost realizată prin metoda serologică ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), conform protocolului dezvoltat de Clark și Adams, cu utilizarea seturilor comerciale de diagnostic AgriTest. Virusurile analizate au inclus: GFLV (Grapevine fanleaf virus – virusul scurt-nodării), GLRaV-1 și GLRaV-3 (Grapevine leafroll – associated viruses – virusurile răsucirii frunzelor), GFkV (Grapevine fleck virus – virusul marmorării), GVA (Grapevine virus A).

Testarea pentru cancer bacterian prin metoda microbiologică a fost realizată în scopul identificării formelor latente ale cancerului bacterian, cauzat de bacteriile din complexul *Agrobacterium spp.*, în special *A. vitis* și *A. tumefaciens*. Pentru prepararea probelor, porțiuni lignificate de coardă au fost fragmentate mecanic, iar rumegușul obținut a fost împărțit în recipiente sterile. În fiecare recipient s-au adăugat 5 ml de mediu nutritiv lichid Liske care a servit drept mediu potrivit pentru multiplicarea bacteriilor patogene prezente în probe. Probele au fost incubate timp de 24 ore la temperatura de 27 °C într-un termostat de tip Boeco SI-22.

După perioada de incubare, 100 μl din suspensia obținută au fost însămânțați pe mediu semiselectiv Roy și Sasser utilizat pentru izolarea bacteriilor *Agrobacterium spp.* Plăcile Petri au fost incubate la 27 °C timp de 7 zile într-un termostat de tip Boeco SI-22 (Germania). Examinarea coloniilor a fost realizată vizual și cu ajutorul unei lupe, pentru identificarea trăsăturilor morfologice caracteristice tulpinilor *Agrobacterium spp.*: aspect alb, convex, lucios, cu margini regulate și centru pigmentat roșu.

Testarea la prezența cancerului bacterian prin metoda PCR. Diagnosticul molecular a fost realizat cu ajutorul kitului comercial „PCR *Agrobacterium vitis*”, dezvoltat de compania Qualiplante. Reacția PCR a fost efectuată cu utilizarea markerilor moleculari pentru genele *pehA*, *virD* și *virF*, care permit diferențierea între tulpinile patogene și nepatogene ale genurilor *A. vitis* și *A. tumefaciens*. Pentru analiza produselor PCR s-au utilizat markeri de greutate moleculară de 100 bp, 200 bp și 1 kb, precum și colorantul intercalant bromură de etidiu. Fiecare probă a fost testată în dublu, iar reacțiile PCR au fost repetate pentru confirmarea rezultatelor.

2.3 Metode de asanare a candidaților în clone de viță-de-vie

Tratamentul termic cu apă fierbinte. Pentru aplicarea acestei metode, a fost utilizat un termostat de laborator LP-516, model 1387, echipat cu sistem de reglare a temperaturii și agitator integrat, care a asigurat menținerea uniformă a regimului termic în masa de apă. Studiul viabilității mugurilor după tratament termic cu apă fierbinte, a fost efectuat pe soiurile Aligote și Pinot blanc. Materialul biologic utilizat pentru asanare fost soiul Meleag (cifru T2-19-25), reprezentat de coarde de viță-de-vie, prelevate de la plante testate pozitiv pentru prezența bacteriilor din complexul *Agrobacterium spp.* Coardele au fost fragmentate în segmente de câte 2 ochi, etichetate și grupate corespunzător, apoi scufundate în apa la temperatura de 50±1 °C timp de 45 minute.

Condițiile de tratament au fost stabilite în conformitate cu fișa tehnică a proiectului WINETWORK și cu recomandările metodologice internaționale EPPO și OIV privind tratamentul cu apă fierbinte al materialului viticol.

Tratamentul cu aer fierbinte. Termoterapia cu aer fierbinte a fost aplicată candidaților în clone ai soiului Codrinschii (cifrele I-9-7-4 și I-9-8-1). Tratamentul a fost realizat în camere de termoterapie de tip KK 500 TOP+FIT, dotate cu sistem de convecție forțată a aerului și control digital al temperaturii, care asigură menținerea constantă a parametrilor de tratament. Condițiile aplicate au constat în expunerea materialului la o temperatură de 37–38 °C, în conformitate cu principiile fitosanitare de asanare recomandate de OIV și EPPO.

2.4 Cultura *in vitro* și multiplicarea accelerată clonelor inițiale de viță-de-vie

Prepararea mediilor nutritive. Pentru inițierea, multiplicarea și aclimatizarea culturilor *in vitro* de viță-de-vie au fost utilizate două tipuri principale de medii nutritive: mediu nutritiv solid pe bază de agar pentru faza de inoculare și mediu artificial „Biona-311” pentru etapele de micropropagare și adaptare la condițiile *ex vitro*. La etapa de inoculare a fost utilizat mediu nutritiv Murashige și Skoog (1962) modificat cu o concentrație de la ½ a concentrației standard a sărurilor anorganice, IAA la o concentrație de 1 mg/L, 2iP la o concentrație de 0,5 mg/L, pH reglat la 6.2 cu pH-metru Hanna HI 5522, și agar cu o concentrație de 4,5 g/L. În plus, mediul a fost suplimentat cu mio-inositol 100 mg/L și FeEDTA 56 mg/L. Substanțele chimice au fost dizolvate în apă distilată și completate până la volumul final cu cilindru cotelat.

Multiplicarea accelerată. Plantele regenerare de viță-de-vie au fost multiplicare prin metoda culturii *in vitro*, în condiții aseptice, sub hota cu flux laminar, utilizând containere de plastic. Pentru susținerea creșterii și dezvoltării microbutașilor, a fost utilizat substrat nutritiv „Biona-311”, îmbogățit cu macro- și microelemente, conform compoziției elaborate de savantul Soldatov V. Regenerarea și funcționarea substraturilor ionitice a fost desfășurată prin includerea unui conținut specific de săruri minerale, după cum urmează (mg/L): K^+ – 0,27; NH_4^+ – 0,03; Ca^{2+} – 1,47; Mg^{2+} – 0,73; Fe^{3+} – 0,05; NO_3^- – 0,69; SO_4^{2-} – 0,48; $H_2PO_4^-$ – 0,054; Na^+ – 0,07; Cl^- – 0,025. Compoziția a fost completată cu microelemente esențiale: Mn – 0,22; Cu – 0,064; Zn – 0,057; Co – 0,015; Mo – 0,044. Gradul de regenerare al mediului nutritiv a fost monitorizat prin măsurarea conductivității electrice, utilizând ionometru Hanna HI 5522.

2.5 Evaluarea influenței spectrelor luminoase LED asupra dezvoltării plantelor de viță-de-vie în cultură *in vitro*

Pentru evaluarea influenței factorilor de iluminare asupra proceselor morfogenetice și fotosintetice ale plantelor de viță-de-vie în cultura *in vitro*, a fost organizat un experiment dedicat comparării diferitelor spectre de lumină LED. Studiul a fost realizat pe soiul Feteasca regală, utilizând trei tipuri de surse de iluminare LED cu spectru complet (400–700 nm). Sursa de lumină „alb-rece” (5950 ± 50 K), cu PPFD max de 63 $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ și DLI max de 4,05 $\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{zi}^{-1}$; Sursa de lumină „alb-cald” (3200 ± 50 K), cu PPFD max de 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ și DLI max de 2,04 $\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{zi}^{-1}$; Sursa de lumină „Fito” (≤1700 K), cu PPFD max de 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ și DLI max de 1,64 $\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{zi}^{-1}$. Fiecare raft de cultură a fost iluminat cu trei bare LED, instalate la o distanță de 40 cm deasupra vitroplantelor. Spectrele de emisie ale lămpii au fost înregistrate cu ajutorul monocromatorului MDR-23, conectat la amplificatorul lock-in UNIPAN RS-232 și la un convertor analog-digital (ADC). Luxmetria a fost efectuată cu luxmetru CEM DT-1308.

3 OBȚINEREA CLONELOR ASANATE DE VIȚĂ-DE-VIE

3.1 Evaluarea infecțiilor virale în materialul săditor de viță-de-vie din Republica Moldova

La momentul actual în Republica Moldova nu există plantații-mamă altoi de viță-de-vie. Coardele destinate producerii butașilor altoiți sunt recoltate din plantații industriale existente, astfel încât starea fitosanitară a materialului săditor cultivat corespunde stării plantațiilor viticole. Probele au fost colectate din loturi de butași crescuți în pepinierele din Republica Moldova, în cantități de la 5000 de bucăți sau mai multe, din soiuri de viță-de-vie pentru masă și tehnice, astfel încât să reflecte obiectiv starea fitosanitară a întregului lot (tabelul 3.1). Pentru testare, au fost prelevate mostre de material vegetal în formă de butași altoiți și înrădăcinați de un an.

Tabelul 3.1 Evaluarea infecțiilor virale în materialul săditor de viță-de-vie din soiuri autohtone din Republica Moldova (2018-2023)

Nr. crt.	Soi/portaltoi	Cantitatea lotului (buc.)	Cantitatea testată (buc.)	Probe testate pozitiv virale /%			Total probe infectate/%
				GFLV	GLRV-1	GLRV-3	
1	Feteasca Neagră/ BxR Kober 5BB	12000	10	4/40	3/30	2/20	9/90
2	Feteasca Regală/ BxR Kober 5BB	9000	10	1/10	1/10	0	2/20
3	Feteasca Regală/ BXR SO4	9400	10	5/50	4/40	2/20	11/100
4	Feteasca Neagră/ BxR SO4	31000	30	0	0	0	0
5	Rară Neagră/ BxR Kober 5BB	29600	20	0	0	0	0
6	Feteasca Neagră/ BxR Kober 5BB	27400	25	0	0	0	0
Total:		118400	105	10 /9,5%	8 /7,6%	4 /3,8%	22 /20,9%

În aceeași perioadă, a fost realizată testarea infecțiilor virale și în materialul săditor provenit din soiuri de selecție nouă, iar datele respective sunt prezentate în tabelul 3.2.

Tabelul 3.2 Evaluarea infecțiilor virale în materialul săditor de viță-de-vie din soiuri de selecție nouă din Republica Moldova (2018-2023)

Nr. crt.	Soi/portaltoi	Cantitatea lotului (buc.)	Cantitatea testată (buc.)	Probe testate pozitiv la infecții virale /%			Total probe infectate/%
				GFLV	GLRV-1	GLRV-3	
1	Moldova/ BxR Kober 5BB	5000	15	0	2/13,33	0	2/13,33
2	Viorica/ BxR SO4 cl.5	23400	20	6/30	2/20	2/10	10/50
3	Moldova/ BxR Kober 5BB	5000	10	1/10	0	3/30	4/40
4	Riton/ BxR SO4	5500	10	0	0	1/10	1/10
5	Codreanca/ BxR Kober 5BB	10000	10	0	0	1/10	1/10
6	Bianca/ BxR SO4	13200	10	1/10	0	1/10	2/20
7	Viorica/ BxR SO4	15000	15	0	4/26,7	0	4/26,7
Total:		62100	75	8 /10,7%	8 /10,7%	8 /10,7%	24 /32%

Rezultate prezentate în tabelul 3.2 indică faptul că, materialul săditor din soiuri de selecție nouă prezintă un grad de infecție mai ridicat comparativ cu cel din soiurile autohtone și infecțiile virale persistă în toate loturile studiate.

Al treilea eșantion testat include butași de viță-de-vie, crescuți în pepinierele viticole din Republica Moldova din soiuri europene. Rezultatele testării sunt prezentate în tabelul 3.3.

Tabelul 3.3 Evaluarea infecțiilor virale în materialul săditor de viță-de-vie din soiuri europene din Republica Moldova (2018-2023)

Nr. crt.	Soi/portaltoi	Cantitatea lotului (buc.)	Cantitatea testată (buc.)	Probe testate pozitiv /%			Total probe infectate/%
				GFLV	GLRV-1	GLRV-3	
1	Saperavi/ BxR SO4	9000	10	3/30	2/20	1/10	6/60
2	Muscat Ottonel/ BxR Kober 5BB	12000	10	1/10	1/10	1/10	3/30
3	Cabernet-Sauvignon/ BxR Kober 5BB	12000	10	0	0	0	0
4	Merlot cl.348/ BxR SO4	6000	10	0	0	0	0
5	Sauvignon/ BxR SO4	8700	10	0	4/40	2/20	6/70
6	Pinot Gris / BxR SO4	35900	30	3/10	0	3/10	6/20
7	Saperavi / BxR SO4	25500	20	0	2/10	0	2/10
8	Sauvignon/ BxR Kober 5BB	12500	10	0	2/20	1/10	3/30
9	Merlot/ BxR SO4	22500	20	0	0	0	0
10	Aligote/ BxR Kober 5BB	5000	10	1/10	1/10	1/10	3/30
11	Muscat de Hamburg cl.202/ BxR Kober5BB	10000	10	0	0	3/30	3/30
12	Cardinal/ BxR 101-14	20000	20	0	0	0	0
13	Cabernet Sauvignon/ BxR SO4	23750	20	0	0	0	0
Total:		202850	190	8 /4,2%	12 /6,3%	12 /6,3%	32 /16,84%

Analiza datelor din tabelele 3.1, 3.2 și 3.3 evidențiază diferențe semnificative între materialul săditor de viță-de-vie din soiurile autohtone, selecție nouă și soiurile europene din Republica Moldova, în ceea ce privește infecțiile virale. Cea mai mare rată medie de infecție a fost observată la soiurile de selecție nouă, unde a fost înregistrat un procent de 32%. În aceste loturi, virusurile GFLV, GLRaV-1 și GLRaV-3 au fost depistate în proporții de câte 10,66% fiecare. Iar soiurile autohtone prezintă un nivel scăzut de infecție virală comparativ cu cele de selecție nouă sau cu soiurile europene. De exemplu, virusul *GLRaV-3* a fost depistat la 3,8% din probele testate în materialul săditor autohton, ceea ce indică o incidență relativ scăzută a acestui patogen. Această situație poate fi explicată prin faptul că soiurile autohtone au început să fie propagate pe scară largă abia în ultimii ani, pe fondul interesului tot mai crescut al viticultorilor pentru valorificarea resurselor genetice locale. În schimb, soiurile de selecție nouă, promovate mai intens în cadrul programelor de înnoire a plantațiilor, au fost utilizate frecvent ca material de înmulțire, ceea ce ar putea explica rata mai înaltă de infecție virală identificată în loturile respective.

Evaluarea a fost realizată pe baza unui eșantion format din 26 de loturi, în cantitate de

383 350 de butași de viță-de-vie. Dintre aceștia, 370 au fost testați, iar 78 s-au dovedit a fi infectați, ceea ce corespunde unei rate de infecție de 21%, respectiv fiecare al cincilea butaș de viță-de-vie fiind purtător al uneia sau mai multor infecții virale. Rezultatele testării au evidențiat rate variabile de infecție în funcție de natura virusului. Astfel, virusul GFLV a înregistrat o rată de infecție de la 0% până la 50%; virusul GLRaV-1 a variat între 0% și 40%; virusul GLRV-3 a fost depistat în intervalul 0% - 30%. Cele mai frecvente virusuri identificate au fost GLRV-1 și GFLV cu o rată medie de 8,2% și respectiv 8,1%, iar cel mai rar GLRV-3 diagnosticat în medie la 6,9%. Este important de menționat, că virusul GFLV nu a fost detectat niciodată de unul singur, dar este prezent întotdeauna în combinație cu alte virusuri, fiind cel mai frecvent asociat cu GLRV-3.

3.2 Evaluarea cancerului bacterian în materialul săditor de viță-de-vie din Republica Moldova

În perioada 2018-2023, în cadrul LVCFCFCH, a fost testat materialul săditor provenit din gospodăriile viticole la prezența *A. vitis*. Rezultatele testării prezenței cancerului bacterian în materialul săditor de viță-de-vie din soiuri autohtone sunt prezentate în tabelul 3.4.

Tabelul 3.4 Evaluarea *A. vitis* în materialul săditor de viță-de-vie din soiuri autohtone din Republica Moldova (2018-2023)

Nr. crt.	Soi/portaltoi	Cantitatea lotului (buc.)	Cantitatea testată (buc.)	Total probe infectate cu <i>A. vitis</i>	
				bucăți	%
1	Feteasca Neagră/ BxR Kober 5BB	12000	10	3	30
2	Feteasca Regală/ BxR Kober 5BB	9000	10	2	20
3	Feteasca Regală/ BXR SO4	9400	10	0	0
4	Feteasca Neagră/ BXR SO4	31000	30	9	30
5	Rară Neagră/ BxR Kober 5BB	29600	20	12	60
6	Feteasca Neagră/ BxR Kober 5BB	27400	25	15	60
Total:		118400	105	41	39%

Următorul eșantion testat a fost cel din soiuri de selecție nouă, format din 7 loturi și 5 soiuri de viță-de-vie, iar rezultatele examinării privind prezența infecțiilor cu cancer bacterian în materialul săditor de viță-de-vie sunt prezentate în tabelul 3.5.

Tabelul 3.5 Evaluarea *A. vitis* în materialul săditor de viță-de-vie din soiuri de selecție nouă din Republica Moldova (2018-2023)

Nr. crt.	Soi/portaltoi	Cantitatea lotului (buc.)	Cantitatea testată (buc.)	Total probe infectate cu <i>A. vitis</i>	
				bucăți	%
1	Moldova/ BxR Kober 5BB	5000	15	0	0
2	Viorica/ BxR SO4 cl.5	23400	20	0	0
3	Moldova/ BxR Kober 5BB	5000	10	2	20
4	Riton/ B x R SO4	5500	10	4	40
5	Codreanca/ BxR Kober 5BB	10000	10	0	0
6	Bianca/ BxR SO4	13200	10	3	30
7	Viorica/ BxR SO4	15000	15	3	30
Total:		62100	75	24	32%

În contextul evaluării prezenței bacteriei *A. vitis* în materialul săditor de viță-de-vie din soiuri europene, au fost examinate loturi din pepinierele viticole din Republica Moldova, iar rezultatele sunt prezentate în tabelul 3.6. Eșantionul studiat a inclus 202.850 de butași, din care 190 au fost testați, iar 41 s-au dovedit infectați, ceea ce prezintă o rată medie de infecție de 21,6%.

Tabelul 3.6 Evaluarea *A. vitis* în materialul săditor de viță-de-vie din soiuri europene din Republica Moldova (2018-2023)

№	Soi/ portaltoi	Cantitatea lotului (buc)	Cantitat ea testată (buc)	Total probe infectate	
				buc.	%
1	Saperavi/ BxR SO4	9000	10	2	20
2	Muscat Ottonel/ BxR Kober 5BB	12000	10	1	10
3	Cabernet-Sauvignon/BxR Kober 5BB	12000	10	1	10
4	Merlot cl.348/BxR SO4	6000	10	1	10
5	Sauvignon/ BxR SO4	8700	10	2	20
6	Pinot Gris / BxR SO4	35900	30	0	0
7	Saperavi / BxR SO4	25500	20	6	30
8	Sauvignon/ BxR Kober 5BB	12500	10	2	20
9	Merlot/BxR SO4	22500	20	10	50
10	Aligote/ BxR Kober 5BB	5000	10	1	10
11	Muscat de Hamburg/ BxR Kober5BB	10000	10	3	30
12	Cardinal/ BxR 101-14	20000	20	8	40
13	Cabernet Sauvignon/BxR SO4	23750	20	4	20
Total:		202850	190	41	21,6%

Conform datelor din tabelele 3.1- 3.6 concluzionăm, că materialul săditor viticol crescut în pepinierele din Republica Moldova este afectat de diverse boli virale și de cancer bacterian. Infecțiile virale pot fi prezente de una singur, fie în combinații cu două sau trei virusuri. Gradul de afectare al materialului săditor de aceste boli virale variază între 0 și 40%, iar în cazul infecțiilor combinate, procentul de afectare este considerabil mai mare, ajungând până la 100% (ex. Feteasca Regală/BxR SO4). În plus, butașii de viță-de-vie sunt infectați și cu cancer bacterian în forma latentă, cu un grad de infecție care variază între 0 și 60%. Prezența bolilor virale și a cancerului bacterian în materialul săditor reprezintă o amenințare serioasă pentru viticultură, deoarece plantațiile sunt inițial înființate cu butași infectați, afectând astfel creșterea și dezvoltarea viței-de-vie, productivitatea și calitatea recoltei, precum și durabilitatea butucilor. În acest context, este necesar de obținut clone sănătoase de viță-de-vie, pentru a asigura tranziția sectorului pepinierist din Republica Moldova către producerea unui material săditor de categoria biologică Certificat.

3.3 Obținerea clonelor sănătoase de viță-de-vie prin metoda selecției fitosanitare

3.3.1 Evidențierea candidaților în clone de viță-de-vie prin metoda de observare vizuală

În studiu au fost incluși doar butuci lipsite de simptome de boli de etiologie virotică, fitoplasmatică și cancer bacterian. Au fost identificați și marcați un total de 109 butuci de viță-de-vie proveniți dintr-o varietate de soiuri, inclusiv 11 soiuri de selecție nouă, 12 soiuri autohtone, 6 soiuri europene și 4 soiuri portaltoi (tabelul 3.7).

Tabelul 3.7 Clasificarea soiurilor de viță-de-vie luate în cercetare

Nr. crt.	Categoria de soiuri de struguri	Denumirea soiurilor
1	Soiuri de selecție nouă	Apiren roz, Basarabia, Chișmiș lucistâi, Codrinschii, Legenda, Luminița, Meleag, Moldova, Muscat de Ialoveni, Onițcanschii belâi, Tudor;
2	Soiuri autohtone	Copceac, Plăvaie, Telti Curuc, Negru de Căușeni, Feteasca regală, Feteasca albă, Feteasca Neagră, Busuioaca de Bohotin, Busuioaca de Moldova, Rară neagră, Frâncușa, Zghihara.
3	Soiuri europene	Sauvignon, Merlot, Pinot nior, Chardonnay, Pinot gris, Cabernet
4	Soiuri portaitoi	BxR Kober 5 BB, BxR SO4, RxR 101-14, Maleque.

La finalul perioadei de vegetație viței-de-vie, după căderea frunzelor, au fost prelevate coarde de pe butucii marcați, iar plantele care nu prezentau simptome de boală au fost transferate spre etapa de testare.

3.3.2 Diagnosticarea candidaților în clone de viță-de-vie

Analiza infecțiilor la candidații în clone de viță-de-vie din soiuri de selecție nouă.

Pentru a identifica prezența infecțiilor la candidații în clone de viță-de-vie, au fost analizate 39 de plante provenite din 11 soiuri de selecție nouă. Dintre acestea, 11 plante aparțin la 3 soiuri de struguri de selecție nouă cu bobul alb: Luminița – 4 plante, Muscat de Ialoveni – 2 plante și Onițcanschii belâi – 5 plante. Alte 31 de plante provenite din 8 soiuri de struguri de selecție nouă cu bobul roz sau roșu: Apiren roz – 1 plantă, Basarabia – 4 plante, Chișmiș lucistâi – 1 plantă, Codrinschii – 6 plante, Legenda – 1 plantă, Meleag – 3 plante, Codrinschii – 6 plante, Meleag – 3 plante, Moldova – 11 plante și Tudor – 4 plante.

Testarea candidaților în clone din soiuri de selecție nouă de viță-de-vie a arătat că 9 probe din 42 analizate (21,4%) sunt complet libere de infecții virale și cancer bacterian. Printre probele sănătoase se numără următoarele: Luminița (T2-3-40), Onițcanschii belâi (T2-9-16 și TI-9-1-4), Apiren roz (40-42), Basarabia (A-36 (33), Chișmiș lucistâi (5-8-1), Legenda (2-13-6), Moldova (13-1-2) și Tudor (56-3-6), confirmate prin testări repetate în condiții de laborator.

Analiza infecțiilor la candidații în clone de viță-de-vie din soiuri autohtone a fost evaluată în 32 de probe din 11 soiuri de viță-de-vie, dintre care 5 soiuri de struguri cu bobul alb : Frâncușa – 4 plante, Feteasca albă – 1, Feteasca regală – 3 plante; și 6 soiuri cu bobul roșu: Busuioaca de Bohotin – 5 plante, Busuioaca de Moldova – 2 plante, Copceac – 7 plante, Negru de Căușeni – 1 plantă, Rară Neagră – 1 plantă, Zghihara de Huși – 3 plante.

Analiza rezultatelor testării candidaților în clone din soiuri autohtone de viță-de-vie relevă însă că plantele din soiuri cu bob alb au prezentat o frecvență mai mare a infecțiilor virale comparativ cu cele cu bob roșu, în timp ce incidența infecțiilor bacteriene a fost relativ similară între cele două categorii, înregistrând 30,8% la soiurile cu bob alb și 33,3% la cele cu bob roșu. Dintre virusurile identificate, GLRaV-1 a fost identificat cu o frecvență mai mare la soiurile autohtone cu bob alb (30,8%) față de cele cu bob roșu (5,2%). Infecțiile cu virusul GLRaV-3 au fost depistate în proporție de 23% la plantele de viță-de-vie cu bob alb și 10,5% în rândul celor cu bob roșu. Virusul GfKV a fost diagnosticat în 23% din probele provenite din soiuri cu bob alb, comparativ cu 13,3% în probele din soiuri cu bob roșu. Un aspect important îl constituie faptul că virusul GVA a fost depistat exclusiv în eșantioanele provenite din soiuri autohtone cu bob alb (23%), fiind absent în probele din soiuri autohtone cu bob roșu, precum și în cele din soiuri de selecție nouă. Virusul GFLV nu a fost identificat în probele testate din soiurile autohtone.

Analiza infecțiilor la candidații în clone de viță-de-vie din soiuri europene. Din soiurile europene au fost testate 35 de plante din 6 soiuri de viță-de-vie, dintre care 3 soiuri cu bobul alb Chardonnay – 5 plante, Pinot gris – 6 plante, Sauvignon – 2 plante și alte 3 soiuri cu bobul roșu-Merlot – 3 plante, Pinot Noir – 7 plante, Cabernet Sauvignon – 12 plante.

Analizând rezultatele testării candidaților în clone din soiuri europene de viță-de-vie cu bob alb și cu bob roșu, se observă că soiurile cu bob alb prezintă o incidență ușor mai redusă a infecțiilor bacteriene (15,4%) comparativ cu cele cu bob roșu (18,2%), ceea ce indică o distribuție similară a infecțiilor bacteriene între cele două categorii. Bacteria *A. vitis* a fost depistată în principal la soiurile Pinot Gris, Cabernet Sauvignon și Pinot Noir.

În ceea ce privește infecțiile virale, există diferențe mai evidente. În soiurile cu bobul alb, virusul GFkV a fost cel mai frecvent întâlnit (30,7%), iar la soiurile cu bobul roșu, GLRaV-3 a fost predominant (40,9%). Această diferență indică o infectare mai mare a soiurilor cu bobul roșu cu infecțiile cu GLRaV-3, în timp ce soiurile cu bobul alb sunt mai afectate de GFkV. De asemenea, virusul GLRaV-1 a fost detectat doar la soiurile cu bobul alb (7,7%), fiind absent în probele din soiurile cu bobul roșu. Candidații în clone testați din soiurile europene nu a prezentat infecții cu virusurile GFLV și GVA, ce reflectă o situație fitosanitară favorabilă în acest context.

Testarea candidaților în clone din cele 6 soiuri europene a arătat că 14 probe (40%) din 35 testate au fost sănătoase, fără prezența infecțiilor virale sau bacteriene. Printre acestea se numără: Chardonnay (1-15-5-1, 1-15-5-5, 1-15-3-4, 1-16-2-2), Pinot gris (1-65-5-4, 1-65-2-2), Sauvignon (BII-10-9-1), Cabernet Sauvignon (2-1-1, 2-1-2), Pinot Noir (1-27-11-5, 1-28-1-4, 1-27-6-3, 12-4-4) și Merlot (BS-14-4-1).

Rezultatele testării candidaților în clone din cele trei grupuri de soiuri de viță-de-vie (selecție nouă, autohtone și europene) au evidențiat diferențe notabile la prezența virusurilor și a bacteriei *A. vitis*, atât în funcție de categoria soiurilor, cât și de culoarea boabelor (tabelul 3.8).

Tabelul 3.8 Distribuția agenților patogeni în candidații în clone de viță-de-vie din soiuri de selecție nouă, autohtone și europene (2018-2023)

Nr. crt.	Soiul de struguri	Candidați în clone infectați (%)					
		Soiuri de selecție nouă		Soiuri autohtone		Soiuri europene	
		Bob alb	Bob roșu	Bob alb	Bob roșu	Bob alb	Bob roșu
1	<i>A. vitis</i>	63,6	29	30,8	33,3	15,4	18,2
2	GFLV	0	12,9	0	0	0	0
3	GLRaV-1	0	16,1	30,8	5,2	15,4	9
4	GLRaV-3	9	12,9	7,7	10,5	0	40,9
5	GFkV	9	64,5	23	15,7	30,7	27,2
6	GVA	0	0	23	0	0	0
7	Material neinfestat	27,3	19,3	38,5	31,6	53,8	31,8

Din totalul de 109 probe de struguri din 25 de soiuri de viță-de-vie, au fost identificate 31 de plante sănătoase din 23 soiuri, iar din fiecare soi a fost selectată o plantă, care a fost ulterior transferată în calitate clonă-inițială (plantă-inițială).

Cu toate acestea, în cazul unor soiuri precum Meleag, Muscat de Ialoveni și Codrinschii, toate plantele testate au prezentat infecții. În aceste situații, s-a recurs la selectarea variantelor care prezentau agenți patogeni mai ușor de eradicat, aplicând metode corespunzătoare de asanare. Această etapă este importantă pentru a asigura obținerea plantelor sănătoase pentru soiurile de interes economic sau științific, la care nu au putut fi selectate plante libere de infecții.

3.4 Asanarea candidaților în clone de viță-de-vie de infecții virale și cancer bacterian

În urma testărilor efectuate, au fost obținute date care demonstrează că plantele aparent sănătoase la o inspecție vizuală pot fi purtătoare de boli cronice în formă latentă (tabelul 3.9). Pentru soiul de struguri Codrinschii Pleșeni, toate plantele au fost diagnosticate pozitiv la prezența cel puțin a unui agent patogen. Din cele 6 variante studiate, toate au prezentat infecție cu virusul GFkV, fie de unul singur, fie în combinație cu virusurile GFLV s-au GLRaV-1 (Codrinschii Pleșeni I-9-1-3 și respectiv I-10-7-5), sau cu bacteria *A. vitis* (I-11-6-1). Astfel, varianta I-9-8-1 a fost confirmată ca fiind infectată doar cu GFkV. Plantele din soiul Meleag, identificate cu cifrul T2-19-25 și T2-19-9, au fost testate pozitiv pentru două virusuri: GFLV și GFkV. Iar candidatul cu cifrul T2-19-7, a fost diagnosticată cu o infecție de *A. vitis*. Pentru soiul de struguri Muscat de Ialoveni, în variantele T1-11-6 a fost diagnosticată o infecție latentă de cancer bacterian, iar la varianta T1-11-25 a fost depistată infecția cu *A. vitis* și a virusului GFkV.

Tabelul 3.9 Evaluarea candidaților în clone de viță-de-vie din soiuri cu toate probele testate pozitiv la *A. vitis* și/sau virusuri (2018–2023)

Nr. crt.	Soiul de struguri	Identificator	Bacterii	Virusuri				
			<i>A. vitis</i>	GLRaV-1	GLRaV-3	GFLV	GFkV	GVA
1	Meleag	T2-19-25	-	-	-	+	+	-
2	Meleag	T2-19-9	-	-	-	+	+	-
3	Meleag	T2-19-7	+	-	-	-	-	-
4	Muscat de Ialoveni	T1-11-25	+	-	-	-	+	-
5	Muscat de Ialoveni	T1-11-6	+	-	-	-	-	-
6	Codrinschii Pleșeni	I-9-1-3	-	-	-	+	+	-
7	Codrinschii Pleșeni	I-9-7-4	-	-	-	+	+	-
8	Codrinschii Pleșeni	I-9-8-1	-	-	-	-	+	-
9	Codrinschii Pleșeni	I-11-6-1	+	-	-	-	+	-
10	Codrinschii Pleșeni	I-10-7-5	-	+	-	-	+	-

Notă: (+) – prezența infecției; (-) – lipsa infecției

Pentru obținerea plantelor inițiale sănătoase din aceste soiuri, se recomandă două direcții de acțiune. Prima constă în selectarea de noi candidați în clone în sezonul următor – o metodă clasică de selecție, care însă necesită o perioadă suplimentară de cel puțin un an și resurse considerabile de timp și materiale, fără a garanta că plantele selectate vor fi complet sănătoase, întrucât infecțiile pot persista în formă latentă. A doua opțiune o reprezintă aplicarea procedurilor de asanare a materialului viticol infectat. Cele mai eficiente metode utilizate pentru eliminarea virusurilor și a bacteriei *A. vitis* la viță-de-vie sunt termoterapia cu apă fierbinte și termoterapia cu aer fierbinte, aplicate în combinație cu cultura *in vitro*, ceea ce permite obținerea de plante complet sănătoase, păstrând integritatea genetică a genotipurilor valoroase.

3.4.1 Asanarea candidaților în clone de viță-de-vie prin metoda termoterapiei cu apă fierbinte

Pentru a studia influența măririi duratei tratamentului până la 45 de minute la o temperatură a apei de 50–52 °C asupra viabilității mugurilor de viță-de-vie, a fost utilizată termoterapia butașilor a două soiuri de viță-de-vie. În cadrul studiului au fost folosiți butași de viță-de-vie cu un singur mugure. Butașii martor au fost ținuti timp de 45 de minute în apă la temperatura de 20–22 °C. După tratament, butașii studiați și cei martor au fost menținuți la temperatura 20–22 °C timp de 14 zile. La sfârșitul acestei perioade a fost evaluat numărul de muguri viabili (tabelul 3.10).

Tabelul 3.10 Impactul tratamentului cu apă fierbinte asupra viabilității mugurilor la materialul viticol de înmulțire

Nr. crt.	Soiul de struguri	Cantitatea de butași (buc.)	Temperaturi de tratare cu apă fierbinte (°C)	Durata expunerii (minute)	Cantitatea de muguri viabili după TAF	
					buc.	%
1	Aligote	333	50	45	300	90,1
2	Aligote	333	51	45	302	90,7
3	Aligote	333	52	45	104	33,5
4	Pinot blank	310	50	45	252	81,3
5	Pinot blank	370	51	45	330	89,2
6	Pinot blank	320	52	45	111	34,7
7	Martor Aligote	100	-	-	-	94
8	Martor Pinot blank	100	-	-	-	93

Datele obținute în cadrul studiului au evidențiat că temperatura optimă pentru menținerea viabilității mugurilor este în intervalul de 50 ± 1 °C, cu o durată de tratare de 45 de minute. La această temperatură, viabilitatea mugurilor a fost ridicată pentru ambele soiuri testate, Aligote și Pinot Blanc, variind între 89,2% și 90,7%. În schimb, creșterea temperaturii apei la 52 °C a dus la o scădere semnificativă a viabilității mugurilor, până la 33,5-34,7%.

Candidații în clone din soiurile Meleag T2-19-7 și Muscat de Ialoveni T1-11-6, infectate cu formă latentă a cancerului bacterian al viței-de-vie, au fost supuse tratamentului prin terapia cu apă fierbinte [6]. Înainte de tratament, butașii au fost păstrați într-o încăpere frigorifică la temperatura de 4 °C, iar ulterior au fost aclimatizați într-un spațiu controlat de laborator la temperatura de 20–22 °C timp de 24 de ore. După aclimatizare, butașii au fost tăiați în segmente de câte doi muguri, etichetați și scufundați într-un rezervor cu apă la 24 °C, timp de 24 de ore.

Tratarea propriu-zisă a avut loc într-un termostat de laborator de tip LP-516, unde butașii au fost menținuți la o temperatură de 50 ± 1 °C, timp de 45 de minute (fig. 3.1). După tratament, butașii au fost păstrați la temperatura 20–22 °C timp de 24 de ore.

Eficiența tratamentului termic a fost verificată prin teste microbiologice. După 5-7 zile, nu au fost observat colonii de agrobacterii, ceea ce indică faptul că agentul patogen *A. vitis*, a fost inactivat în butașii tratați. În urma tratamentelor efectuate, plantele din soiurile Meleag T2-19-7 și Muscat de Ialoveni T1-11-6 au fost confirmate ca fiind libere de infecții virale și de cancer bacterian și transferate la etapa următoare, având statutul de clonă inițială, pentru a continua procesul de înmulțire accelerată.



Fig. 3.1 Tratarea butașilor de viță-de-vie în termostat de laborator

În cadrul studiului realizat, a fost analizată eficiența tratamentului termic cu apă fierbinte pentru combaterea agentului patogeni *A. vitis* și impactul acestui tratament asupra viabilității materialului viticol, în special asupra mugurilor. Deși în practica globală tratamentul standard pentru eradicarea *A. vitis* presupune aplicarea tratamentului cu apă fierbinte la o temperatură de 50 °C timp de 30 de minute, în cadrul cercetării date, a fost propusă utilizarea temperaturii de 50 ± 1 °C pentru 45 de minute, pentru a asigura eliminarea și a fitoplasmei, în special a fitoplasmei asociate cu boala Bois Noir.

3.4.2 Asanarea candidaților în clone de viță-de-vie împotriva infecțiilor virale

În urma testării candidaților în clone de viță-de-vie, toate plantele din soiul Codrinschii Pleșeni au fost confirmate ca infectate cu agenți patogeni de etiologie virală și bacteriană. Planta Codrinschii Pleșeni I-9-7-4, infectată cu virusurile GFLV și GFkV, a fost transferată la etapa de asanare prin aplicarea tratamentului cu aer fierbinte [6]. Coardele plantelor au fost tăiate în butași cu doi muguri și plasate în apă la temperatura camerei timp de 24 de ore. După înmuiere, secțiunile superioare ale butașilor au fost sigilate cu parafină și plantate în ghivece de 5 litri cu substrat de turbă, fiind apoi transferați în camere climatice cu sistem fitotronic KK 500 FIT pentru înrădăcinare (fig. 3.2). În timpul înrădăcinării butașilor plantați, temperatura camerei a fost menținută la 25 °C, cu un regim de iluminare de 16 ore pe zi, la o intensitate a luminii de 4000 de lux. Când butașii s-au înrădăcinat și lăstarii au ajuns la 4-5 internoduri, vârfurile lăstarilor au fost ciupite pentru a stimula creșterea lăstarilor laterali și pentru a obține mai multe vârfuri. După apariția lăstarilor laterali, temperatura în camera climatică a fost mărită treptat până la 38 °C, cu o creștere de 3 °C la fiecare trei zile pentru a evita șocurile termice. Cu scopul de a proteja sistemul radicular de supraîncălzire, ghivecele au fost acoperite cu o folie protectoare (fig. 3.2).



Fig. 3.2 Ghivece cu folie protectoare cu butași de viță-de-vie în cameră climatică

După 30 de zile de tratament cu aer fierbinte la 38 °C, au fost selectate vârfuri apicale pentru introducerea în cultura *in vitro*. Au fost prelevate 24 explante, cu dimensiuni cuprinse între 0,5-0,8 mm, care au fost sterilizate într-o soluție de 15% hipoclorit de calciu și inoculate într-un mediu agarizat, în eprubete cu diametru de 40 mm și înălțime de 150 mm. După 40 de zile de tratament, a fost realizată o a doua prelevare, formată din 24 vârfuri apicale, care au fost transferate în cultura *in vitro* pentru dezvoltarea ulterioară.

Creșterea explantelor a fost realizată în camera de cultură, la o temperatură de 26 ± 1 °C, cu o umiditate a aerului de 85% și un regim de iluminare de 16 ore zilnic. După 40 de zile de cultură *in vitro* explantele au fost dezvoltate în plante cu 6-8 internoduri. În această perioadă, plantele au prezentat o dezvoltare uniformă și o activitate meristematică intensă, caracterizată prin formarea de lăstari viguroși. La finalul acestei perioade, plantele regenerate au fost supuse testării pentru a verifica rezultatele aplicării termoterapiei cu aer fierbinte (tabelul 3.11).

Tabelul 3.11 Rezultatele testării materialului viticol asanat prin termoterapia cu aer fierbinte la 30 și 40 de zile după tratament

Soiul de struguri	Identificatorul	Durata tratamentului	Repetarea	Nr. probe testate	Virusuri	
					GFLV	GFkV
Codrinschii Pleșeni	I-9-7-4	30 zile	1	8	-	-
			2	8	-	+
			3	8	-	-
		Total		24	-	1 (4,2%)
		40 zile	1	8	-	-
			2	8	-	-
			3	8	-	-
		Total		24	-	-

Notă: (+) – prezența infecției; (-) – lipsa infecției

Plantele tratate cu termoterapie în camere climatice timp de 40 de zile au dat rezultate 100% negative pentru ambele virusuri. Aceste rezultate sugerează că tratamentul termic de 30 de zile cu aer fierbinte este eficient în eliminarea virusului GFLV, dar nu garantează o eliminare completă a virusului GFkV, care a prezentat o incidență de 4,2%. Prelungirea tratamentului până la 40 de zile a demonstrat o eliminare completă a ambelor virusuri.

Studiul realizat a demonstrat, că eficiența tratamentului termic pentru eliminarea virusurilor depinde în mare măsură de durata expunerii la temperaturi ridicate, dar și de combinarea acestuia cu cultura *in vitro*. Prelungirea tratamentului la 40 de zile este esențială pentru a obține eliminarea virusurilor GFLV și GFkV, în timp ce perioadele mai scurte de tratament nu garantează asanare completă. Candidatul în clonă din soiul Codrinschii I-9-7-4 a fost supus termoterapiei cu aer fierbinte la 37 °C timp de 40 de zile, fiind ulterior transferat în statut de clonă și transferat la etapa de multiplicare rapidă prin cultura *in vitro*.

3.5 Multiplicarea accelerată a clonelor de viță-de-vie prin metoda culturii *in vitro*

Clonele obținute prin selecția fitosanitară și asanate prin metode termo-terapeutice au fost transferate la etapa de multiplicare accelerată. Coardele testate negativ pentru virusuri și cancer bacterian au fost fragmentate în butași cu câte doi ochi și tratate termic cu apă fierbinte, pentru a suprima posibilele infecții de etiologie fitoplasmatică, bacteriană și fungică. După tratament, butașii au fost plantați în ghivece cu substrat de turbă și plasați în camere climatice. Această etapă a permis obținerea materialului biologic viguros necesar pentru inițierea culturii *in vitro*.

După 30 de zile, când plantele au intrat într-o fază activă de creștere, a fost efectuată prima prelevare a părților apicale pentru introducerea *in vitro*. În acest timp, lăstarii verzi au fost scurtați până la nivelul celei de-a patra sau a cincea frunză reală. Această operațiune se realizează pentru a induce creșterea lăstarilor laterali și pentru a mări cantitatea de vârfuri pentru introducerea ulterioară în cultură *in vitro*.

Plantarea explantatelor, cu dimensiuni de 0,8-1,0 cm, a fost realizată pe un mediu nutritiv solidificat cu agar, bazat pe mediu MS, cu un conținut redus de macroelemente (jumătate din concentrația standard), suplimentat cu zaharoză (20 g/L) și agar (5,5 g/L). Procesul de autoclavare a fost realizat la temperatura de 121 °C timp de 20 de minute. Fiecare eprubetă a fost etichetată cu soiul și data plantării, după care au fost transferate în camera de cultură (fig. 3.3).



Fig. 3.3 Camera de cultură *in vitro* pentru multiplicarea viței-de-vie

Aplicând tehnologia indicată, la soiuri precum: Moldova, Floricica, Feteasca Neagră, Plavai și Copceac, formarea rădăcinilor a început în 7–9 zile, iar în 30–35 de zile plantele din eprubete au atins dezvoltarea necesară pentru multiplicare. Soiurile apirene de struguri: Chișmiș moldovenesc, Chișmiș lucistâi și Apiren roz au format rădăcini în 14–15 zile și au ajuns la dimensiuni de 6–8 internoduri în 45–50 de zile. Astfel, a fost stabilită specificitatea soiului, unde perioada de dezvoltare a plantelor variază de la 30 la 50 de zile.

Plantele de viță-de-vie regenerate au fost multiplicat accelerat prin metoda de microbutășire *in vitro*, care constă în fragmentarea vitroplantelor în microbutași de mici dimensiuni, utilizând segmente nodale sau apicale (fig. 3.4 A). Fiecare plantă regenerată a fost multiplicată în 5–7 microbutași și inoculați în containere pe substrat „Biona-311” (fig. 3.4 B). Multiplicarea plantelor dintr-un soi a continuat până la obținerea cantității suficiente. Când plantele cultivate în containere cu substratul „Biona-311” au crescut până la limita superioară a recipientului, acesta a fost îndepărtat, ceea ce a permis plantelor să continue dezvoltarea în același mediu de creștere, dar în condiții *ex vitro* (fig. 3.4 C).

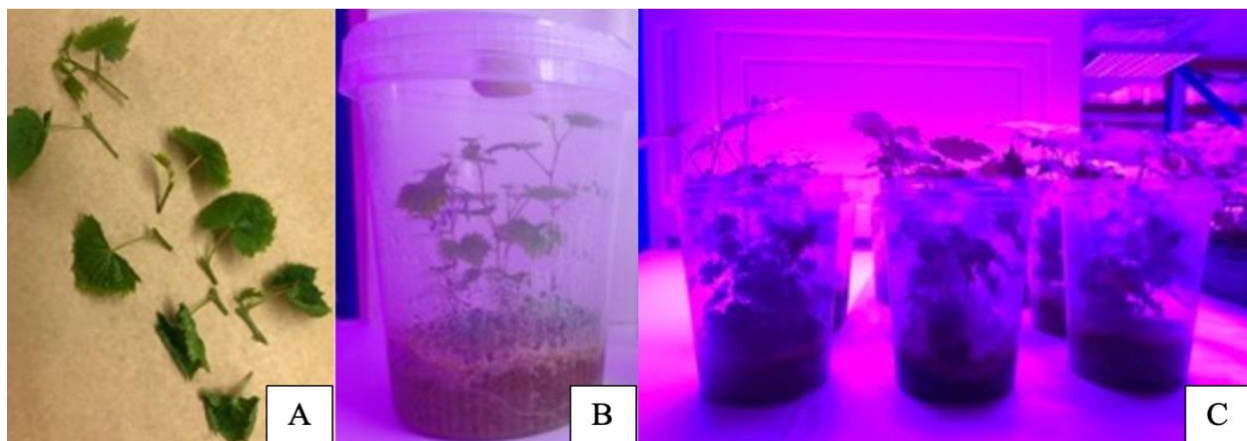


Fig. 3.4 Micropropagarea viței-de-vie pe substratul „Biona-311”. A – multiplicarea plantei regenerate; B – dezvoltarea microbutașilor în condiții *in vitro* în containere.

Pe măsură ce plantele creșteau, acestea au depășit limitele containerului, iar frunzele au început să manifeste trăsăturile morfologice caracteristice soiului. După îndepărtarea capacului, substratul din container a fost umezit periodic cu apă sterilă, pentru a menține condițiile optime de creștere. Adaptarea plantelor la substratul pe bază de ioni s-a desfășurat pe o perioadă de

7–14 zile, cu o rată de supraviețuire de 93–98%, în funcție de soi. După aclimatizare, plantele au fost transplantate în containere multicelulare cu substrat de turbă. În această etapă s-a observat o creștere echilibrată a sistemului radicular și o bună adaptare morfofiziologică a plantelor, indicând un proces de aclimatizare reușit și pregătirea lor pentru transferul în camera de vegetație (fig. 3.5).



Fig. 3.5 Plante de viță-de-vie în faza de aclimatizare în containere multicelulare în camera de vegetație

Parametrii esențiali în camera de vegetație, precum temperatura (25 ± 1 °C), umiditatea și fotoperioada de 16 ore de lumină au fost păstrați constanți, asigurând continuitatea procesului de dezvoltare. Această abordare a avut rolul de a preveni apariția șocului fiziologic, facilitând trecerea plantelor la noile condiții de creștere fără a compromite ritmul de dezvoltare. Condițiile favorabile din camera de cultură au facilitat înrădăcinarea eficientă a plantelor în substratul de turbă, asigurând o dezvoltare bună și o creștere viguroasă. După o perioadă de 2–3 săptămâni, când plantele au atins o stare de creștere optimă, au fost transferate în seră pentru a continua dezvoltarea. Această etapă a permis trecerea treptată a plantelor în condiții semi-controlate, pregătindu-le pentru adaptarea la mediul exterior.

În cazul transplantării efectuate în perioada de primăvară–vară, plantele au fost transferate în seră imediat după formarea unui sistem radicular bine dezvoltat în substratul de turbă, iar când transplantarea avea loc în perioada toamnă–iarnă, plantele au fost menținute în camera de vegetație până la începutul primăverii, pentru a evita expunerea la condiții nefavorabile.

Sera în care au fost transferate plantele de viță-de-vie din camera de vegetație a fost echipată pentru întreținerea plantelor pe tot parcursul anului și pentru cultivarea butașilor vegetativi, potriviți pentru plantarea în plantația-mamă. Pe durata iernii, sera a fost încălzită pentru a menține condiții optime de creștere. Temperatura minimă a fost reglată la $+5$ °C pe timpul nopții și între $+10$ și $+15$ °C în timpul zilei, asigurând astfel maturarea corespunzătoare a viței și favorizând procesul natural de cădere a frunzelor. Menținerea unui regim termic constant și a unei bune circulații a aerului în seră a contribuit la dezvoltarea echilibrată a plantelor și la reducerea riscului apariției bolilor fiziologice. În luna februarie, plantele de viță-de-vie au fost tăiate la 2–3 ochi pentru a obține un lăstar bine dezvoltat.

Pe întreaga perioadă de primăvară–vară, sera a fost acoperită cu o plasă de protecție solară și echipată cu sistem de ventilație forțată cu funcționare automată, ceea ce a influențat pozitiv menținerea temperaturii și umidității aerului din interior. Periodic, au fost aplicate tratamente chimice preventive pentru controlul bolilor fungice, precum și fertilizări foliare și radiculare echilibrate, pentru a asigura sănătatea și dezvoltarea optimă a plantelor. Etapa de creștere în seră a asigurat consolidarea fiziologică a plantelor obținute prin micropropagare și pregătirea acestora

pentru plantarea în câmp. Condițiile create au permis obținerea unui material vegetativ viguros, uniform și apt pentru utilizare la înființarea plantațiilor-mamă de categorie biologică superioară.

Multiplicarea prin metoda *in vitro* aplicată în complexele culturale și în condiții de seră a permis obținerea plantelor, provenite din 23 soiuri de struguri și patru portaltoi. În urma acestui proces, au fost produse în total 7179 de plante de origine clonală, destinate înființării plantațiilor-mamă de categoria biologică Prebază.

Tabelul 3.12 Lista soiurilor de viță-de-vie și a clonelor multiplicare prin metoda microbutășirii *in vitro*

Nr. crt.	Soiul de struguri	Clonă	Cantitatea. buc.
1	Copceac	cl.INVV18-2	426
2	Legenda	cl.INVV21-36	325
3	Pinot noir	cl.INVV 12-44	418
4	Plăvaie	cl.INVV21-22	355
5	Telti Curuc	cl.INVV 11-55	400
6	Moldova	cl.INVV13-12	450
7	Apiren Roz	cl.INVV 40-42	393
8	Merlot	cl.INVV 14-41	103
9	Negru de Căușeni	cl.INVV21-1	207
10	Feteasca regală	cl.INVV10-71	379
11	Feteasca albă	cl.INVV13-11	214
12	Sauvignon	cl.INVV10-91	342
13	Chișmiș lucistâi	cl.INVV5-81	399
14	Tudor	cl.INVV56-36	364
15	Luminița	cl.INVV3-40	74
16	Busuioacă de Moldova	cl.INVV19-57HR	163
17	Busuioacă de Bohotin	cl.INVV 18-67HR	157
18	Codrinschii	cl.INVV 9-81	121
19	Codrinschii	cl.INVV9-74	65
20	Onițcanschii belâi	cl.INVV9-14	200
21	Chardonnay	cl.INVV15-55	147
22	Pinot gris	cl.INVV65-64	129
23	Meleag	cl.INVV 19-7	87
24	BxR Kober 5 BB	cl.INVV3-21	174
25	BxR SO4	cl.INVV6-42	246
26	RxR 101-14	cl.INVV11-32	291
27	Maleque	cl.INVV01MD	550
Total plante:			7179

Așa cum se poate observa din tabelul 3.12, multiplicarea prin metoda *in vitro* a asigurat o producție variată de soiuri altoi și portaltoi de viță-de-vie. În comparație cu metodele tradiționale de multiplicare, precum altoirea în verde sau butășirea în uscat, metoda *in vitro* prezintă o serie de avantaje. Conform studiilor realizate în Italia, a fost explorat impactul culturii *in vitro* asupra fenotipului plantelor de viță-de-vie. Principalele descoperiri indică faptul că, deși majoritatea parametrilor analizați nu au prezentat diferențe semnificative, plantele obținute prin micropropagare au avut un randament superior comparativ cu plantele crescute din butași lemnoși. Aceste rezultate sunt în concordanță cu datele obținute în cadrul studiului dat, unde aplicarea metodei *in vitro* a permis obținerea unui număr mare de plante într-un interval scurt de timp, păstrând totodată calitatea fitosanitară. Comparativ cu metodele tradiționale, metoda *in vitro* s-a

dovedit a fi mai eficientă în producerea materialului săditor de înaltă calitate, reducând timpul necesar pentru multiplicare și asigurând producerea plantelor de viță-de-vie libere de virusuri, fitoplasme și cancer bacterian.

3.6 Înființarea plantațiilor-mamă de categorii biologice Prebază și Bază

Pentru a reduce riscul de infecții și a crea condiții optime pentru dezvoltarea plantelor asanate, plantația-mamă Prebază a fost înființată pe un teren pe care nu a fost cultivată viță-de-vie timp de 20 de ani. Această măsură preventivă contribuie la diminuarea pericolului de contaminare cu agenți patogeni persistenți în sol, ca exemplu *Xiphinema index*.

Butașii vegetanți de viță-de-vie utilizați pentru înființarea plantației-mamă Prebază au fost plantați la o distanță de 3 metri între rânduri și 1,4 metri între plantele din rând (fig. 3.6). Această configurație de spațiere a fost aleasă pentru a permite dezvoltarea optimă a vițelor, facilitând totodată lucrările ulterioare de îngrijire. Metoda dată contribuie la circulația aerului și la expunerea uniformă la lumină, factori esențiali pentru creșterea sănătoasă a vițelor.



Fig. 3.6 Butași de viță-de-vie în stadiu de vegetație, obținuți prin metoda de butășire microclonală *in vitro*. A – plante în substrat de turbă, crescute în sera laboratorului; B – plante cultivate în plantația-mamă de categorie biologică Prebază.

Astfel, butașii vegetanți de viță-de-vie crescuți și fortificați în seră, au fost plantați în plantația-mamă de categoria biologică Prebază unde în prezent, cresc clone din 23 de soiuri altoi și 4 soiuri portaltoi pe o suprafață de 3,05 ha [3]. Coardele de viță-de-vie crescute în plantația-mamă Prebază au fost folosite ulterior pentru producerea butașilor altoiți, cu care a fost înființată plantația-mamă de categoria biologică Bază. Aceasta se întinde pe o suprafață de 12 hectare și cuprinde clone din 29 de soiuri de viță-de-vie, atât pentru producerea vinurilor, cât și pentru consum în stare proaspătă. Anual, sortimentul plantațiilor-mamă este completat cu noi soiuri de masă și tehnice, care răspund cerințelor actuale din domeniul viticulturii și vinificației.

Fertilizarea solului s-a efectuat periodic, cu îngrășăminte organice și minerale, pe baza recomandărilor agrochimice, pentru menținerea echilibrului nutrițional. Pentru asigurarea stării fitosanitare a plantațiilor, s-au aplicat tratamente preventive împotriva bolilor criptogamice și bacteriene, utilizând produse omologate.

Implementarea acestor lucrări a contribuit la dezvoltarea armonioasă a vițelor, la menținerea vigoriei constante a clonelor, asigurând uniformitatea creșterii, maturarea completă a lemnului și formarea unui aparat foliar sănătos și funcțional.

3.7 Schema biotehlogică pentru obținerea și multiplicarea clonelor sănătoase de viță-de-vie în condițiile Republicii Moldova

Având în vedere situația fitosanitară actuală, caracterizată printr-un grad înalt de infectare cu virusurile asociate cu răsucirea frunzelor (GLRaV-1, GLRaV-3), scurt-nodarea viței-de-vie (GFLV) și marmorarea frunzelor (GFkV), cu *A.vitis*, precum și cu ‘*Ca. P. solani*’ – fitoplasma responsabilă de boala înnegrirea lemnului, se propune aplicarea unei biotehnologii integrate de obținere a clonelor asanate (fig. 3.7).

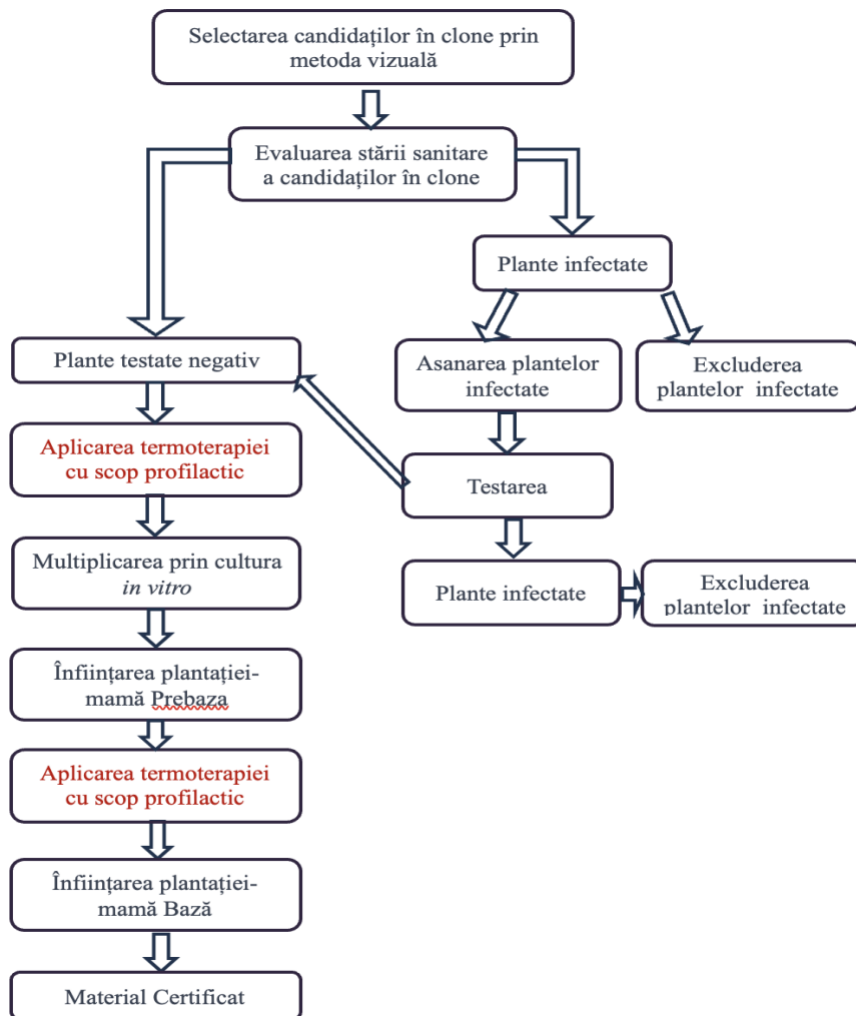


Fig. 3.7 Biotehnologia dezvoltată de obținere a clonelor asanate de viță-de-vie

Schema biotehlogică prezentată evidențiază succesiunea logică a etapelor de selecție, diagnostic, asanare și multiplicare, aplicate în procesul de obținere a clonelor sănătoase de viță-de-vie. Compararea dintre metoda clasică și biotehnologia propusă în cadrul prezentei lucrări este prezentată în figura 3.8.

Metoda tradițională, dezvoltată în anii 1980, presupunea o succesiune de etape îndelungate: selecția vizuală a candidaților în clone, testarea biologică prin indexare (până la 3 ani), asanarea termică și multiplicarea vegetativă pe o perioadă totală de 9–10 ani. În contrast, metoda propusă utilizează metode moderne de diagnostic, care reduc perioada de testare la 2–10 zile, iar multiplicarea prin cultura *in vitro* permit finalizarea ciclului complet de obținere a clonelor sănătoase în numai 3 ani.

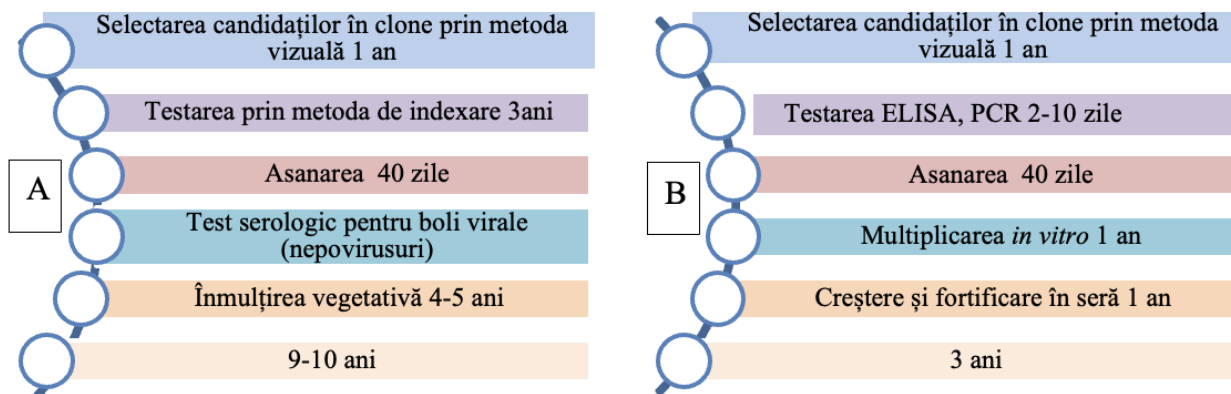


Fig. 3.8 Compararea tehnologiilor de obținere a vițelor vegetante de viță-de-vie destinate înființării plantației-mamă de categoria biologică Prebază: A – metoda aplicată în anii 1980; B – biotehnologia modernizată, dezvoltată în cadrul prezentei lucrări.

Astfel, pentru prima dată în Republica Moldova a fost elaborată și testată o biotehnologie complexă, bazată pe metode moderne de diagnostic, asanare și multiplicare accelerată prin cultura *in vitro*, care permite obținerea clonelor inițiale de viță-de-vie și înființarea plantațiilor-mamă de categoriile Prebază și Bază într-un interval de timp considerabil redus.

4 OPTIMIZAREA ELEMENTELOR TEHNOLOGICE DE PRODUCERE A CLONELOR ASANATE DE VIȚĂ-DE-VIE

4.1 Evaluarea și implementarea metodelor moleculare de diagnostic al cancerului bacterian la materialul viticol

În Republica Moldova, identificarea bacteriilor patogene din complexul *Agrobacterium* a fost realizat până nu demult prin metode microbiologice clasice și bioteste pe plante indicatoare. Aceste metode necesită între 5–7 zile pentru identificarea genului și până la 3–5 săptămâni pentru confirmarea patogenității. Metodele date nu doar că sunt de lungă durată, dar pot fi și ineficiente, având un grad înalt de interpretare subiectivă. În prezent, la nivel mondial, se aplică metode moleculare, cum ar fi reacția în lanț a polimerazei, care oferă o sensibilitate și specificitate superioare comparativ cu tehnicile tradiționale.

În acest context, au fost selectate 6 butuci din soiuri și elite de viță-de-vie din plantațiile experimentale de soiuri ale IP INCAAMV, cu o vârstă de peste 30 de ani. De la plante aparent sănătoase, fără semne externe de tumori sau deformări ale țesuturilor, au fost prelevate vițe în vârstă de un an. Secțiunile prelevate au fost curățate de scoarță, fragmentate în segmente de 3–5 mm. După însămânțare, izolatele bacteriene au fost incubate timp de 7 zile la 27 °C, pentru evaluarea prezenței coloniilor caracteristice de *Agrobacterium spp.*

Coloniile au prezentat o dezvoltare uniformă pe întreaga suprafață a mediului, fără formarea de zone de inhibiție sau contaminare, prezentând morfologia caracteristică bacteriilor din complexul *Agrobacterium spp.*, cu aspect alb, convex, lucios și cu centru pigmentat roșu.

Pentru analiza detaliată a agrobacteriilor izolate din materialul săditor, a fost aplicată metoda Triplex PCR (end-point), care permite identificarea simultană a genului și evaluarea potențialului patogen al tulpinilor [5]. În cadrul acestei metode, au fost vizați trei markeri moleculari esențiali: gena *pehA* – utilizată ca marker specific pentru identificarea speciei *A. vitis*, diferențiind-o de

A. tumefaciens, printr-un fragment specific de ADN de 466 pb; gena *virF* – care codifică sinteza opinei de tip nopaline și octopine, asociată cu plasmidele Ti implicate în inducerea tumorilor; fragmentul specific detectat prin PCR are 382 pb; gena *virD* – marker pentru producerea vitopinei, un alt compus caracteristic plasmidelor Ti, asociat cu patogenitatea tulpinilor; fragmentul amplificat are 320 pb. Aplicarea acestui sistem de detecție permite nu doar confirmarea speciei *Allorhizobium vitis* sau *Agrobacterium tumefaciens*, ci și identificarea tipului de plasmidă Ti prezentă în izolat (figura 4.1)

Toate izolatele au prezentat o bandă de 466 pb, ceea ce confirmă că aparțin speciei *Allorhizobium vitis*. Rezultatele obținute în urma testării plantelor studiate prin metoda PCR confirmă faptul, că această tehnică moleculară permite o diagnosticare rapidă și fiabilă a patogenității agrobacteriilor din genurile *Allorhizobium vitis* și *Agrobacterium tumefaciens* prin detecția directă a plasmidei pTi.

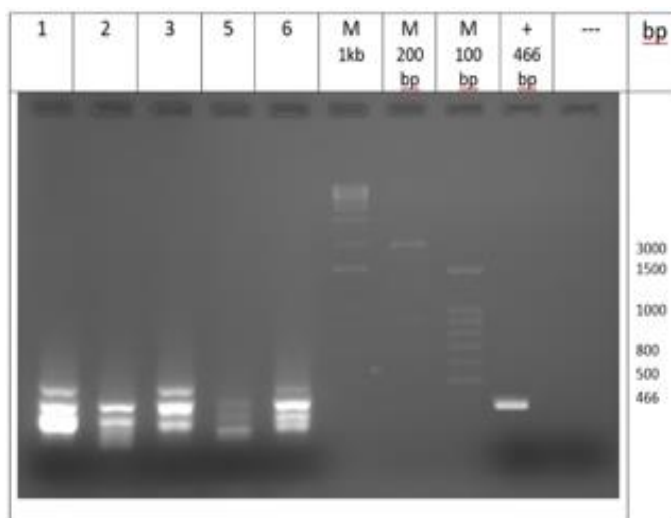


Fig. 4.1 Electroforegrama obținută în urma reacției PCR pentru identificarea tulpinilor de *A. vitis* și *A. tumefaciens*. M – marker de greutate moleculară (1 kb, 200 pb, 100 pb); • – control pozitiv pentru fragmentul *pehA* (466 pb).

4.2 Influența spectrelor de lumină LED asupra dezvoltării plantelor de viță-de-vie în cultura *in vitro*

Studiul dat a urmărit evaluarea efectului spectrelor de lumină LED asupra proceselor de regenerare și dezvoltare a viței-de-vie în cultură *in vitro*, în vederea identificării condițiilor optime pentru multiplicarea accelerată a clonelor asanate, pe baza rezultatelor obținute și publicate anterior [4]. Studiul a fost axat pe analiza performanței plantelor cultivate sub influența a trei tipuri de corpuri de iluminat cu spectre diferite, în condiții de laborator (tabelul 4.1).

Tabelul 4.3 Rezultatele măsurărilor fotometrice a surselor de iluminare utilizate

Nr.crt.	Sursa de iluminare	T măsurat, K	PPFD max, $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$	DLI max, $\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$
1	„alb-rece”	5950±50K	63	4.05
2	„alb-cald”	3200±50K	30	2.04
3	„Fito”	≤1700 K	25	1.64

Analiza spectrelor de emisie ale corpurilor de iluminat utilizate în experiment a evidențiat particularități importante ale compoziției radiației fotosintetic active (PAR, 400–700 nm), responsabilă de activarea proceselor fotochimice esențiale pentru dezvoltarea plantelor. Acestea absorb în mod eficient componentele spectrale din zona albastră (430–470 nm) și din zona roșie (630–680 nm), unde pigmenții fotosintetici, în special clorofilele, prezintă activitate maximă de absorbție. Deși clorofila absoarbe predominant în regiunea violet-albastră, procesele asociate fixării carbonului în cadrul fotosintezei ating eficiență maximă în prezența luminii roșii.

În cadrul studiului, spectrele de emisie ale surselor de lumină utilizate au fost determinate prin măsurători fotometrice, în condițiile specifice laboratorului (fig. 4.2). Analiza distribuției radiației fotosintetic active la nivelul suprafeței de cultură a evidențiat o repartitie neuniformă a valorilor în funcție de distanța față de sursă. Acest fenomen este explicabil prin legea pătratului invers, conform căreia intensitatea radiației scade proporțional cu pătratul distanței. Spectrele de emisie obținute pentru cele trei corpuri de iluminat utilizate sunt prezentate în figura 4.2.

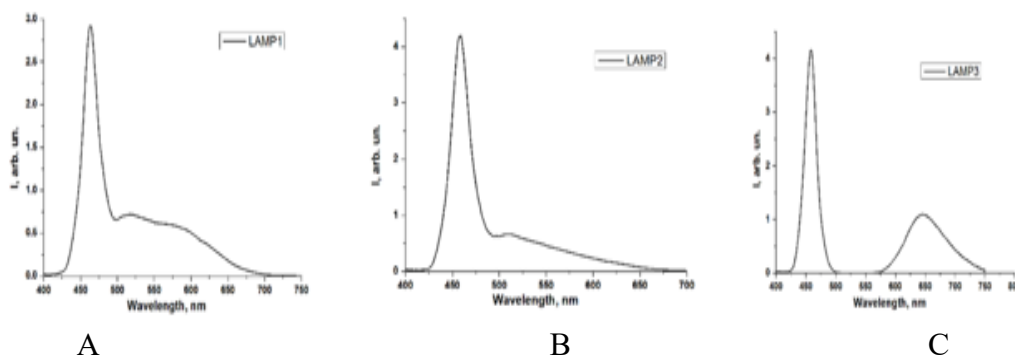


Fig. 4.2 Spectrele de emisie a corpurilor de iluminat utilizate. A – spectrul corespunde corpului de iluminat „alb-cald”; B – spectrul corespunde corpului de iluminat „alb-rece”; C – spectrul corespunde corpului de iluminat cu nuanță „Fito”.

La sursa de lumină „alb-cald”, se observă un maxim de emisie în zona albastră a spectrului, la o lungime de undă de aproximativ 465 nm (fig. 4.3 A). Restul componentelor spectrale — verde, galben, portocaliu și roșu (intervalul 480–675 nm) — sunt prezente, dar cu o intensitate mult mai redusă, reprezentând circa 20–25% din nivelul maxim. Această distribuție indică o predominanță clară a radiației albastre, ceea ce poate influența pozitiv procesele fiziologice implicate în regenerarea inițială a vitroplantelor.

Spectrul sursei de lumină „alb-rece”, prezintă un profil similar, cu un vârf în zona albastră la 460 nm. Intensitatea luminii în intervalul verde-galben (550–600 nm) este și mai redusă comparativ cu sursa „alb-cald”, ceea ce indică o distribuție spectrală mai limitată în acea zonă (fig. 4.3 B). Corpul de iluminat „Fito”, evidențiază un spectru complet diferit (fig. 4.3 C). În acest caz, lipsesc complet componentele luminoase din intervalul 500–575 nm, corespunzătoare luminii verde și galbene. Spectrul este dominat de două regiuni: un maxim în zona albastră ($\lambda \approx 465$ nm) și al doilea, mai redus, în zona roșie ($\lambda \approx 650$ nm), cu o extindere până la limitei spectrului vizibil.

Deși corpurile de iluminat cu spectru „alb-rece” și „alb-cald” au prezentat cele mai ridicate valori pentru temperatura de culoare (până la 6000K), fluxul PAR și PPFD (până la $63 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$), cel mai bun efect asupra formării rădăcinilor în primele 14–30 de zile de cultură a fost obținut sub iluminarea „Fito”. Acest spectru a stimulat cel mai eficient procesul de rizogeneză. Rezultatul este susținut și de literatura de specialitate, care indică faptul că radiația combinată albastru-roșu favorizează dezvoltarea sistemului radicular.

Iluminarea cu spectru „alb-rece” a favorizat mai bine dezvoltarea părții aeriene, plantele având frunze cu suprafață mai mare și internoduri regulate – caracteristici importante pentru o creștere armonioasă. Iluminarea cu spectru „alb-cald” a determinat formarea de calus și a afectat negativ morfologia vitroplantelor, ceea ce poate indica o reacție de stres și o inhibare parțială a dezvoltării normale, confirmând sensibilitatea plantelor la lumină.

În concluzie, se recomandă utilizarea spectrului „Fito” pentru inițierea înrădăcinării, urmată de trecerea la iluminare „alb-rece” pentru susținerea creșterii vegetative.

4.3 Selectarea mediilor nutritive pentru regenerarea și multiplicarea accelerată *in vitro* și aclimatizarea *ex vitro*

Conform modelului clasic Skoog–Miller, raportul dintre auxine și citochinine determină direcția procesului de regenerare: concentrațiile mai mari de auxine favorizează formarea rădăcinilor, în timp ce un exces de citochinine favorizează dezvoltarea lăstarilor.

Pe baza acestor premise, studiul de față a urmărit studierea influenței concentrațiilor diferite de fitohormoni de AIA (acid indolacetic) și 2iP (6-(γ,γ -Dimethylallylamino) purină) asupra regenerării explanturilor de viță-de-vie în condiții controlate de laborator. Au fost evaluate patru variante de medii nutritive, formulate pe baza mediului nutritiv MS cu concentrația redusă la jumătate ($\frac{1}{2}$ MS) pentru sărurile minerale. Fiecare variantă a fost completată cu diferite combinații de fitohormoni, după cum urmează: Varianta 1: 1 mg/l IAA; Varianta 2: 2 mg/l IAA; Varianta 3: 1 mg/l IAA + 0,3 mg/l 2iP; Varianta 4: 2 mg/l IAA + 0,6 mg/l 2iP.

Au fost analizate 90 de plante de viță-de-vie în condiții de cultură *in vitro*. Evaluările au fost realizate după 40 de zile de cultură (tabelul 4.6).

Tabelul 4.6 Rezultatele influenței fitohormonilor asupra parametrilor de creștere și dezvoltare *in vitro* a viței-de-vie

Varianta de mediu	Plante înrădăcinate (%)	Plante dezvoltate (%)	Înălțime medie (cm)	Internoduri (nr)	Frunze (nr)	Lăstari laterali (nr)	Masa uscată radicală (g)	Masa uscată foliară (g)
1	100.0 $\pm$ 0.0	50.0 $\pm$ 3.2	7.62 $\pm$ 0.5	8.0 $\pm$ 0.4	10.2 $\pm$ 0.6	0.0 $\pm$ 0.0	0.90 $\pm$ 0.08	0.33 $\pm$ 0.03
2	100.0 $\pm$ 0.0	50.0 $\pm$ 2.8	8.20 $\pm$ 0.6	7.8 $\pm$ 0.3	12.0 $\pm$ 0.7	2.2 $\pm$ 0.2	0.90 $\pm$ 0.09	0.40 $\pm$ 0.05
3	100.0 $\pm$ 0.0	80.0 $\pm$ 4.1	7.00 $\pm$ 0.4	5.5 $\pm$ 0.2	10.3 $\pm$ 0.4	2.7 $\pm$ 0.3	0.46 $\pm$ 0.04	0.74 $\pm$ 0.06
4	100.0 $\pm$ 0.0	63.3 $\pm$ 3.6	7.20 $\pm$ 0.5	8.3 $\pm$ 0.3	9.8 $\pm$ 0.5	3.5 $\pm$ 0.4	0.34 $\pm$ 0.03	0.56 $\pm$ 0.05

Notă: Valorile sunt exprimate ca medie $\pm$ abaterea standard, calculate din 3 repetări.

Rezultatele obținute confirmă, că rețeta hormonală bazată pe 1 mg/l AIA și 0,3 mg/l 2iP este optimă pentru stimularea regenerării și dezvoltării morfologice echilibrate a vitroplantelor de viță-de-vie, demonstrând aplicabilitate în cadrul tehnologiei de obținere a clonelor asanate. Diferențele identificate între variantele testate evidențiază importanța ajustării raportului fitohormonilor în funcție de genotip, pentru asigurarea unei regenerări eficiente.

CONCLUZII GENERALE

1. În urma testărilor fitosanitare efectuate în perioada 2018–2023, s-a constatat că materialul săditor viticol utilizat în Republica Moldova este contaminat cu agenți patogeni de etiologie virală și bacteriană. Cei mai frecvent identificați dintre virusuri au fost *Grapevine fleck virus*, *Grapevine leafroll-associated virus-3* și *Grapevine leafroll-associated virus-1*, prevalența acestora variind în funcție de grupa de soiuri și culoarea bobului. Infecțiile cauzate de un singur virus au înregistrat un grad de afectare cuprins între 0 și 40%, iar infecțiile mixte au prezentat o incidență semnificativ mai mare [3] (subcapitolul 3.1).

2. Infecțiile latente cu bacteria *A. vitis*, au fost detectate cu o frecvență înaltă, în special în cazul soiurilor autohtone cu bob alb, gradul de infectare variind între 0% și 60%. Prezența butucilor sănătoși, reprezintă o premisă importantă pentru identificarea unor indivizi autentici, cu potențial

de a fi utilizați la constituirea clonelor și multiplicarea acestora în scopul producerii materialului săditor viticol sănătos [3] (subcapitolul 3.2).

3. A fost demonstrat că, tratamentul cu apă fierbinte la 50 ± 1 °C timp de 45 de minute permite asanarea candidaților în clone de viță-de-vie de infecția cu *A. vitis* și, în scopuri profilactice, previne dezvoltarea bolilor fitoplasmatice. Tratamentul cu aer fierbinte este eficient pentru eliminarea virusului scurt-nodării (GFLV) și a virusului marmorării frunzelor de viță-de-vie (GFkV). Aceste tratamente, combinate cu multiplicarea *in vitro* în cadrul procesului de selecție fitosanitară, permit obținerea în decurs de un an a unor clone de viță-de-vie lipsite de infecții virale, fitoplasmatice și bacteriene [6] (subcapitolele 3.4.1–3.4.2).

4. A fost stabilit că, metoda PCR permite diagnosticarea rapidă și fiabilă a patogenității tulpinilor de *A. vitis* și *A. tumefaciens* în termen scurt, prin detectarea prezenței plasmidei *pTi* ca indicator al virulenței, și poate fi aplicată cu succes pentru accelerarea procesului de selecție fitosanitară și obținerea clonelor sănătoase de viță-de-vie [5] (subcapitolul 4.1).

5. Au fost optimizate condițiile de cultivare *in vitro* a viței-de-vie prin ajustarea compoziției mediului nutritiv, selectarea unui substrat artificial eficient pentru etapa de aclimatizare și adaptarea spectrului de iluminare în camera de cultură. Administrarea fitohormonilor în concentrații de 1 mg/l AIA și 0,3 mg/l 2iP a favorizat regenerarea, creșterea și dezvoltarea vitroplantelor. Utilizarea substratului „Biona-311” în perioada de aclimatizare a redus semnificativ durata de adaptare (10–15 zile), cu o rată de prindere de 95–100%. Dintre variantele de iluminare testate, spectrul „Fito” ($T \leq 1700$ K) a stimulat eficient formarea sistemului radicular, spectrul alb-rece (6000 K) a susținut dezvoltarea frunzelor și internodurilor, iar lumina alb-cald ($T \leq 1700$ K) a oferit un echilibru între creșterea părților aeriene și subterane [4] (subcapitolele 4.2–4.4).

6. A fost implementată metoda de multiplicare accelerată *in vitro* în cadrul procesului de selecție fitosanitară, ceea ce a permis obținerea a 7179 de plante de origine clonală, cu care a fost fondată o plantație-mamă de categorie biologică Prebază. În prezent, aceasta include clone asanate din 23 de soiuri de viță-de-vie altoi și 4 soiuri portaltoi, cultivate pe o suprafață totală de 3,05 ha [3] (subcapitolele 3.5–3.6).

7. În baza rezultatelor obținute privind răspândirea agenților patogeni de etiologie virală, fitoplasmatică și bacteriană în plantațiile viticole din Republica Moldova, a fost elaborată o tehnologie complexă de obținere a clonelor sănătoase de viță-de-vie. Aceasta prevede o succesiune logică de etape, care includ: identificarea vizuală a butucilor aparent sănătoși; testarea fitosanitară în scopul evidențierii infecțiilor latente; aplicarea tratamentului termic cu apă fierbinte asupra plantelor inițiale selectate, atât în scop de asanare, cât și cu rol profilactic; multiplicarea accelerată a plantelor sănătoase prin metoda microbutășirii *in vitro*; precum și înființarea plantațiilor-mamă de categoria biologică Prebaza și Bază destinate producerii materialului de înmulțire viticol certificat (subcapitolele 3.3–3.6).

RECOMANDĂRI PRACTICE

În vederea reducerii riscului de transmitere a infecțiilor fitoplasmatice și bacteriene, este recomandat ca coardele altoi recoltate din plantațiile comerciale să fie supuse terapiei cu apă fierbinte la temperatura de 50 ± 1 °C, timp de 45 de minute, imediat înainte de altoire.

Pentru asanarea loturilor de butași de viță-de-vie infectați cu fitoplasme sau cu *Agrobacterium vitis*, agentul cauzator al cancerului bacterian, se recomandă aplicarea terapiei cu apă fierbinte la temperatura de 50 ± 1 °C timp de 45 de minute.

Având în vedere lipsa unor mijloace chimice eficiente pentru combaterea bolilor viței-de-vie de etiologie virală, fitoplasmatică și bacteriană (cancerul bacterian), se recomandă, ca măsură de bază pentru prevenirea acestor infecții, plantarea plantațiilor viticole de producție cu material săditor sănătos, din categoria biologică Certificat.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. CHEONJ. Y.; FENTON, M.; GJERDSETH, E.; WANG, Q.; GAO, S.; KROVETZ, H.; LU, L.; SHIM, L.; WILLIAMS, N.; LYBBERT, T. J. Heterogeneous benefits of virus screening for grapevines in California. *American Journal of Enology and Viticulture*, 2020, vol. 71, pp. 231–241. ISSN 0002-9254. DOI: 10.5344/ajev.2020.19047.
2. DJENNANE, S.; PRADO, E.; DUMAS, V.; DEMANGEAT, G.; GERSCH, S.; ALAIS, A.; GERTZ, C.; BEUVE, M.; LEMAIRE, O.; MERDINOGLU, D. A single resistance factor to solve vineyard degeneration due to grapevine fanleaf virus. *Communications Biology*, 2021, vol. 4, no. 1, art. 637. DOI: 10.1038/s42003-021-02164-4. PMID: 34050254.
3. **DUBCEAC, M.** Establishment of the nuclear stock (pre-base) of the *Vitis vinifera* genus through phytosanitary selection in the Republic of Moldova. In: *20th Congress of the International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of Grapevine*. Thessaloniki, Greece, September 2023, pp. 167–169.
4. **DUBCEAC, M.**; LOSMANSCHII, C. The influence of LED light spectra on the in vitro growth of grapevine plants. *Romanian Journal of Horticulture*, 2023, vol. 4, pp. 35–42. ISSN 2668-8881. DOI: 10.51258/RJH.2023.03.
5. **DUBCEAC, M.**; HAUSTOV, E.; BONDARCIUC, V. Implementarea metodei PCR pentru identificarea tulpinilor patogene *All. vitis* ce provoacă cancerul bacterian al viței-de-vie. *Știința Agricolă*, 2024, vol. I, pp. 48–54.
6. **DUBCEAC, M.** Metode de asanare a protoclonelor de viță-de-vie în procesul de selecție fitosanitară. *Știința Agricolă / Agricultural Science*, 2023, nr. 2, pp. 74–80.
7. EUROPEAN COMMISSION. *Commission Implementing Regulation (EU) 2019/2072 of 28 November 2019 establishing uniform conditions for the implementation of Regulation (EU) 2016/2031 as regards protective measures against pests of plants*. Official Journal of the European Union, 2019, L 319, pp. 1–279.
8. FUCHS, M. Grapevine virology highlights: 2018–2023. In: *Proceedings of the 20th Congress of the International Council for the Study of Viruses and Virus-like Diseases of the Grapevine (ICVG)*. Thessaloniki, Greece, 25–29 September 2023. Abstracts, pp. 18–26.
9. Hotărârea Guvernului Republicii Moldova nr. 418 din 9 iulie 2009 privind producerea, certificarea, controlul și comercializarea materialului de înmulțire și săditor viticol. *Monitorul Oficial al Republicii Moldova*, 2009, nr. 108–109 (17 iulie). Chișinău.
10. MAREE, H. J.; ALMEIDA, R. P.; BESTER, R.; CHOOI, K. M.; COHEN, D.; DOLJA, V. V.; FUCHS, M. F. et al. Grapevine leafroll-associated virus 3. *Frontiers in Microbiology*, 2013, vol. 4, art. 82. ISSN 1664-302X. DOI: 10.3389/fmicb.2013.00082.
11. ROWHANI, A.; LA NOTTE, P.; UYEMOTO, J. K.; DAUBERT, S. D.; SAVINO, V. Biological assays. In: *Grapevine Viruses: Molecular Biology, Diagnostics and Management*. Heidelberg: Springer, 2017, pp. 395–408. ISBN 978-3-319-57706-7.
12. БОНДАРЧУК, В. В.; МАРИНЕСКУ, В. Г. Получение безвирусных клонов винограда путем отбора. В: *Вирусные, микоплазменные и бактериальные болезни плодовых культур и винограда в Молдавии*. Кишинев, 1980, с. 78–93.

LISTA LUCRĂRILOR ȘTIINȚIFICE LA TEMA TEZEI

ale dnei Dubceac Marcela

doctorandă, Institutul Național de Cercetări Aplicative în Agricultură și Medicină Veterinară

2. Articole în reviste științifice

1. **DUBCEAC, Marcela**; LOSMANSCHIL, Constantin. The influence of LED light spectra on the *in vitro* growth of grapevine plants. *Romanian Journal of Horticulture*, vol. 4, 2023, pp. 35–42. DOI: 10.51258/RJH.2023.03. DOI: <https://doi.org/10.51258/RJH.2023.03> (Revistă indexată în DOAJ)

2. **DUBCEAC, Marcela**. Metode de asanare a protoclonelor de viță de vie în procesul de selecție fitosanitară. În: *Acta et Commentationes, Științe ale Naturii*, nr. 2(2023), pp. 74–80. 74 DOI: 10.55505/sa.2023.2.09. DOI: <https://doi.org/10.55505/sa.2023.2.09> (Revistă indexată DOAJ)

2.3. în reviste din Registrul Național al revistelor de profil:

3. **DUBCEAC, Marcela**; HAUSTOV, Evghenii; BONDARCIUC, Victor. Implementarea metodei PCR pentru identificarea tulpinilor patogene *All. vitis* ce provoacă cancerul bacterian al viței-de-vie. *Știința Agricolă*, vol. I, 2024, pp. 48–54. (Revistă științifică de **categorii B**, indexată în DOAJ)

4. **DUBCEAC, Marcela**; BONDARCIUC, Victor. Evaluarea influenței fitohormonilor IAA și 2iP asupra dezvoltării viței-de-vie (*Vitis vinifera*) în cultură *in vitro*. *Pomicultura, Viticultura și Vinificația*, nr. 2(92), Chișinău, 2024, pp. 6–14. ISSN 1857-3142. (Revistă științifică națională, **categori C**, indexată AGRIS)

5. BONDARCIUC, Victor; SULTANOVA, Olga; **DUBCEAC, Marcela**. Micropropagarea *in vitro* – etapă crucială în crearea plantațiilor-mamă de viță-de-vie. *Pomicultura, Viticultura și Vinificația*, nr. 1(91), 2024. ISSN 1857-3142. (Revistă științifică națională, **categori C**, indexată AGRIS)

6. **DUBCEAC, Marcela**; BONDARCIUC, Victor, SULTANOVA, Olga, HAUSTOV, Evghenii. Crearea plantației-mamă de categorii biologică Prebază din genul *V. vinifera* prin selecția fitosanitară. *Pomicultura, Viticultura și Vinificația*, nr. 1(89), 2023. ISSN 1857-3142. (**Categori C**, indexată AGRIS)

7. **DUBCEAC, Marcela**. Evaluarea parametrilor optici ai recipientelor utilizate în cultura *in vitro* a viței-de-vie: transmisia luminii și uniformitatea radiației. *Pomicultura, Viticultura și Vinificația*, nr. 2, 2025.

3. Articole în lucrările conferințelor și altor manifestări științifice

3.2. în lucrările manifestărilor științifice incluse în alte baze de date acceptate de către ANACEC:

8. **DUBCEAC, Marcela**; SULTANOVA, Olga; BONDARCIUC, Victor. Propagation of phytosanitary clones by *in vitro* culture. International Scientific Conference “*Biologization of the Intensification Processes in Horticulture and Viticulture*”, 21–23 Septembrie 2021, Krasnodar, Rusia, pp. 1–6.

3.3. în lucrările manifestărilor științifice organizate în Republica Moldova:

9. **DUBCEAC, Marcela**. Perfecționarea tehnologiei de obținere a clonelor fitosanitare de viță-de-vie. Teze ale celei de-a 74-a Conferințe Științifice a Studenților, Masteranzilor și Doctoranzilor, UASM, 2021, p. 52.

10. **DUBCEAC, Marcela**. Efectul spectrului luminii în procesul de multiplicare *in vitro* a viței-de-vie. Teze ale celei de-a 75-a Conferințe Științifice a Studenților, Masteranzilor și Doctoranzilor, UASM, 2022.

5. Alte lucrări și realizări specifice domeniului

11. **DUBCEAC, Marcela**. Establishment of the nuclear stock (pre-base) of the *V. vinifera* genus through phytosanitary selection in the Republic of Moldova. In: *20th Congress of the International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of Grapevine*, Thessaloniki, Grecia, 2023, pp. 167–169.

12. **DUBCEAC, Marcela**; HAUSTOV, Evghenii; SULTANOVA, Olga; BONDARCHUK, Victor. Горячая водная терапия в фитосанитарной селекции винограда. – *Русский виноград: сборник научных трудов*, 2020, № 13, с. 16–24. ISSN 2412-9836. URI: <https://doi.org/10.32904/2412-9836-2020-13-16-24> <http://repository.utm.md/handle/5014/24194>

13. HAUSTOV, Evghenii; **DUBCEAC, Marcela**; BONDARCHUK, Victor. Почернение древесины – фитоплазменное заболевание винограда в Республике Молдова. – *Русский виноград: сборник научных трудов*, 2020, № 12, с. 33–40. ISSN 2412-9836. Disponibil la: https://rusvine.ru/wp-content/uploads/2020/09/том-12_33-40.pdf

ADNOTARE

Marcela Dubceac, „Biotehnologia de obținere a clonelor sănătoase de viță de vie” teză de doctorat pentru obținerea titlului de doctor în științe agricole, Chișinău, 2026

Structura tezei: introducere, 4 capitole, concluzii generale și recomandări, bibliografie cu 196 titluri, 10 anexe, 91 pagini principale de text, 27 figuri, 35 tabele. Rezultatele obținute au fost publicate în 13 lucrări științifice.

Cuvinte-cheie: vița-de-vie, boli virale, cancer bacterian, diagnostic fitosanitar, asanare prin termoterapie, multiplicare *in vitro*, clone sănătoase, plantații-mamă viticole.

Domeniul cercetării: științe agricole.

Scopul lucrării: perfecționarea tehnologiei de obținere a clonelor sănătoase de viță-de-vie, în baza metodelor moderne de diagnostic, asanare și multiplicare, în scopul înființării plantației-mamă de categorie biologică Bază.

Obiectivele cercetării: determinarea spectrului agenților patogeni fitosanitari și a gradului de infectare a materialului săditor viticol în condițiile Republicii Moldova; elaborarea regimurilor optime de termoterapie pentru asanarea plantelor inițiale infectate cu agenți patogeni ai bolilor cronice ale viței-de-vie; perfecționarea metodelor de diagnostic fitosanitar al cancerului bacterian la vița-de-vie; optimizarea condițiilor de cultură *in vitro* pentru multiplicarea clonală accelerată a viței-de-vie prin microbutășire; obținerea și multiplicarea clonelor inițiale ale soiurilor europene, autohtone și de selecție nouă, în scopul înființării plantației-mamă de categoria biologică Bază.

Noutatea și originalitatea științifică: pentru prima dată în Republica Moldova a fost elaborată și implementată o tehnologie complexă de obținere a clonelor inițiale asanate de viță-de-vie, care integrează etapele de diagnosticare, asanare, multiplicare *in vitro* și producerea materialului săditor, cu scop de înființare plantației-mamă de categorie biologică Bază.

Rezultatul obținut care contribuie la soluționarea unei probleme științifice importante constă în: elaborarea, testarea și validarea unei tehnologii integrate, bazate pe instrumente biotehnologice avansate, pentru obținerea și multiplicarea clonelor asanate de viță-de-vie, conforme cu cerințele reglementărilor naționale și europene privind materialul săditor de categorie Certificat. Tehnologia propusă include etape de selecție fitosanitară, diagnostic virotic și bacterian prin metode de înaltă precizie, tratamente de asanare, micropropagare *in vitro* în condiții optimizate, urmate de aclimatizare și înființarea plantațiilor-mamă de categorie biologică superioară, reprezentând o soluție științific fundamentată pentru modernizarea sistemului național de producere a materialului săditor viticol.

Semnificația teoretică: lucrarea contribuie la fundamentarea științifică a diagnosticului și tratamentului bolilor virale și cancerului bacterian ale viței-de-vie, oferind metode eficiente pentru identificarea și eliminarea agenților patogeni; de asemenea, dezvoltă baza teoretică aplicabilă pentru utilizarea culturii *in vitro* în multiplicarea accelerată a materialului asanat.

Valoarea aplicativă: clonele inițiale obținute au fost utilizate la înființarea plantației-mamă de categorie biologică Prebază. Materialul obținut din aceste plantații servește ca sursă pentru fondarea plantațiilor de categorie Bază, asigurând producerea de material săditor certificat, în conformitate cu standardele naționale.

Implementarea rezultatelor științifice: butașii de viță altoi și portaltoi din plantația-mamă de categorie biologică Bază sunt livrați către pepinierele viticole din Republica Moldova pentru producerea materialului săditor certificat și înființarea plantațiilor viticole comerciale.

АННОТАЦИЯ

Дубчак Марчела, «Биотехнология получения здоровых клонов винограда»,
диссертация на соискание учёной степени доктора сельскохозяйственных наук,
Кишинёв, 2026

Структура диссертации: Диссертационная работа состоит из введения, четырёх глав, общих выводов и практических рекомендаций, списка литературы из 196 источников, 10 приложений, содержит 91 страницы основного текста, 27 рисунков и 35 таблицы. Результаты исследований опубликованы в 13 научных работах.

Ключевые слова: виноград, вирусы, бактериальный рак, диагностика, термотерапия, размножение *in vitro*, оздоровленные клоны, маточные насаждения.

Область исследований: сельскохозяйственные науки.

Цели исследования: совершенствование технологии получения здоровых клонов винограда на основе современных методов диагностики, оздоровления и размножения с целью закладки маточника биологической категории Базовый.

Задачи исследования: определить спектр фитосанитарных патогенов и степень заражённости посадочного материала винограда в условиях Республики Молдова; усовершенствовать методы фитосанитарной диагностики бактериального рака виноградной лозы; разработать оптимальные режимы термотерапии для оздоровления исходных растений, инфицированных патогенами хронических заболеваний винограда; оптимизировать условия культуры *in vitro* для ускоренного клонального размножения винограда методом микрочеренкования; получить и размножить исходные клоны винограда с целью закладки маточника биологической категории Базовый.

Научная новизна и оригинальность: впервые в Республике Молдова была разработана и внедрена комплексная технология получения исходных оздоровленных клонов винограда, включающая этапы диагностики, оздоровления, ускоренного размножения *in vitro* и производства посадочного материала, с целью закладки маточной плантации биологической категории Базовый.

Решённая важная научная проблема: разработана и апробирована интегрированная биотехнология получения и размножения оздоровленных клонов винограда, соответствующих национальным стандартам категории «Сертифицированный». Технология объединяет фитосанитарный и клональный отбор, точную вирусологическую и бактериальную диагностику, санацию, микроклональное размножение *in vitro* и закладку маточных насаждений высших биологических категорий, обеспечивая модернизацию системы производства посадочного материала винограда.

Теоретическая значимость: Теоретическое значение работы заключается в разработке научных основ диагностики и лечения вирусных и бактериальных заболеваний винограда, что позволяет создать более точные и эффективные методы выявления и устранения патогенов. Работа также вносит значительный вклад в создание научной базы для использования культуры *in vitro* в ускоренном размножении здорового материала.

Практическое значение работы: Полученные здоровые клоны винограда были использованы для закладки маточника категории Пребазовый. Посадочный материал из этих насаждений служит источником лозы для создания маточников категории Базовый, что обеспечивает производство сертифицированного посадочного материала в соответствии с национальными стандартами.

Внедрение научных результатов: черенки привойных и подвойных лоз, выращенные в маточнике биологической категории Базовый, передаются в питомниководческие хозяйства Республики Молдова для получения посадочного материала категории Сертифицированный.

ANNOTATION

Marcela Dubceac, „Biotechnology for Obtaining Healthy Grapevine Clones” PhD thesis in Agricultural Sciences, Chişinău, 2026

Structure of the thesis: Introduction, 4 chapters, conclusions and recommendations, a bibliography with 196 references, 10 annexes, 91 main text pages, 27 figures, and 35 tables. The obtained results have been published in 13 scientific papers.

Keywords: grapevine, viral diseases, bacterial cancer, diagnosis, healthy grapevine clones, thermotherapy, *in vitro* multiplication, grapevine mother plantations.

Field of research: agricultural sciences.

The purpose of the work: improvement of the technology for obtaining healthy grapevine clones, based on modern methods of diagnosis, sanitation, and propagation, aimed at establishing mother plantations of biological category Base.

Research objectives: to determine the spectrum of phytosanitary pathogens and the degree of infection of grapevine planting material in the conditions of the Republic of Moldova; to develop optimal thermotherapy regimes for the sanitation of grapevine plants infected with chronic pathogens; to improve diagnostic methods for bacterial crown gall; to optimize *in vitro* culture conditions for accelerated clonal multiplication through microcutting; to obtain and multiply initial clones of European, local, and newly selected grapevine varieties for the establishment of Base category mother plantations.

Scientific novelty and originality: for the first time in the Republic of Moldova, a complex technology for obtaining sanitized initial grapevine clones was developed and implemented. It integrates the stages of pathogen diagnosis, sanitation, accelerated *in vitro* propagation, and production of planting material for the establishment of mother plantations of the biological category Base.

An important scientific problem solved: the development, testing, and validation of an integrated technology based on advanced biotechnological tools for obtaining and multiplying sanitized grapevine clones, in accordance with national and European regulations on certified planting material. The proposed technology includes stages of phytosanitary selection, high-precision virological and bacterial diagnostics, sanitation treatments, *in vitro* micropropagation under optimized conditions, followed by acclimatization and the establishment of mother plantations of higher biological categories. This constitutes a scientifically grounded solution for modernizing the national system of grapevine planting material production.

The theoretical significance of the work: the research contributes to the scientific foundation of grapevine disease diagnosis and treatment, offering effective tools for identifying and eliminating viral and bacterial pathogens. It also supports the theoretical basis for using *in vitro* culture in the accelerated propagation of sanitized plant material.

The practical significance of the work: the obtained healthy clones were used to establish a Pre-base mother plantation. The plant material from these plantations serves as a source for founding Base category plantations, ensuring the production of certified planting stock in accordance with national standards.

Implementation of scientific results: Grafted and rootstock cuttings from the Base category mother plantation are delivered to grapevine nurseries in the Republic of Moldova to produce certified planting material and the establishment of commercial vineyard.

DUBCEAC MARCELA

**BIOTEHNOLOGIA DE OBTINERE A CLONELOR SĂNĂTOASE DE
VIȚĂ-DE-VIE**

411.09 PROTECȚIA PLANTELOR

Rezumatul tezei de doctor în științe agricole

Aprobat spre tipar – 23.12.2025

Formatul hârtiei – A4

Hârtie ofset. Tipar printer

Tiraj – 40 ex.

Comanda nr. 626

MD 2069, mun. Chișinău, str. Calea Ieșilor, nr. 10
Tipografia „Sofart Studio”