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

Teză de doctorat în științe agricole

Conducător științific:

Victor BONDARCIUC, doctor în științe agricole, cercetător conferențiar

CHIȘINĂU, 2026

UNIVERSITATEA TEHNICĂ A MOLDOVEI

ŞCOALA DOCTORALĂ

Cu titlu de manuscris

C.Z.U.: 634.8:631.7:634.835

DUBCEAC MARCELA

BIOTEHNOLOGIA DE OBŢINERE A CLONELOR SĂNĂTOASE DE VIŢĂ-DE-VIE

411.09 Protecţia Plantelor

Teză de doctorat în ştiinţe agricole

Autor: Marcela DUBCEAC

Conducător ştiinţific:

Victor BONDARCIUC, dr., cerc. conf.

Membrii comisiei de îndrumare:

Membru 1: dr, conf. cercet., Vitalie CEBANU, INCAAMV;

Membru 2: dr. habil., prof. cercet., Leonid VOLOŞCIUC, IGFPP;

Membru 3: prof. univ., dr. habil., Vasile VOINEAC, IGFPP.

Chişinău, 2026

©DUBCEAC MARCELA, UNIVERSITATEA TEHNICĂ A MOLDOVEI,

2026

CUPRINS

ADNOTARE 6

Lista tabelelor 9

Lista figurilor 11

Lista abrevierilor 13

INTRODUCERE 15

1 ASPECTE GENERALE ALE BOLILOR CRONICE LA VIȚA-DE-VIE 22

1.1 Bolile cronice ale viței-de-vie și nocivitatea acestora 22

1.1.1 Degenerarea viței-de-vie (Nepovirusuri) 23

1.1.2 Răsucirea frunzelor viței-de-vie (Closteroviridele) 24

1.1.3 Complexul de boli numit rugozitatea scoarței viței-de vie 26

1.1.4 Complexul fleck și nocivitatea acestuia 27

1.1.5 Bolile fitoplasmatice ale viței-de-vie și nocivitatea acestora 29

1.1.6 Cancerul bacterian al viței-de-vie și nocivitatea acestuia 30

1.2 Studiul bolilor virale și bacteriene ale viței-de-vie în Republica Moldova. Schema de producere a clonelor devirozate 32

1.3 Diagnosticarea bolilor virale ale viței-de-vie 35

1.4 Diagnosticarea cancerului bacterian în plantele de viță-de-vie 37

1.5 Metode de asanare a materialului de înmulțire viticol 39

1.6 Biotehnologii utilizate pentru obținerea și multiplicarea materialului viticol 41

1.7 Analiza situației actuale de producere a materialului de înmulțire viticol asanat 45

1.8 Concluzii la capitolul 1 50

2 MATERIALE ȘI METODE DE CERCETARE 51

2.1 Evidențierea candidaților în clone de viță-de-vie 51

2.2 Evaluarea stării fitosanitare a materialului viticol colectat 56

2.3 Metode de asanare a candidaților în clone de viță-de-vie 59

2.4 Cultura *in vitro* și multiplicarea accelerată a clonelor de viță-de-vie 59

2.5 Cultivarea materialului săditor de viță-de-vie pentru înființarea plantațiilor-mamă Prebază și Bază 63

2.6 Particularitățile terenului destinat înființării plantațiilor-mamă de categorie biologică Prebază și Bază 64

2.7 Implementarea metodei PCR pentru identificarea tulpinilor patogene *A. vitis* responsabile de cancerul bacterian al viței-de-vie 66
2.8 Evaluarea influenței spectrelor luminoase LED asupra dezvoltării plantelor de viță-de-vie în cultură *in vitro* 67
2.9 Evaluarea influenței fitohormonilor IAA și 2iP asupra dezvoltării viței-de-vie în cultura *in vitro* 68
2.10 Selectarea mediilor nutritive pentru regenerare, multiplicare și aclimatizare 68
2.11 Concluzii la capitolul II 69
3 OBȚINEREA CLONELOR ASANATE DE VIȚĂ-DE-VIE 70
3.1 Evaluarea infecțiilor virale în materialul săditor de viță-de-vie din Republica Moldova 71
3.2 Evaluarea cancerului bacterian în materialul săditor de viță-de-vie din Republica Moldova 76
3.3 Obținerea clonelor sănătoase de viță-de-vie prin metoda selecției fitosanitare 80
3.3.1 Evidențierea candidaților în clone de viță-de-vie prin metoda de observare vizuală 81
3.3.2 Diagnosticarea candidaților în clone de viță-de-vie 84
3.4 Asanarea candidaților în clone de viță-de-vie de infecții virale și cancer bacterian 96
3.4.1 Asanarea candidaților în clone de viță-de-vie prin metoda termoterapiei cu apă fierbinte 98
3.4.2 Asanarea candidaților în clone de viță-de-vie împotriva infecțiilor virale 101
3.5 Multiplicarea accelerată a clonelor de viță-de-vie prin metoda culturii *in vitro* 105
3.6 Înființarea plantațiilor-mamă de categorii biologice Prebază și Bază 112
3.7 Schema biotehnologică pentru obținerea și multiplicarea clonelor sănătoase de viță-de-vie în condițiile Republicii Moldova 113
3.8 Concluzii la capitolul 3 116
4 OPTIMIZAREA ELEMENTELOR TEHNOLOGICE DE PRODUCERE A CLONELOR ASANATE DE VIȚĂ-DE-VIE 117
4.1 Evaluarea și implementarea metodelor moleculare de diagnostic al cancerului bacterian la materialul viticol 117
4.2 Influența spectrelor de lumină LED asupra dezvoltării plantelor de viță-de-vie în cultura *in vitro* 122

4.3 Selectarea mediilor nutritive pentru regenerarea și multiplicarea accelerată *in vitro* și aclimatizarea *ex vitro* 130
4.3.1 Selectarea mediilor nutritive pentru regenerarea explantelor de viță-de-vie 131
4.3.2 Selectarea mediilor nutritive pentru multiplicare și aclimatizare la condiții *ex vitro* 135
4.4 Concluzii capitolul 4 138
CONCLUZII GENERALE 139
RECOMANDĂRI PRACTICE 141
BIBLIOGRAFIE 142
ANEXE 160
Anexa 1 Act de înființare a plantației-mamă de categoria biologică Prebaza an. 2019 160
Anexa 2 Act de înființare a plantației-mamă de categoria biologică Prebaza an. 2020 161
Anexa 3 Act de înființare a plantației-mamă de categoria biologică Prebaza an. 2021 162
Anexa 4 Act de înființare a plantației-mamă de categoria biologică Baza an. 2019 163
Anexa 5 Act de înființare a plantației-mamă de categoria biologică Baza an. 2021 164
Anexa 6 Act de înființare a plantației-mamă de categoria biologică Baza an. 2023 165
Anexa 7 Act de înființare a plantației-mamă de categoria biologică Baza an. 2024 166
Anexa 8 Datele experimentale și formulele de calcul utilizate pentru evaluarea influenței spectrelor de lumină asupra dezvoltării viței-de-vie în cultură *in vitro* 167
Anexa 9 Formulele utilizate pentru analiza statistică ANOVA 168
Anexa 10 Date experimentale și formule de calcul utilizate la evaluarea influenței fitohormonilor asupra dezvoltării *in vitro* a viței-de-vie 169
DECLARAȚIA PRIVIND ASUMAREA RĂSPUNDERII 171
DIPLOME ȘI DISTINCȚII 172
CURRICULUM VITAE 175
Lista lucrărilor științifice la tema tezei 179

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 12 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 12 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, Chișinău, 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 12 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.

LISTA TABELELOR

Nr. crt.	Denumirea	Pag.
Tabelul 1.1	Virusurile asociate maladiei răsucirea frunzelor viței-de-vie	25
Tabelul 1.2	Virusurile asociate complexului de boli rugozitatea scoarței viței-de-vie	27
Tabelul 1.3	Virusurile asociate maladiei marmorarea viței-de-vie (Fleck)	28
Tabelul 1.4	Fitoplasmele asociate bolilor fitoplasmatice ale viței-de-vie	30
Tabelul 1.5	Caracteristicile bacteriilor din familia *Rhizobiaceae*	37
Tabelul 2.1	Soluții stoc de macroelemente	61
Tabelul 2.2	Soluții stoc de microelemente	61
Tabelul 2.3	Soluții stoc de vitamine	62
Tabelul 3.1	Evaluarea infecțiilor virale în materialul săditor de viță-de-vie din soiuri autohtone din Republica Moldova (2018-2023)	71
Tabelul 3.2	Evaluarea infecțiilor virale în materialul săditor de viță-de-vie din soiuri de selecție nouă din Republica Moldova (2018–2023)	72
Tabelul 3.3	Evaluarea infecțiilor virale în materialul săditor de viță-de-vie din soiuri europene din Republica Moldova (2018–2023)	74
Tabelul 3.4	Evaluarea *A. vitis* în materialul săditor de viță-de-vie din soiuri autohtone din Republica Moldova (2018–2023)	77
Tabelul 3.5	Evaluarea *A. vitis* în materialul săditor de viță-de-vie din soiuri de selecție nouă din Republica Moldova (2018–2023)	77
Tabelul 3.6	Evaluarea *A. vitis* în materialul săditor de viță-de-vie din soiuri europene din Republica Moldova (2018–2023)	79
Tabelul 3.7	Clasificarea soiurilor de viță-de-vie luate în cercetare	83
Tabelul 3.8	Rezultatele testării candidaților în clone din soiuri de struguri de selecție nouă cu bobul alb la prezența infecțiilor latente cu boli virale și cancer bacterian (2018-2023)	84
Tabelul 3.9	Rezultatele testării candidaților în clone din soiuri de struguri de selecție nouă cu bobul roșu la prezența infecțiilor latente cu boli virale și cancer bacterian (2018-2023)	86
Tabelul 3.10	Rezultatele testării candidaților în clone din soiuri de struguri autohtone cu bobul alb la prezența infecțiilor latente (2018–2023)	88
Tabelul 3.11	Rezultatele testării candidaților în clone din soiuri de struguri autohtone cu bobul roșu la prezența infecțiilor latente (2018–2023)	89

Tabelul 3.12	Rezultatele testării candidaților în clone din soiuri europene de viță-de-vie cu bobul alb pentru infecții latente (2018–2023)	90
Tabelul 3.13	Rezultatele testării candidaților în clone din soiuri europene de viță-de-vie cu bobul roșu pentru infecții latente (2018–2023)	92
Tabelul 3.14	Rezultatele testarii candidaților în clone de portaltoi de viță-de-vie pentru depistarea infecțiilor latente (2018)	93
Tabelul 3.15	Distribuția agenților patogeni în candidații în clone de viță-de-vie din soiuri de selecție nouă, autohtone și europene (2018-2023)	94
Tabelul 3.16	Evaluarea candidaților în clone de viță-de-vie din soiuri cu toate probele testate pozitiv la A. vitis și/sau virusuri (2018–2023)	97
Tabelul 3.17	Impactul tratamentului cu apă fierbinte asupra viabilității mugurilor la materialul viticol de înmulțire	98
Tabelul 3.18	Rezultatele testării materialului viticol asanat prin termoterapia cu aer fierbinte la 30 și 40 de zile după tratament	104
Tabelul 3.19	Lista soiurilor de viță-de-vie și a clonelor multiplicate prin metoda microbutășirii *in vitro*	111
Tabelul 4.1	Rezultatele determinării prezenței bacteriei *Agrobacterium spp*. prin metoda microbiologică	119
Tabelul 4.2	Rezultatele identificării moleculare a izolatelor bacteriene testate prin metoda PCR	121
Tabelul 4.3	Rezultatele măsurărilor fotometrice a surselor de iluminare utilizate	122
Tabelul 4.4	Parametrii morfologici medii pentru plantele de viță-de-vie cultivate 30 zile în condiții *in vitro*	128
Tabelul 4.5	Datele statistice obținute prin analiză dispersională univariată	129
Tabelul 4.6	Rezultatele influenței fitohormonilor asupra parametrilor de creștere și dezvoltare *in vitro* a viței-de-vie	132
Tabelul 4.7	Corelațiile parametrilor de creștere și semnificația statistică a diferențelor între variantele studiate	133
Tabelul 4.8	Evaluarea eficienței substratului „Biona-311” în etapele de multiplicare și aclimatizare a viței-de-vie (2018–2020)	137

LISTA FIGURILOR

Nr. crt.	Denumirea	Pag.
Fig. 1.1	Schema de producere a clonelor de viță-de-vie libere de boli virotice în Republica Moldova, implementată în 1980	33
Fig. 1.2	Schema procesului aplicat în Italia pentru obținerea materialului inițial (stoc nuclear), în conformitate cu programul de certificare implementat în Uniunea Europeană	48
Fig. 3.1	Distribuția infecțiilor virale în materialul săditor viticol din pepiniere în Republica Moldova (2018-2023)	75
Fig. 3.2	Simptome foliare ale unor viroze ale viței-de-vie	81
Fig. 3.3	Simptome foliare ale unor viroze și fitoplasmose ale viței-de-vie	82
Fig. 3.4	Simptomele de cancer bacterian la vița-de-vie	83
Fig. 3.5	Pregătirea butașilor de viță-de-vie pentru tratamentul cu apă fierbinte	100
Fig. 3.6	Tratarea butașilor de de viță-de-vie în termostat de laborator	100
Fig. 3.7	Ghivece cu folie protectoare cu butași de viță-de-vie înrădăcinați în cameră climatică	102
Fig. 3.8	Explante introduse în eprubete cu mediu nutritiv agarizat în camera culturală	103
Fig. 3.9	Plantele regenerate cu 6-8 internoduri, după 40 zile de cultură	103
Fig. 10	Procedee de multiplicare a viței-de-vie	106
Fig. 3.11	Butașii de viță-de-vie plantați în ghivece cu substrat de turbă	107
Fig. 3.12	Cultivarea explantelor de viță-de-vie în condiții *in vitro* sub iluminare cu lămpi LED	108
Fig. 3.13	Camera de cultură *in vitro* pentru multiplicarea viței-de-vie	108
Fig. 14	Micropropagarea viței-de-vie pe substratul „Biona-311”	108
Fig. 3.15	Plante de viță-de-vie în faza de aclimatizare în containere multicelulare în camera de vegetație	109
Fig. 3.16	Cultivarea plantelor de viță-de-vie în seră	112
Fig. 3.17	Biotehnologia dezvoltată de obținere a clonelor asanate de viță-de-vie	114
Fig. 3.18	Compararea tehnologiilor de obținere a vițelor vegetante de viță-de-vie destinate înființării plantației-mamă de categoria biologică Prebază	114
Fig. 4.1	Coloniile de bacterii din complexul *Agrobacterium spp* pe mediul selectiv Roy & Sasser	119

Fig. 4.2	Electroforegrama obținută în urma reacției PCR pentru identificarea tulpinilor de *A. vitis* şi *A. tumefaciens*	120
Fig. 4.3	Spectrele de emisie a corpurilor de iluminat utilizate	123
Fig. 4.4	Distribuțiile de suprafață a parametrului PPFD	125
Fig. 4.5	Distribuția de suprafață a parametrului DLI	126
Fig. 4.6	Numărul de explante care au inițiat formarea rădăcinilor după 14 zile de cultură *in vitro*	127
Fig. 4.7	Numărul de plante complet înrădăcinate după 30 de zile de cultură *in vitro*	127

LISTA ABREVIERILOR

A. tumefaciens	*Agrobacterium tumefaciens*
A. vitis	*Allorhizobium vitis* (sin. *Agrobacterium vitis*)
AIA	Acid indolacetic
BN	*Bois Noir*
Ca. P. solani	*Candidatus Phytoplasma solani*
Ca. P. vitis	*Candidatus Phytoplasma vitis*
DLI	Cantitatea totală de lumină fotosintetic activă primită zilnic (Daily Light Integral)
ELISA	Test imunoenzimatic (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)
EPPO	Organizația Europeană și Mediteraneană pentru Protecția Plantelor (European and Mediterranean Plant Protection Organization)
FD	*Flavescence dorée*
GFLV	*Grapevine fanleaf virus*
GFkV	*Grapevine fleck virus*
GLRaV-1	*Grapevine leafroll-associated virus-1*
GLRaV-3	*Grapevine leafroll-associated virus-3*
GVA	*Grapevine virus A*
ICVG	Consiliul Internațional pentru Studiul Virusurilor și Bolilor asemănătoare Virusului la Vița-de-vie (*International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine*)
IP INCAAMV	Instituție Publică „Institutul Național de Cercetări Aplicative în Agricultură și Medicină Veterinară”
ISSR	Markeri moleculari de tip Inter Simple Sequence Repeat
IȘPHTA	Institutul Științifico-Practic de Horticultură și Tehnologii Alimentare
LED	Diodă emițătoare de lumină (Light Emitting Diode)
MS	Mediu nutritiv Murashige & Skoog
NAPPO	Organizația Nord-Americană pentru Protecția Plantelor (North American Plant Protection Organization)
NCPN	Rețeaua Națională pentru Plante Curate – SUA (National Clean Plant Network)
NGS	Secvențiere de nouă generație (Next-Generation Sequencing)

ORNC	Organisme dăunătoare reglementate necarantină (non-quarantine regulated pests)
pb	Perechi de baze
pTi / Ti	Plasmidă *tumor-inducing* din *Agrobacterium*, care determină caracterul tumorigenic al bacteriei, responsabil de apariția galei coronare la plante
PAR	Radiație fotosintetică activă (Photosynthetically Active Radiation)
PPFD	Densitatea fluxului de fotoni fotosintetici (Photosynthetic Photon Flux Density)
RT-PCR	Reacția de polimerizare în lanț cu transcriere reversă (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)
T-DNA	Transfer DNA
TAF	Terapia cu apă fierbinte
UE	Uniunea Europeană
2iP	Izopenteniladenină
6-BAP	6-Benzilaminopurină

INTRODUCERE

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, fitoplasmatice 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 [57]. 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, care poate genera material săditor afectat [131, 139]. 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 [175, 193]. 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). Maladiile produse de aceștia reduc considerabil cantitatea și calitatea producției, influențează longevitatea plantelor, deoarece afectează plantele de viță-de-vie sistemic. Cele mai dăunătoare virusuri pot duce la pierderi de 20-70% din toată recolta [174, 176, 187]. Răspândirea virusului din familia *Closterovedae* (GLRaV-3) într-o podgorie franceză, care a provocat creșterea incidenței bolii asociate răsucirii frunzelor de la 5% la 86% pe parcursul a opt ani [105]. 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 [28]. 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 [38].

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 [131].

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.

Metoda convențională de obținere a clonelor asanate necesită o perioadă îndelungată, aproximativ de 3 ani, iar succesul acesteia este uneori influențat de condițiile meteorologice, ceea ce limitează eficiența procesului de multiplicare. Factorii climatici precum variațiile bruște de temperatură, umiditatea ridicată, precipitațiile excesive sau lipsa lor pot afecta negativ rata de regenerare a plantelor și le pot expune la infecții secundare. În condiții de câmp, nu este posibil controlul strict al mediului înconjurător, ceea ce reduce semnificativ șansele de obținere a unui material săditor complet sănătos și uniform. Astfel, imposibilitatea de a menține parametri constanți pe durata procesului de asanare și multiplicare constituie un dezavantaj major al metodei convenționale. Optimizarea procesului dat poate fi realizată prin aplicarea metodelor precum cultura *in vitro*, de asanare prin termoterapie, testarea folosind tehnicile ELISA și PCR, care permit obținerea și multiplicarea clonelor asanate. Analiza surselor de literaratură arată, că aplicarea acestor metode permite reducerea duratei necesare pentru obținerea materialului săditor viticol sănătos și introducerea noilor soiuri în producție. De asemenea, aceste metode oferă posibilitatea de a desfășura lucrări pe tot parcursul anului și de a accelera procesul de multiplicare comparativ cu metodele tradiționale [59]. Un alt avantaj important al utilizării materialului săditor liber de virusuri, obținut prin metoda *in vitro*, este legat de procesul natural de întinerire prin care trec plantele în timpul regenerării. În condiții de cultură controlată, țesuturile meristematice folosite la multiplicare nu sunt afectate de factorii de stres la care planta-mamă a fost expusă în mediul natural, cum ar fi variațiile climatice, atacurile de boli sau procesele fiziologice asociate

îmbătrânirii. Ca urmare, plantele obținute au o stare fiziologică rejuvenată, prezintă o vigoare mai bună, o capacitate crescută de adaptare și o uniformitate superioară. Acest efect de întinerire contribuie semnificativ la calitatea și performanța materialului săditor.

Descrierea situației în domeniul de cercetare. În spațiul internațional, procesele de producere, comercializare și distribuire a materialului de multiplicare a viței-de-vie se efectuează cu control strict a stării de sănătate a soiurilor și clonelor. Aceasta include certificarea materialului săditor de către instituții specializate, precum și un control riguros și detaliat al stării fitosanitare a materialului vegetal viticol, atât în momentul importului, cât și al exportului. Acest control presupune testarea plantelor pentru prezența virusurilor, bacteriilor sau altor agenți patogeni, verificarea documentației de însoțire, precum și respectarea strictă a normelor și standardelor fitosanitare naționale și internaționale. Printre aceste instituții se numără: *ENTAV* și *INRA* din Franța, *CESENA* din Italia, *GAZENHEIM* din Germania, *National Grape Clean Plant Network* (NCPN) din SUA, *The Canadian Plant Protection Export Certification Program* (PPECP) din Canada, *Vine Improvement Association* din Africa de Sud ș.a.

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 [159]. 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 [50, 160-162]. Principiile generale includ alegerea plantelor candidați în clone din soiurile și clonele înregistrate, evaluarea și testarea acestora (ELISA, PCR), izolarea lor în condiții de sere sau câmpuri speciale, și retestarea periodică. Pe parcursul anilor legislația UE a fost modificată și ca rezultat, prin Regulamentul de punere în aplicare (UE) 2019/2072 al comisiei UE a fost stabilit pragul pentru materialul de înmulțire inițial, materialul de înmulțire bază, materialul certificat și standard pentru virusurile GFLV și ArMV, GLRaV-1 și GLRaV-3, și GFkV (doar pentru portaltoi) care este admis în proporție de 0% [52]. Această schimbare este semnificativă, când o raportăm la cerințele din legislația anterioară, prevăzute în Directiva 68/193/CEE, care permitea până la 1% plante infectate în cazul materialului certificat și până la 5% pentru materialul standard. Diferența este clară: de la o anumită toleranță față de prezența virusurilor, s-a trecut la o toleranță zero, ceea ce obligă pepinierele să utilizeze exclusiv material săditor sănătos. De asemenea, în lista organismelor dăunătoare reglementate (ORNC) a fost inclus *Candidatus Phytoplasma vitis*, agentul patogen responsabil de boala îngălbenirea aurie.

Totuși, reglementarea actuală stârnește unele discuții, cum ar fi acceptarea, greu de explicat, a prezenței virusului GFkV în coardele de altoi, ca și cum acest virus nu ar avea capacitatea de a se transloca în vița-de-vie altoită. De asemenea, nu este menționat niciun virus din complexul Rugozitatea scoarței viței-de-vie (RS), iar *GLRaV-2*, recunoscut unanim ca fiind unul dintre cei mai periculoși și dificil de controlat factori ai incompatibilității la altoire, nu este inclus în lista agenților reglementați. În plus, *A. vitis* nu a fost inclus în lista ORNC, deși este prezent în multe regiuni viticole și se poate transmite prin materialul săditor [158].

Republica Moldova a făcut pași importanți spre integrarea în spațiul european și internațional, adoptând un program național pentru certificarea materialului săditor viticol, prin care a stabilit standarde stricte și proceduri pentru a asigura, că materialul viticol destinat multiplicării este sănătos și lipsit de virusurile GLRaV, GFLV, GFkV, GRSPV (*Grapevine Rupestris Stem Pitting Virus*) [73]. Legislația națională face referire și la prezența unor boli de importanță fitosanitară majoră, precum cancerul bacterian și îngălbenirea aurie (*Flavescence dorée*), a căror monitorizare este esențială în procesul de certificare a materialului săditor viticol.

Conform sistemului național de certificare, materialul este clasificat în următoarele categorii: Prebază, Bază, Certificat și Standard, fiecare cu cerințe specifice privind starea fitosanitară. În plantațiile-mamă de categoria Prebază, apariția chiar și a unei singure plante cu simptome de cancer bacterian determină respingerea întregii plantații. În cazul plantațiilor din categoria Bază, nu este admisă nicio prezență a bolilor virotice sau a cancerului bacterian, iar detectarea unor asemenea simptome duce automat la declasare. Pentru categoria Certificat, plantațiile se resping dacă mai mult de 5% dintre butuci sunt afectați de cancer bacterian sau dacă, cumulativ în timp, afectarea depășește 8%. În ceea ce privește infecțiile virale, materialul săditor din școlile de vițe este acceptat doar dacă procentul plantelor afectate nu depășește 10%; în caz contrar, materialul de categoria Certificat se declasează în Standard, iar materialul din categoria Standard se distruge. Aceste reglementări reflectă preocuparea pentru asigurarea unui material săditor de calitate înaltă și pentru prevenirea răspândirii agenților patogeni în plantațiile viticole, în conformitate cu cerințele tot mai stricte ale pieței europene. Cu toate acestea, țara încă se confruntă cu lipsa plantațiilor-mamă de vițe altoi, ceea ce face imposibilă obținerea materialului viticol certificat și limitează posibilitățile de modernizare a sectorului viticol.

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 fitoplasmatice înnegrirea lemnului în toate zonele de cultivare a viței-de-vie, cu o incidență variind între 1% și 100% [70]. Această boală, cauzată de fitoplasma

'Ca. P. solani' reprezintă o amenințare majoră pentru vița-de-vie prin manifestările sale specifice, care afectează grav funcționarea fiziologică a plantei. Printre simptomele cele mai vizibile se numără îngălbenirea sau înroșirea frunzelor, fenomen determinat de dereglarea metabolismului pigmenților și a fluxului de nutrienți. De asemenea, frunzele se îngroașă și capătă un aspect casant, ceea ce reduce eficiența fotosintezei. Lăstarii nu mai lignifică corespunzător, rămân verzi până târziu în toamnă, devenind sensibili la îngheț și rupere. Strugurii prezintă o maturizare neuniformă, cu boabe rămase verzi sau stafidite, ceea ce afectează producția și calitatea recoltei. Toate aceste simptome contribuie la o slăbire fiziologică progresivă a plantelor [30].

Testările fitosanitare efectuate în cadrul IP INCAAMV (IP IȘPHTA) au evidențiat o incidență înaltă a bolilor de etiologie virotică, ce persistau în plante în forma latenta. Virusurile GLRaV-1 și GLRaV-3, responsabile de răsucirea frunzelor, au fost detectate în proporții cu valori cuprinse între 8-26% și 7-39% respectiv [41]. Aceste infecții determină modificări fiziologice ale viței-de-vie, afectând procesul de fotosinteză, acumularea de zaharuri și maturarea strugurilor, ceea ce duce la scăderea calității producției [13, 118]. 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% [41]. Această bacterie colonizează vasele conducătoare, determinând formarea unor tumori care blochează transportul de apă și nutrienți, ceea ce conduce treptat la slăbirea butucilor și la declinul lor fiziologic [24].

Reeșind 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.

Aprobarea rezultatelor științifice. Teza a fost elaborată și discutată în cadrul comisiilor Școlii doctorale al parteneriatului instituțiilor de învățământ și cercetare în agricultură. Rezultatele au fost aprobate de către comisia de îndrumare din cadrul Școlii doctorale respective.

Introducerea oferă o sinteză a situației actuale privind sănătatea viței-de-vie, evidențiind impactul bolilor virale, fitoplasmatice și al cancerului bacterian asupra producției viticole. Este argumentată necesitatea utilizării biotehnologiilor avansate pentru diagnostic, asanare și multiplicare a clonelor sănătoase, fiind prezentate reglementările internaționale și naționale relevante. Sunt definite scopul și obiectivele cercetării, formulată ipoteza de lucru și metodologia de cercetare, cu justificarea metodelor de analiză alese și sumarul compartimentelor tezei.

Capitolul 1, ASPECTE GENERALE ALE BOLILOR CRONICE LA VIȚA-DE-VIE, prezintă o analiză a principalelor boli virale, fitoplasmatice și bacteriene care afectează vița-de-vie, evidențiind impactul acestora asupra sănătății plantelor și productivității culturilor. Sunt descrise virusurile asociate cu bolile precum răsucirea frunzelor, degenerarea frunzelor, rugozitatea scoarței viței-de vie și complexul Fleck, alături de fitoplasmoze și cancerul bacterian. Capitolul abordează stadiul actual al cercetărilor privind aceste boli în Republica Moldova, metodele moderne de diagnostic, inclusiv identificarea *A. vitis*, și strategiile esențiale pentru prevenirea răspândirii patogenilor în plantațiile viticole.

Capitolul 2, MATERIALE ȘI METODE DE CERCETARE, descrie metodologia utilizată în realizarea studiului, caracteristicile obiectelor de cercetare și condițiile experimentale. Sunt prezentate etapele de evidențiere a candidaților în clone, evaluarea vizuală a plantelor în teren, precum și metodele aplicate pentru diagnosticul virusurilor și cancerului bacterian, incluzând testarea ELISA, analiza microbiologică și tehnica PCR. De asemenea, sunt detaliate metodele de asanare prin termoterapie și procedurile de multiplicare *in vitro*, tehnologiile de sterilizare, aclimatizare și fortificare a plantelor de de viță-de-vie. Capitolul prezintă, de asemenea, designul experimental și metodele de analiză statistică utilizate pentru interpretarea rezultatelor obținute.

Capitolul 3, OBȚINEREA CLONELOR ASANATE DE VIȚĂ-DE-VIE, prezintă rezultatele cercetărilor privind identificarea bolilor virale și a cancerului bacterian în materialul de înmulțire viticol din Republica Moldova, provenit din diferite categorii de soiuri utilizate — autohtone, de selecție nouă și europene. Sunt descrise etapele de selecție fitosanitară, rezultatele diagnosticului agenților patogeni ai candidaților în clone și aplicarea tehnicilor de asanare, precum termoterapia și cultura *in vitro*, care au permis obținerea clonelor sănătoase de viță-de-vie. Sunt prezentate rezultatele privind multiplicarea acestora prin metoda de microbutășire pe substratul artificial „Biona-311" și înființarea plantațiilor-mamă de categoriile Prebază și Bază.

Capitolul 4, OPTIMIZAREA ELEMENTELOR TEHNOLOGICE DE PRODUCERE A CLONELOR ASANATE DE VIȚĂ-DE-VIE, prezintă rezultatele cercetărilor orientate spre perfecționarea etapelor tehnologice de obținere a materialului de înmulțire viticol sănătos. Este descrisă evaluarea și implementarea metodelor moleculare de diagnostic al bacteriei *Agrobacterium vitis* la materialul viticol, în vederea creșterii eficienței și preciziei identificării agentului patogen. Sunt analizate influența spectrelor de lumină LED asupra dezvoltării plantelor de viță-de-vie în cultura *in vitro* și determinarea spectrului optim pentru creșterea și regenerarea acestora. Sunt prezentate rezultatele privind selectarea mediilor nutritive pentru regenerarea și multiplicarea accelerată *in vitro* și aclimatizarea *ex vitro*, care au contribuit la sporirea eficienței producerii clonelor sănătoase de viță-de-vie.

Concluziile generale și recomandările oferă o sinteză a principalelor rezultate obținute în urma cercetărilor, organizate în funcție de capitolele prezentate.

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 accelerată *in vitro* și producerea materialului săditor, având drept scop înființarea plantației-mamă de cea mai înaltă categorie biologică – Bază.

Sumarul compartimentelor tezei. Lucrarea cuprinde adnotarea prezentată în limbile română, engleză și rusă, lista tabelelor, lista figurilor, lista abrevierilor, lista terminilor, introducere, patru capitole, concluzii generale și recomandări practice, bibliografie, declarația privind asumarea răspunderii și CV-ul autorului. Bibliografie din 196 de titluri, 10 anexe, 91 de pagini text de bază, 27 de figuri, 35 de tabele.

Publicațiile la tema tezei. Rezultatele științifice obținute au fost reflectate în 12 lucrări științifice: 5 articole în Registrul Național de Profil, 1 articol în reviste internaționale, 2 articole în lucrările conferințelor științifice internaționale, 2 teze în lucrările conferințelor naționale și 2 lucrări de monoautor.

1 ASPECTE GENERALE ALE BOLILOR CRONICE LA VIȚA-DE-VIE

1.1 Bolile cronice ale viței-de-vie și nocivitatea acestora

Bolile cronice ale viței-de-vie, cum ar fi bolile virale, fitoplasmatice 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 acesteia [10, 105]. 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 [13, 118]. Deoarece aceste boli sunt cronice și sistemice, înmulțirea vegetativă din butucii infectați duce la producerea de material săditor contaminat, favorizând astfel răspândirea suplimentară a 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. Printre cauzele care au creat o astfel de situație, un rol major l-a avut și mai este comerțul internațional de material săditor viticol infectat. 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 [57].

În diferite germoplasme *Vitis* pe plan mondial au fost descriși 101 virusuri, având genomul ARN sau ADN monocatenar ori dublu catenar, aceștia fiind clasificați în 21 de familii: *Alphaflexiviridae*, *Betaflexiviridae*, *Bromoviridae*, *Caulimoviridae*, *Closteroviridae*, *Endornaviridae*, *Fimoviridae*, *Geminiviridae*, *Luteoviridae*, *Nantiviridae*, *Mayoviridae*, *Peribunyaviridae*, *Phenuiviridae*, *Potyviridae*, *Reoviridae, Rhabdoviridae*, *Secoviridae, Solemoviridae*, *Tombusviridae*, *Tymoviridae, Virgaviridae*. Multe dintre aceste virusuri, adesea în

combinații, sunt implicate în apariția unor boli severe ale viței-de-vie, cu impact major asupra sănătății plantelor. Printre cele mai importante afecțiuni virale se numără: degenerarea viței-de-vie, răsucirea frunzelor viței-de-vie, complexul de boli numită rugozitatea scoarței viței-de-vie și complexul de boli fleck. Aceste sunt cele patru tulburări principale ale viței-de-vie, care sunt induse de speciile de virusuri ce aparțin familiilor *Closteroviridae* (Gen – *Ampelovirus*, *Closterovirus*, *Velarivirus*.), *Betafexiviridae* (Gen – *Foveavirus, Vitivirus*), *Secoviridae* (Gen – *Nepovirus*) și, respectiv, *Tymoviridae* (Gen – *Marafivirus*, *Maculavirus*).

1.1.1 Degenerarea viței-de-vie (Nepovirusuri)

Degenerarea viței-de-vie este cauzată de un număr de virusuri din genul *Secoviridae*, familia *Nepovirus*. Sunt cunoscute două grupuri de afecțiuni degenerative cauzate de nematodele europene și americane (i) degenerarea infecțioasă și, (ii) declinul viței-de-vie. Degenerarea infecțioasă cauzată de nepovirușii europeni este cunoscută în mod colectiv sub denumirea de scurt-nodarea viței-de-vie. Principalul și cel mai diseminat agent etiologic al bolii este virusul *Grapevine Fanleaf Virus* (GFLV), a cărui formă este poliedrică de mărimea 30 nm, care apare în aproape toate regiunile în care sunt cultivate *V. vinifera* și portaltoi [107]. Pierderile de recolte produse de virus pot fi semnificative până la 77%, iar daunele economice sunt estimate la circa 16.600 USD/ha, ceea ce face ca această viroză să reprezinte o amenințare pentru viile din întreaga lume [38]. Celelalte nepovirusuri prezintă o distribuție mai regională [11]. Sunt cunoscute două simptomatologii induse de diferite tulpini de GFLV: (i) malformații infecțioase induse de tulpini care provoacă distorsiuni și (ii) mozaic galben cauzat de tulpinile de virus cromogen ce afectează dezvoltarea aparatului foliar și reduc fertilitatea inflorescențelor [109].

În cazul malformațiilor: frunzele, lăstarii, ciorchinii sunt malformate. Frunzele au un sinus pețiolar larg deschis, limb foliar asimetric, cu lobi adânci, denticulații acute și cu nervuri neregulate. Deformările foliare pot fi însoțite de pete clorotice. Lăstarii prezintă ramificații anormale, noduri duble, internoduri scurte și creștere în zig-zag. Fructele se coc neregulat. Simptomele foliare se dezvoltă devreme în primăvară și persistă pe tot parcursul sezonului vegetativ, devenind mai puțin distincte vara [126].

Mozaicul galben indus de tulpini de virus cromogen, este caracterizat prin decolorări strălucitoare pe toate părțile vegetative (frunze, lăstari, inflorescențe), ce apar la începutul verii. Odată cu creșterea temperaturii ambientale în timpul verii, îngălbenirea dispare [11].

Răspândirea la distanțe mari a virusului scurt-nodării este asigurată, în principal, prin multiplicarea, comercializarea și plantarea materialului de înmulțire infectat. De asemenea, poate

fi transmis de la o viță la alta prin indicele nematod *Xiphinema index* (familia *Longidoridae),* care se hrănește cu vârfurile rădăcinilor. Virusul poate fi dobândit și transmis atât de stadiile juvenile, cât și de către adulții vectorului. Particulele de virus pot persista în vectorul *Xiphinema index* timp de peste 4 ani. Răspândirea prin intermediul nematozilor are loc cu o viteză redusă, care nu depășește 1,3-1,5 m/an. Datorită deplasării la distanțe mici a nematodelor, atacul în câmp al virusurilor începe în vetre, cu orientare de-a lungul rândurilor deoarece transportarea infecției se realizează și prin uneltele de muncă utilizate. Virusul GFLV poate fi, de asemenea, diseminat prin transferul de sol care conține rădăcini de la plante infectate și vectorii acestei boli. A fost raportată și transmiterea ocazională prin semințe [108].

Alături de GFLV sunt cunoscute alte 10 nepovirusuri (AILV, ArMV, CLRV, GBLV, GARSV, GDefV, GCMV, GTRV, RpRV, TBRV) care pot infecta vița-de-vie în Europa, Mediterana și Orientul Mijlociu, provocând boli cu simptome similare ale GFLV. Efectele nocive ale acestor virusuri asupra culturii viței-de-vie au fost rezumate de Martelli și colab. [108].

1.1.2 Răsucirea frunzelor viței-de-vie (Closteroviridele)

Familia *Closteroviridae* cuprinde trei genuri: *Closterovirus, Ampelovirus, Velarivirus*. Speciile de virusuri din această familie sunt asociate cu Răsucirea frunzelor viței-de-vie care este considerată cea mai răspândită boală virală a viței-de-vie și apare în majoritatea zonelor viticole ale lumii [109]. La plantele infectate are loc stagnarea severă în creștere, reducerea plantelor în dimensiuni. În condițiile țării noastre, boala se manifestă la soiurile roșii începând cu luna iulie, prin apariția de pete roșietice, mai târziu petele se măresc dând frunzelor o culoare roșietică uniformă, iar de-a lungul nervurilor principale și secundare rămân benzi verzi late de câțiva milimetri. Are loc răsucirea frunzelor dinspre partea superioară spre cea inferioară. La soiurile cu struguri albi, apare o clorozare ușoară a spațiilor internervuriene. Simptomele devin evidente în lunile august-septembrie. În ultimul stadiu apar pete de arsură pe frunze localizate în spațiile dintre nervure. Alte simptome – coarde nelignificate cu un număr mai mic de ochi, maturarea anormală a strugurilor, ciorchinii butucilor bolnavi sunt mai mici decât cei sănătoși, conținutul în zahăr este mai redus și crește aciditatea titrabilă a sucului de fructe. Infecția reduce vigoarea și randamentul viței-de-vie în medie cu 15–20%. Speciile utilizate ca portaltoi nu prezintă simptome de boală, cu excepția unei scăderi în vigoare [109].

Pentru identificarea virusurilor din familia *Closteroviridae* la nivel de specie, denumirile acestora sunt specificate de un indicativ numeric. În prezent, există cinci GLRaV recunoscute, dintre care majoritatea (GLRaV-1, -3 și -4) sunt ampelovirusuri, GLRaV-2 este un closterovirus și GLRaV-7 este un membru al noului gen *Velarivirus*. GLRaV-urile din genul *Ampelovirus* sunt

separate în continuare în două subgrupe distincte filogenetic, subgrupul I care include GLRaV-1 și -3 și subgrupul II alcătuit din GLRaV-4 și tulpini înrudite, fostele GLRaV-5, -6, -9, și -Car.

Cu toate că GLRaV sunt răspândite în diferite regiuni ale lumii (tabelul 1.1), GLRaV-3 este cel mai larg distribuit [105]. Tulpinile GLRaV-1, -3 sunt cauze majore ale simptomelor de răsucire a frunzelor la viță-de-vie. Infecțiile cu GLRaV-4 provoacă simptome mai ușoare, în timp ce infecțiile cu GLRaV-7 sunt asimptomatice sau cu simptome puțin manifestate. Unele tulpini GLRaV-2 pot cauza daune severe de incompatibilitate a altoiilor pe anumiți portaltoi [64]. A fost estimată răspândirea virusului GLRaV-3 într-o podgorie din Franța, unde incidența bolii asociate răsucirii frunzelor a crescut de la 5% la 86% pe parcursul a opt ani [105]. Într-un alt studiu au fost estimate pierderile economice în California cauzate de virusul GLRaV-3 care au constituit de peste 90 de milioane $ anual [28]. GLRaV sunt transmise prin propagare vegetativă și altoire, inclusiv prin vectorii agenților respectivi insectele din genurile *Heliococcus, Planococcus, Phenacoccus,* și *Neopulvinaria, Pseudococcus, Pulvinaria, Parthenolecanium, Saissetia, Coccus, Parasaissetia* și *Ceroplastes* fiind raportate că transmit unul sau mai multe dintre ampelovirusurile asociate răsucirii frunzelor [72, 110, 120].

Tabelul 1.1 Virusurile asociate maladiei răsucirea frunzelor viței-de-vie [102]

Familia	Genul	Specia	Vectorii	Mod de transmitere	Caracteristici generale
Closteroviridae	*Ampelovirus* subgrupa I	*GLRaV*-1	Păduchi lânoși și alte insecte din mai multe genuri.	Înmulțire vegetativă, altoire, transmitere vectorială.	– particule filamentoase lungi – ARN monocatenar cu sens pozitiv – restricționați în floem
		GLRaV-3			
	Ampelovirus subgrupa II	*GLRaV*-4	Păduchi lânoși		
	Closterovirus	*GLRaV*-2	Necunoscut	Înmulțire vegetativă, altoire.	
	Velarivirus	*GLRaV*-7	Necunoscut		

Analizând datele din tabelul 1.1, se conturează câteva observații despre virusurile care provoacă răsucirea frunzelor la vița-de-vie. Toate aparțin familiei *Closteroviridae* și au în comun structura de tip ARN monocatenar cu sens pozitiv, fiind localizate exclusiv în floem. Cele mai răspândite virusuri, GLRaV-1 și GLRaV-3, fac parte din genul *Ampelovirus* (subgrupa I) se transmit prin vectori biologici, în special păduchii lânoși, dar și prin metode vegetative precum altoirea. Virusul GLRaV-4, din subgrupa II, are o distribuție mai restrânsă comparativ cu celelalte virusuri din aceeași familie, însă modul de transmitere este similar, prin înmulțire vegetativă și altoire. Până în prezent, nu au fost identificați vectorii implicați în transmiterea virusului GLRaV-2. De asemenea, în cazul virusului GLRaV-7, mecanismul de transmitere rămâne neclar.

Deși există diferențe în agresivitatea virusurilor, toate au potențialul de a fi transmise prin material săditor infectat. Acest lucru evidențiază importanța utilizării materialului de înmulțire sănătos, pentru a preveni introducerea și răspândirea patogenilor în plantațiile viticole.

1.1.3 Complexul de boli numit rugozitatea scoarței viței-de vie

Complexul de boli, rugozitatea scoarței viței-de-vie (RS), este răspândit în majoritatea regiunilor viticole ale lumii [109]. Acesta include patru boli distincte, care rămân latente la vițele pe rădăcini proprii de *Vitis vinifera* și la speciile americane de portaltoi, iar simptomele apar doar la butașii altoiți. Cel mai caracteristic simptom al RS este apariția modificărilor pe cilindrul lemnos, sub formă de adâncituri și brazde, care pot afecta fie descendentul, fie portaltoiul, fie ambele. Aceste simptome pot fi identificate prin indexare biologică pe anumite plante indicatoare din genul *Vitis*, precum *Vitis rupestris*, sau pe portaltoi hibrizi interspecifici, cum sunt LN 33 (*Vitis berlandieri* × *Vitis rupestris*) și Kober 5BB (*V. berlandieri* × *V. riparia*) și sunt denumite în funcție de manifestările induse*:* (i) Corky bark (*CB*) – spongiozitatea scoarței (scoarța de plută), caracterizată prin îngroșarea și textura neregulată a scoarței; (ii) Rupestris stem pitting (RSP) – strierea lemnului, manifestată prin apariția unor benzi longitudinale ce se extinde în jos de la punctul de inoculare pe *Vitis rupestris*; (iii) Kober stem grooving (KSG) – apariția unor șanțuri pronunțate pe tulpina portaltoiului R × R Kober 5BB, fără a induce simptome vizibile pe *Vitis rupestris* sau LN 33; (iv) LN 33 stem grooving – formarea de șanțuri pe tulpina portaltoiului LN 33, însoțită de îngroșarea și aspectul spongios al scoarței [29, 109]. Plantele infectate prezintă o scădere generală a vigurozității și a randamentului, deși impactul lor variază în funcție de factori precum genotipul portaltoiului, soiul altoiului, tulpina virusului, momentul infecției și condițiile de mediu. Complexul RS al viței-de-vie este cauzat de un grup de virusuri filamentoși, limitați de floem, care aparțin familiei Betaflexiviridae, reprezentată prin două genuri principale: genul *Vitivirus,* cărui îi aparțin virusurile *Grapevine A*, *-B* și *-D* (GVA, GVB ,GVD), și genul *Foveavirus,* cu virusul *Grapevine rupestris stem pitting-associated* (GRSPaV).

Virusul GVA a fost asociat cu etiologia canelării tulpinilor Kober 5BB, în timp ce GVB este responsabil pentru boala scoarței de plută [29]. Virusul *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* (GRSPaV) are o legătură semnificativă cu boala RSP. GRSPaV este asociat și cu necroza nervurilor (Vein necrosis – VN). Studiile recente au demonstrat o corelație semnificativă între prezența GRSPaV și apariția simptomelor de VN la vița-de-vie [87]. Virusurile GVA și GRSPaV sunt cele mai răspândite asociate cu RS și pot fi transmise prin înmulțire vegetativă și altoire, precum și prin transmiterea vectorială [93, 172]. Boala RSP nu are niciun vector cunoscut, dar poate fi detectat în polen și semințe de la viță-de-vie infectată, precum și în vițele tinere [99].

Transmiterea GVA are loc adesea simultan cu GLRaV-1 și GLRaV-3 [56, 172]. Efectele sinergice dintre vitivirusuri și alte virusuri ale viței-de-vie pot amplifica severitatea simptomelor, influențând negativ productivitatea plantațiilor [131]. Combinația de virusuri *Grapevine leafroll-associated virus 1* (GLRaV-1), *Grapevine virus A* (GVA), *Rupestris stem pitting-associated virus* (RSPaV), mosaicul nervurilor și necroza nervurilor a fost evaluată într-un studiu, rezultatele căruia au demonstrat că această combinație de virusuri a provocat scăderea vigorii cu 19 până la 23% și reducerea randamentului cu 42 până la 54% pe parcursul a șase ani consecutivi [87].

Tabelul 1.2 Virusurile asociate complexului de boli rugozitatea scoarței viței-de-vie [102]

Familia	Genul	Specia	Vectorii	Mod de transmitere	Caracteristici
Betaflexiviridae	*Vitivirus*	GVA	Păduchi lânoși, insecte din familia *Coccoidea*	Înmulțire vegetativă, altoire, transmitere vectorială	– virusuri cu particule filamentoase. – conțin molecule de ARN monocatenar cu sens pozitiv. – restricționați de floem.
		GVB	Păduchi lânoși din familia *Coccoidea*		
		GVD	Nici-un vector cunoscut	Înmulțire vegetativă, altoire	
	Foveavirus	GRSPaV	Nici-un vector cunoscut	Înmulțire vegetativă, altoire, polen și semințe	

Analizând datele din tabelul 1.2 , se observă că virusurile din familia *Betaflexiviridae* au particule filamentoase și sunt localizate exclusiv în floem. Această caracteristică structurală determină apariția bolilor specifice, care afectează transportul de nutrienți și apă în planta. Din punct de vedere taxonomic, aceste virusuri se împart în două genuri principale: *Vitivirus* și *Foveavirus*. Genul *Vitivirus* cuprinde trei specii relevante pentru viticultură: GVA, GVB și GVD. Primele două virusuri, GVA și GVB, sunt transmise prin păduchii lânoși din familia *Coccoidea*. Mobilitatea extrem de redusă a acestor vectori limitează capacitatea lor de răspândire pe distanțe mari. Pentru virusul GVD nu au fost identificați vectori cunoscuți, ceea ce sugerează că transmiterea se realizează în principal prin utilizarea butașilor infectați. Astfel, cea mai importantă sursă de transmitere rămâne activitatea umană, în special prin altoire.

1.1.4 Complexul fleck și nocivitatea acestuia

Complexul fleck este format din mai multe boli: Fleck (GFkV), *Grapevine asteroid mosaic* (GAMaV), *grapevine rupestris necrosis* și *grapevine rupestris vein feathering* (GRVFV), și virusul *Grapevine redglobe virus* (GRGV). Simptomele caracteristice acestei boli au fost

considerate mulți ani ca făcând parte din sindromul scurt-nodării viței-de-vie, ulterior a fost demonstrat că ele aparțin unei boli de sine stătătoare. Boala este latentă în toate soiurile de *Vitis vinifera* precum și în toate speciile americane, cu excepția formei *Vitis rupestris* (grupa americană centrală). Simptomele constau în decolorări clorotice, translucide a unor porțiuni a nervurilor, s-au a unor porțiuni pe frunze. Frunzele sunt asimetrice și se pot ondula spre fața superioară. Forma de manifestare și intensitatea simptomelor sunt mult influențate de faza de creștere și de condițiile climatice. De regulă, boala apare în câmp în ultima decadă a lunii mai, simptomele fiind evidente în iunie după care urmează o mascare mai mult sau mai puțin accentuată. Deși o estimare exactă a impactului este dificil de apreciat din cauza complexității factorilor care influențează răspunsul viței-de-vie (infecții mixte, tulpină virală, mediu, soi și portaltoi de vița-de-vie, managementul podgoriei etc.), totuși a fost raportată influența adversă asupra vigorii plantelor, capacitatea de înrădăcinare a portaltoilor [21].

Toate virusurile complexului Fleck: GFkV, GRGV, GAMaV și GRVFV sunt localizate în țesuturile de floem, iar transmiterea lor are loc prin înmulțire vegetativă și altoire (tabelul 1.3). Toate au particule izometrice cu diametrul de aproximativ 30 nm, ceea ce le face rezistente la tratamentele termice. Virusul GFkV nu se transmite seminței, se poate muta cu ușurință între altoi și portaltoi prin floem și poate afecta negativ randamentul și calitatea strugurilor, de obicei în combinație cu alți virusuri [33]. Rezultatele unui studiu au arătat, că infecția cu GFkV a indus o reducere semnificativă a conductanței stomatice (gs) și o concentrație internă de CO_2 mai scăzută, drept rezultat, s-a observat o fotosinteză mai redusă la plantele infectate [21].

Tabelul 1.3 Virusurile asociate maladiei marmorarea viței-de-vie (Fleck) [102]

Familie	Gen	Virusuri asociate	Caracteristici generale	Mod de transmitere
Tymoviridae	*Marafivirus*	GAMaV	– restricționați de floem. – particule izometrice cu diametrul de aproximativ 30 nm. – genom ARN monopartit monocatenar.	– nu se cunoaște niciun vector de transmitere a virusurilor complexului fleck. – transmiterea se realizează prin material vegetal infectat. – transmiterea nu este posibilă pe cale mecanică – GFkV nu se transmite seminței.
		GRGV		
	Maculavirus	GFkV		
		GRVFV		

Analizând datele prezentate în tabelul 1.3, se observă că cel mai cunoscut și important virus din complexul fleck, cu importanță majoră în viticultură, este GFkV, care aparține genului *Maculavirus*. La momentul actual, nu este cunoscut niciun vector ce poate transmite virusurile complexului fleck, diseminarea în natură este asigurată prin multiplicarea, comercializarea și

plantarea materialului infectat. Pentru a preveni răspândirea virusurilor din complexul fleck în plantațiile comerciale de viță-de-vie, este esențială aplicarea unor metode eficiente de asanare a candidaților în clone infectate, iar utilizarea materialului săditor sănătos reprezintă o măsură fundamentală pentru menținerea sănătății plantațiilor și asigurarea producției viticole de calitate.

1.1.5 Bolile fitoplasmatice ale viței-de-vie și nocivitatea acestora

Infecțiile fitoplasmice la vița-de-vie reprezintă un set de afecțiuni sistemice cauzate de un grup specific de microorganisme, cunoscute în Europa sub denumirea colectivă de „îngălbeniri ale viței-de-vie" (*Grapevine Yellows diseases*). Fitoplasmele, caracterizate prin absența peretelui celular și prezența unei membrane subțiri și flexibile cu un diametru mediu de 500 nm, se multiplică în floemul plantelor afectate și în organele interne ale insectelor vectori, facilitând astfel transmiterea bolii între plante și pe distanțe extinse.

Manifestările patologice observate la plantele infectate cu fitoplasmoze sunt direct legate de disfuncționalitățile în țesutul de transport floem, cu alterări preliminare la nivelul structurilor celulare. Frunzele prezintă decolorații și se îngroașă, iar lăstarii afectați nu reușesc să lignifice, iar în lipsa maturizării corespunzătoare planta devine vulnerabilă la temperaturile scăzute.

Toate soiurile de *Vitis vinifera* sunt susceptibile la infecțiile fitoplasmatice, însă gradul de manifestare al bolii variază în funcție de soi și de condițiile de mediu. Există soiuri mai mult sau mai puțin sensibile, care prezintă simptomele bolii cu diferite grade de intensitate. Intensitatea manifestării bolii depinde de rezistența plantelor. Simptomele de boală se manifestă la un interval de 2-3 ani de la producerea infecțiilor cu fitoplasma. Anual, boala evoluează treptat, determinând slăbire fiziologică și degenerare progresivă a plantelor afectate.

Îngălbenirea aurie a viței-de-vie (*Flavescence dorée*, FD, în franceză) este cauzată de un agent fitoplasmatic care aparține speciei *Candidatus Phytoplasma vitis (Ca. Phytoplasma vitis*) (tabelul 1.4). Boala *Flavescence dorée* a fost identificată pentru prima dată în 1957 în regiunea sud-vestică a Franței, fiind considerată prima boală din categoria îngălbenirilor viței-de-vie. Informațiile despre situația răspândirii FD a viței-de-vie la nivel mondial au fost actualizate, boala fiind identificată în Romania, Cehia, Slovacia, Rusia [51] demonstrând o tendință de răspândire continuă. În Republica Moldova fitoplasma FD nu a fost depistată, doar vectorul acesteia, fapt ce indică un risc potențial pentru introducerea bolii în plantațiile viticole [71].

Înnegrirea lemnului, alături de îngălbenirea aurie, se numără printre cele mai răspândite și dăunătoare boli fitoplasmatice ale viței-de-vie. A fost descoperită în 1961 de către Caudwell în podgoriile din Franța și a fost denumită *Bois Noir* (BN). Cauza bolii BN a fost elucidată și a fost asociată cu fitoplasma *Candidatus Phytoplasma solani* (*Ca. P. solani*). Principalul vector natural,

care răspândește boala la vița-de-vie este cicada polifagă *Hyalesthes obsoletus (Signoret, 1865)*. Boala BN a fost identificată în 30 de țări ale lumii. Spre deosebire de FD, fitoplasmoza BN este răspândita în plantațiile viticole din toată Europa. În România a fost depistată în anul 2013 [30], în plantațiile viticole din Republica Moldova a fost detectată în toate zonele de cultivare a viței-de-vie [71]. Răspândirea bolii este efectuată atât prin intermediul cicadelor, cât și prin intermediul omului care folosește material viticol infectat la altoiri sau la înființarea de noi plantații viticole.

Tabelul 1.4 Fitoplasmele asociate bolilor fitoplasmatice ale viței-de-vie [102]

Familia	Numele fitoplasmei	Îngălbeniri ale viței-de-vie	Răspândire geografică	Vectorii	Modul de transmitere
Phytoplasma Elm Yells	*Ca. Phytoplasma vitis*	*Flavescence doree* (FD)	Elveția, Austria, Slovenia, Serbia, Portugalia, Ungaria și Bosnia Herțegovina ș.a	*Scaphoideus titanus*	– transmiterea prin vectori și material viticol infectat.
	Ca. Phytoplasma solani	*Bois noir* (BN)	Europa, Israel, Liban	*Hyalesthes obsoletus*	– restricționați de floem.

Analizând datele din tabelul 1.4, se poate observa că bolile fitoplasmatice ale viței-de-vie sunt asociate cu fitoplasme care aparțin unor grupuri diferite din punct de vedere taxonomic. Acestea se transmit în principal prin vectori biologici (cicade) și prin utilizarea materialului săditor infectat. Îngălbenirea aurie și înnegrirea lemnului sunt cele mai importante boli fitoplasmatice pentru viticultură, cu toate acestea, în Republica Moldova, doar boala *Bois Noir* este prezentă, îngălbenirea aurie nu a fost raportată până în prezent. Pentru a preveni răspândirea acestor boli, este necesară aplicarea unor măsuri stricte de monitorizare a materialului de înmulțire și săditor viticol, precum și de control al vectorilor în zonele viticole afectate.

1.1.6 Cancerul bacterian al viței-de-vie și nocivitatea acestuia

Bacteriile fitopatogene reprezintă un pericol permanent pentru sănătatea plantelor, producând boli care duc la diminuări importante ale producției. Dintre acestea, cancerul bacterian al viței-de-vie este una dintre cele mai importante și distructive boli cu impact economic major în viticultură, la nivel mondial [83]. Cancerul bacterian al viței-de-vie este provocat de bacterii din genurile *Allorhizobium* și *Agrobacterium*, care posedă plasmide de virulență de tip Ti (tumor-inducing) și determină formarea tumorilor la baza tulpinilor și a rădăcinilor [115].

Simptomele cancerului bacterian sunt identificate ca supracreșteri ce apar sub forma

formării "galelor" (tumori) pe părțile aeriene ale plantei , în timp ce atât tulpinile tumorigenice, cât și cele netumorigenice de *A. vitis* provoacă necroza rădăcinilor [92]. Dat fiind că *A. vitis* poate persista în vița-de-vie fără a manifesta simptome vizibile, există posibilitatea ca acesta să fie transmisă cu ușurință în diverse regiuni, inclusiv în țări situate la distanțe mari, prin intermediul comerțului internațional cu material de înmulțire sau butași.

În cazul înmulțirii vegetative a viței-de-vie, natura sistemică a infecției plantelor cu cancer bacterian a fost demonstrată de mai mulți cercetători [171, 184]. Vița-de-vie este afectată de această boală aproape în toate țările cultivatoare, îndeosebi, în zona temperată, unde condițiile climatice favorizează evoluția bolii [24, 82]. Galele apar pe tulpinile și ramurile plantei, atât la cele mature, cât și la cele tinere, inclusiv la materialul săditor din școlile de vița-de-vie la cel de doar un an. Plantele care suferă de infecție se dezvoltă de obicei mai slab, ceea ce poate duce la diminuarea creșterii și a randamentului acestora. De asemenea, influențează negativ vindecarea normală și formarea de fascicule vasculare organizate după altoire, provocă niveluri mai scăzute de germinare a mugurilor, de creștere a acidității boabelor și deteriorarea maturizării lăstarilor. Aceste probleme pot cauza regresul și chiar pierderea completă a butucului [81, 92].

Comparativ cu plantele fără simptome, exemplarele care au prezentat formațiuni tumorale au manifestat un risc de 14,8 ori mai mare de compromitere a dezvoltării normale și de 18,0 ori mai mare de mortalitate [81]. Găsită atât în stare endofitică, cât și epifitică la vița-de-vie, *A. vitis* este dispersată aleatoriu în cordon, inclusiv în țesuturile nodale și internodale [79]. Zonele de risc pentru transmiterea agentului patogen și formarea tumorilor sunt reprezentate de traumatisme ale țesuturilor — cum ar fi deteriorările mecanice (butășirea coardelor, producerea butașilor altoiți, formarea în cordon la vițele tinere, tăieturile de formare și întreținere, îndepărtarea rădăcinilor superficiale, butășirea în verde), prin înmuierea butașilor în apă, precum și leziunile cauzate de îngheț. Modul în care *A. vitis* infectează plantele începe la nivelul rănilor plantelor, unde are loc transferul, inserarea și activarea unei porțiuni din plasmida care induce formarea tumorilor, numită ADN de transfer (ADN-T), direct în cromozomul plantei [79]. Plasmida inductoare de tumoră (*pTi*) determină virulența acestui agent patogen prin codificarea genelor pentru transferul și integrarea ADN-T în genomul plantei [82, 115]. Oncogenele de pe ADN-T sunt exprimate, ducând la biosinteza excesivă a auxinelor și citochininelor și, în consecință, la proliferarea necontrolată a celulelor vegetale pentru a forma bile ca nișă ecologică extinsă pentru agentul patogen [94]. În plus ADN-T conține, de asemenea, gene pentru biosinteza opinelor, care servesc ca sursă specifică de nutrienți pentru *A. vitis* în competiția cu alți microbi [36]. Tulpinile care conţin *pTi* au un răspuns mult mai puternic datorită recunoașterii compușilor fenolici prezenți în rană, cum ar fi acetosiringona, care este puternic atractivă față de aceștia chiar în concentrații scăzute (10^{-7} M).

Acetosiringona joacă un rol important în procesul de infecție deoarece la concentrații mai mari (10^{-5} – 10^{-4} M), sunt activate genele de virulență (*Vir*) situate pe *pTi*.

Cancerul bacterian e mai des întâlnit în părțile mai joase ale podgoriilor, acolo unde apa se adună ușor și unde frigul se lasă în buzunare de aer rece, ca niște capcane de îngheț. La fel, dacă solul e prea umed, vița-de-vie are probleme să se adapteze bine spre sfârșitul sezonului, ceea ce o face mai vulnerabilă la daunele provocate de înghețurile neașteptate [92, 116]. Elementele care cresc riscul ca vița-de-vie să fie mai sensibilă la îngheț și la leziuni este folosirea prea multor îngrășăminte, ceea ce poate duce la o creștere vegetativă târzie în sezon.

Nu există tratamente chimice eficiente împotriva cancerului bacterian [116]. Chiar dacă compușii antibacterieni, precum cei pe bază de cupru, sunt letali pentru bacteria *A. vitis*, aplicarea acestor tratamente direct pe vițele-de-vie nu reușește să elimine bacteriile care supraviețuiesc în sistemul plantei. Tratarea cu apă caldă (termoterapia) reprezintă o metodă eficientă, ecologică și practică pentru eliminarea bacteriei *A. vitis*.

1.2 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 Verderevschii D.D. [176, 177]. 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 [189].

Mozaicul galben al viței-de-vie sau cloroza infecțioasă (*Grapevine yellow mosaic virus*, GYMV) pentru prima data a fost descrisă de Verderevschii D.D și Lukina [178]. Studiile privind transmiterea agenților patogeni la indicatorii ierboși au evidențiat simptome similare cu cele ale virusului scurt-nodării, sugerând o patogenitate comună. Savantul Marinescu V.G. a stabilit că virusul GYMV devine inactiv la temperaturi de 54-56 °C, având o persistență în suc de 15-20 de zile. Analiza cu microscopul electronic a relevat particule izometrice de aproximativ 28 nm, similar cu virusul scurt-nodării. Pentru a evalua impactul virusurilor scurt-nodării și mozaicului galben asupra viței-de-vie, Bondarciuc V. a efectuat măsurători ale creșterii anuale. Rezultatele au indicat că vițele sănătoase aveau o creștere anuală de 26 m, în timp ce vițele infectate cu GYMV creșteau doar 5,8 m. Plantele de viță-de-vie infectate cu virusul scurt-nodării prezentau o creștere medie de 23,3 m, iar lăstarii erau subțiri, nefiind potriviți pentru altoire. Aceste date demonstrează impactul semnificativ al infecțiilor virale asupra vigorii și capacității de regenerare a viței-de-vie.

Conturarea nervurilor (*Grapevine vein banding,* GVB) a fost descrisa în Republica Moldova la începutul anilor 1980 și studiată pe soiul Matrasa. Agenții patogeni ai bolii au fost transmiși la indicatori ierboși din genul *Chenopodium*, la care au provocat simptome caracteristice virusului scurt-nodării. În anii 1970, studiile privind bolile virale ale viței-de-vie au dus la identificarea soiurilor de struguri indicator, dezvoltând metode de transmitere a virusurilor prin altoire (indexare prin altoire) [179,188]. În total, în Republica Moldova au fost identificate și studiate un număr de 11 boli de etiologie virotică ale viței-de-vie, printre care se numără: scurt-nodarea, mozaicul galben, marmorarea, răsucirea frunzelor, mozaicul nervurian, necroza nervurilor, strierea lemnului, virusul mozaicului tutunului, boala enațiilor, conturarea nervurilor, precum și cloroza punctiformă galbenă, specifică soiului Rkațiteli.

Pentru combaterea bolilor de etiologie virotică și bacteriană, a fost aplicată metoda termoterapiei cu apă fierbinte, utilizată de Țurcan I.G. și Bondarchuc V.V. [194]. 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).

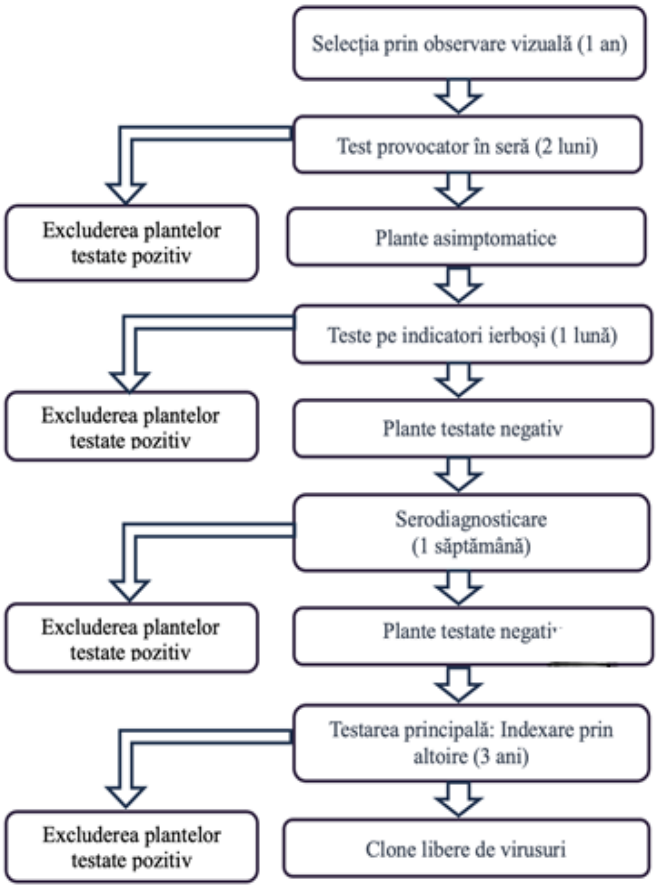

Fig. 1.1 Schema de producere a clonelor de viță-de-vie libere de boli virotice în Republica Moldova, implementată în 1980 [175]

Metoda utilizată la acea vreme era una complexă și consumatoare de timp, și includea mai mulți pași pentru eradicarea plantelor bolnave și extragerea materialului sănătos, așa cum este ilustrat în figura 1.1. Prima etapă a tehnologiei, desfășurată pe parcursul unui an vegetativ, consta în selecția prin observare vizuală a butucilor care prezentau simptome evidente de infecție virală. Plantele care nu manifestau semne vizibile de boală erau selectate pentru a fi incluse în etapa următoare a procesului – test provocator în condiții controlate de seră, cu durata de două luni. Această etapă avea scopul excluderea plantelor infectate cu mozaicul nervurian, deoarece condițiile specifice din seră favorizau exprimarea simptomelor care nu erau evidente în condiții naturale. Plantele care manifestau simptome în timpul acestui test erau eliminate din procesul de selecție, iar cele care rămâneau asimptomatice treceau la etapa următoare.

Etapa a treia consta în testele pe indicatori ierboși, desfășurate pe o perioadă de aproximativ o lună. Această metodă presupunea transmiterea virusurilor care se pot transmite prin suc, precum virusul scurt-nodării (GFLV) sau virusul mozaicului galben (GYMV), la plante indicator *Chenopodium quinua*, pentru evaluarea prezenței agenților patogeni. Reacțiile care se manifestau pe plantele indicator permiteau detectarea indirectă a infecțiilor latente care nu s-au manifestat în etapele anterioare. Plantele tastate negativ erau transferate la etapa de testare serologică, realizată într-un interval de aproximativ o săptămână.

Pentru a identifica virusurile care nu prezentaseră simptome, ultimul pas implica indexarea prin altoire (trei ani) pe vițe indicatoare sensibile *Vitis rupestris du Lot, LN 33, Riparia Gloire de Montpellier* și *110 Richter*, proces cu o durată de trei ani.

Tehnologia dată permitea obținerea plantelor inițiale, clone devirozate, într-o perioadă de 4-5 ani și, deși eficientă în contextul perioadei respective, prezenta o serie de dezavantaje. Complexitatea metodei, durata îndelungată a procesului și lipsa unor tehnici precise de identificare a agenților patogeni reprezentau factori limitativi importanți, care favorizau riscul ca anumite infecții latente să nu fie detectate. Această situație putea afecta negativ eficiența procesului de selecție și compromite calitatea materialului săditor obținut. Ulterior, pentru multiplicarea plantelor inițiale prin înmulțire vegetativă, cu scopul de a produce cantitatea necesară de material săditor pentru înființarea plantației-mamă, era necesară o perioadă suplimentară de 4–5 ani. Astfel, durata totală a implementării acestei tehnologii era de 9–10 ani.

În anul 1985 a fost elaborată „Instrucțiunea pentru crearea unei elite în viticultura” de către Guzun N., Nedov P. și alții, folosind metodele de selecție clonală și fitosanitară. Ulterior, Sultanova O. și Lemanova N., au realizat o gamă de cercetări multilaterale referitoare la studiul cancerului bacterian al viței-de-vie; au fost studiate particularitățile fiziologo-biochimice ale bacteriei *A. vitis* și distribuția ei pe teritoriul țării [192]. De asemenea, Lemanova N. a fost

implicată în dezvoltarea metodelor biologice pentru combaterea cancerului bacterian, folosind tulpini antagoniste. În acest proces, au fost create preparatele Paurin și Tumarin [185].

1.3 Diagnosticarea bolilor virale ale viței-de-vie

Utilizarea metodelor fiabile pentru detectarea virusurilor și a cancerului bacterian la vița-de-vie reprezintă un pas important către obținerea plantelor sănătoase. Metodele de detecție sunt aplicate asupra materialului vegetal inițial selectat pentru a verifica, dacă îndeplinește cerințele sanitare și, de asemenea, în timpul procedurilor de eliminare a virusului pentru a evalua starea de sănătate a materialului tratat. Sunt cunoscute patru grupuri principale de metode de diagnostic și anume: observarea vizuală, indexarea biologică, serologia și analizele moleculare.

Observări vizuale. Diagnosticarea vizuală a fost prima și, pentru mult timp, cea mai utilizată metodă de identificare a bolilor viței-de-vie. Această abordare se bazează exclusiv pe cunoștințele și experiența cercetătorului, ceea ce implică un grad ridicat de subiectivitate și, în mod inevitabil, un risc crescut de identificare inexactă a agentului patogen. Simptomele vizibile la nivelul frunzelor – modificări de culoare, deformări sau necroze – pot fi cauzate nu doar de infecții virale sau fitoplasmice, ci și de o serie de alți factori, cum ar fi carențele de nutrienți, tulburările fiziologice, stresul abiotic, atacurile de dăunători sau efectele fitotoxice ale pesticidelor. De exemplu, înroșirea lobilor frunzelor poate fi un semnal al unei infecții cu virusuri (de exemplu, GLRaV-1, GLRaV-2 sau GLRaV-3) ori cu fitoplasme, dar la fel poate indica un dezechilibru nutritiv sau un atac de insecte. Mai mult, același virus poate determina simptome diferite în funcție de soiul infectat: virusul GLRaV-3 provoacă îngălbenirea frunzelor la soiurile albe și înroșirea acestora la soiurile roșii. Severitatea simptomelor depinde, de asemenea, de o serie de factori precum: condițiile climatice, concentrația virală în plantă, virulența tulpinii, stadiul de dezvoltare al plantei în momentul infecției, durata bolii sau combinația dintre soi și portaltoi. Cu toate acestea, diagnosticarea vizuală rămâne primul pas de evaluare primară ale plantelor de viță-de-vie în procesul de selecție fitosanitară.

Indexarea biologică. În cadrul indexării biologice, se utilizează biomaterial extras din plantele de viță-de-vie testate pentru evaluarea plantelor indicator, în care simptomele infecției sunt evidente, clar vizibile și specifice. Pentru identificarea infecțiilor virale specifice viței-de-vie, se utilizează două categorii principale de metode biologice: inocularea plantelor erbacee indicatoare cu suc extras din plantele suspecte și altoirea mugurilor prelevați de la plantele infectate pe soiuri indicatoare de viță-de-vie [155]. Virusurile transmise mecanic, precum cei mai mulți reprezentanți ai genului *Nepovirus*, dar și anumiți membri ai genurilor *Vitivirus* și *Closterovirus*, pot fi detectați prin inocularea mecanică a sucului brut provenit din țesuturile

infectate pe plante erbacee sensibile. Printre speciile cel mai frecvent utilizate în acest scop se numără *Chenopodium quinoa*, *Ch. amaranticolor, Cucumis sativus*, *Nicotiana occidentalis*, *N. tabacum* și *N. benthamiana*. Acest tip de testare este de scurtă durată, simptomele caracteristice pot apărea în interval de 7–10 zile de la inoculare [155].

Imunodiagnostic. Tehnicile serologice se bazează pe capacitatea anticorpilor de a recunoaște în mod specific virusurile din plantele analizate. Dintre acestea, testul imunoenzimatic (ELISA) se evidențiază ca una dintre cele mai utilizate și eficiente metode pentru diagnosticarea materialului vegetal. Testele ELISA, atât în varianta directă (sandwich cu dublu anticorp – DAS), cât și în cea indirectă (sandwich cu triplu anticorp – TAS), au fost dezvoltate și aplicate pe scară largă pentru identificarea unui spectru extins de virusuri care afectează vița-de-vie. Pentru realizarea testului, pot fi folosite diverse părți ale plantei, precum frunze, muguri, tulpini, rădăcini sau probe de țesuturi corticale, ca surse de antigene. Este important de menționat că virusurile nu sunt distribuite uniform în planta infectată, iar titrul viral poate varia semnificativ în funcție de anotimp [156]. Conform standardelor EPPO (2008), metoda ELISA este recomandată pentru detectarea virusului scurt-nodării viței-de-vie (GFLV) și a altor nepovirusuri europene, precum și pentru membrii familiei Closteroviridae (GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3), vitivirusurile GVA și GVB, precum și pentru virusul Fleck al viței-de-vie (GFkV).

Metode de diagnostic bazate pe amplificarea acizilor nucleici. În contextul progresului tehnologic accelerat, metodele tradiționale de diagnostic biologic sunt treptat completate, iar în unele cazuri chiar înlocuite, de tehnici moderne, mai rapide și mai precise, care permit detectarea directă a secvențelor de acizi nucleici sau a proteinelor virale specifice. Printre aceste metode se numără reacția în lanț a polimerazei (PCR), care utilizează enzima Taq polimerază pentru amplificarea secvențelor specifice de ADN viral. În practica actuală, sunt aplicate diverse variante ale tehnicii PCR, fiecare adaptată pentru scopuri specifice și niveluri diferite de precizie: PCR cu transcripție inversă (RT-PCR) pentru detectarea ARN-ului viral, PCR cantitativă în timp real (qRT-PCR) pentru determinarea încărcăturii virale și evaluarea dinamicii infecției, PCR multiplex pentru detectarea simultană a mai multor agenți patogeni într-o singură reacție, precum și PCR în timp real (real-time PCR), utilizată pentru confirmarea rapidă a infecțiilor virale la vița-de-vie.

Din analiza metodelor de diagnosticare a bolilor virale la vița-de-vie reiese că metodele tradiționale, precum observarea vizuală, pot fi utile la etapa de evaluare inițială. Indexarea biologică presupune un timp îndelungat, dar rămâne necesară în cazul virusurilor noi, pentru care nu sunt disponibile teste specifice. O direcție actuală de cercetare o constituie integrarea metodelor PCR în fluxul tehnologic de multiplicare *in vitro*, care permite asigurarea controlului fitosanitar pe toate etapele procesului, de la selecția inițială a plantelor până la verificarea plantelor asanate.

1.4 Diagnosticarea cancerului bacterian în plantele de viță-de-vie

Rizobiile reprezintă bacterii din grupul proteobacteriilor, capabile să intre în simbioză de fixare a azotului cu plantele leguminoase. Până în anul 1982, toate speciile de rizobii erau incluse într-un singur gen – *Rhizobium*, datorită acestei proprietăți caracteristice. Ulterior, pe baza analizelor fenotipice și genotipice, au fost delimitate 16 genuri, printre care *Agrobacterium*, *Allorhizobium* și *Rhizobium*, care fac parte din familia *Rhizobiaceae* (tabelul 1.5). Datorită gradului înalt de schimb genetic și variabilității dintre speciile de *Agrobacterium spp*, nomenclatura grupului continuă să fie un punct de controversă. Din punct de vedere istoric, membrii complexului *Agrobacterium spp*. au fost clasificați la nivel de specie în funcție de proprietățile fitopatogenice determinate de plasmida inductoare de tumori *pTi* — astfel, *A. tumefaciens* a fost asociată cu formarea tumorilor, *A. rhizogenes* cu apariția rădăcinilor păroase, *A. vitis* cu infecțiile specifice viței-de-vie, iar *A. radiobacter* cu tulpinile nepatogene.

Actualmente, analizele genetice și genomice au ajutat la identificarea mai precisă a relației filogenetice dintre diferitele specii, astfel *Agrobacterium vitis* a fost grupat cu genul *Allorhizobium*, diferențiat de genul *Agrobacterium*, și reclasificat ca specia *Allorhizobium vitis (All. vitis)*, iar tulpinile de tip *A. radiobacter* și *A. tumefaciens* s-au dovedit a aparține aceleiași genospecii [115, 114]. Comparațiile genomului în perechi și analiza filogenomică a diferitor tulpini de *Allorhizobium vitis* au indicat că *Agrobacterium vitis* nu este o singură specie, dar reprezintă un complex de specii compus din mai multe specii genomice [91].

Tabelul 1.5 Caracteristicile bacteriilor din familia *Rhizobiaceae* [31]

Familia	Genul	Specia	Plasmida virulenta	Simptome	Biovar
Rhizobiaceae	*Allorhizobium*	*All. vitis* sin *A. vitis*	*-Ti*	Tumori la vița-de-vie	III
	Agrobacterium	*A. tumefaciens* sin *A. radiobacter,*	*-Ti*	Tumori, inclusiv la vița-de-vie.	I
	Rhizobium	*R. rhizogenes*	*-Ri*	Rădăcini păroase	II

La tulpinile de *A. vitis și A. tumefaciens*, au fost caracterizate patru tipuri de AND-T care diferă între ele prin compoziția de gene implicate în sinteza de opine în spațiile intercelulare ale țesuturilor vegetale infectate: nopalina, vitopina, octopina și cucumopina [148]. Opinele sintetizate sunt utilizate în principal ca surse de carbon și azot pentru bacterii.

Metodele tradiționale de detectare a infecțiilor cu agrobacterii includ cultivarea probelor de țesut pe medii selective sau semiselective și identificarea bacteriilor până la nivel de gen. Printre

mediile utilizate se enumeră: Lieske (1928), Mediul Clark (1969), Kado (1970), Sule (1978), MG (Manitol-Glucoză) suplimentat cu telurit (K2TeO3), mediul Roy & Sassrer (1983) și altele. Natura patogenă a culturii obținute, adică prezența sau absenta plasmidei Ti se confirmă printr-un biotest pe plantele indicator: discuri de morcovi (*Daucus carota*), plante tinere de tomate (*Lycopersicon esculentum*), de kalanchoe (*Bryophyllum daigremontianum*) cu durata de 3–5 săptămâni [123]. Aceste metode sunt lente și puțin specifice, și necesită mult timp pentru cultivare și identificare. De asemenea, confirmarea naturii patogene a organismului selectat prin biotestele pe plante poate fi complicată și supusă erorilor de interpretare. Analiza serologică folosind anticorpi monoclonali a permis, de asemenea, diferențierea tulpinilor de *Agrobacterium*, la fel pînă la nivel de gen [18]. În Republica Moldova, izolarea și identificarea tulpinilor de *A. vitis* se realizează utilizând mediul semiselectiv Roy & Sassrer care permite determinarea la nivel de gen, dar nu oferă informații despre patogenitatea culturilor izolate [45]. În unele cazuri, rezultatele obținute pe medii semiselective pot fi influențate de prezența bacteriilor saprofite cu morfologie asemănătoare, fapt care impune confirmarea identității izolaților prin metode suplimentare. Limitările acestor tehnici clasice au determinat necesitatea implementării metodelor moleculare, capabile să asigure o caracterizare precisă a tulpinilor și evaluarea potențialului lor patogen.

Savanții Dong L. și colab. pentru prima oara au explorat utilizarea reacției în lanț a polimerazei (PCR) pentru a detecta tulpinile patogene de *Agrobacterium*. Metodele bazate pe acizii nucleici se disting printr-un grad înalt de sensibilitate și specificitate, depășind performanțele tehnicilor microbiologice tradiționale utilizate pentru identificarea agenților patogeni [79, 128]. Pentru a combate problema inhibării reacției PCR de către compușii activi prezenți în ADN-ul izolat direct din probe de viță-de-vie, a fost dezvoltat un protocol special. Acesta implică selecția bacteriei pe mediu selectiv urmată de multiplicarea coloniilor la temperatura de 27 °C. Abia după aceste etape, proba obținută este utilizată în analiza PCR [48]. Mai târziu, au apărut o serie de lucrări, orientate spre identificarea precisă a speciilor *A. tumefaciens* și *A. vitis* și a tulpinilor specifice agrobacteriilor [83], și dezvoltați markeri ADN care permit avidențierea diferențelor dintre agrobacterii în ceea ce privește tipul de plasmide Ti [148].

Pe baza datelor literaturii de specialitate studiate, rezultă că cancerul bacterian al viței-de-vie poate fi cauzat de două specii de agrobacterii: *Agrobacterium vitis și Agrobacterium tumefaciens.* Metodele microbiologice tradiționale utilizate pentru detectarea acestor bacterii permit identificarea doar până la nivel de gen, fără a oferi informații despre patogenitatea acestora. Metoda PCR reprezintă o abordare modernă și eficientă, care permite detectarea precisă a tulpinilor patogene prin evidențierea prezenței plasmidei Ti. Având în vedere aceste aspecte, implementarea metodei PCR pentru diagnosticul fitosanitar, este esențială pentru asigurarea unei

identificări fiabile a agenților patogeni, contribuind astfel la prevenirea răspândirii cancerului bacterian în plantațiile viticole din Republica Moldova.

1.5 Metode de asanare a materialului de înmulțire viticol

Asanarea plantelor de viță-de-vie de agenți infecțioși ce provoacă boli cronice, este un pas important în selecția fitosanitară, pentru a asigura producția de material viticol sănătos. Prezența virusurilor, fitoplasmelor și cancerului bacterian în materialul săditor viticol poate duce la scăderea recoltelor, a produselor de calitate mai scăzută și la pierderea culturilor întregi [10]. Prin urmare, este esențial să se elimine particulele dăunătoare din plantele selectate înainte de a le include în procesul de multiplicare. De multe ori plantele selectate, sănătoase din punct de vedere vizual, sunt purtătoare de boli cronice în formă latentă, cel mai des de una virală [41]. În astfel de cazuri, este necesar să se aplice un set de măsuri pentru a îmbunătăți starea de sănătate a unei anumite plante sau a unui grup de plante, pe baza proprietăților virusurilor depistate.

Asanarea plantelor se bazează pe următoarele mecanisme: inhibarea replicării agentului patogen și reducerea titrului viral; încălcarea funcțiilor de transport și inhibarea mișcării agentului patogen prin plantă sau organele și țesuturile sale individuale; inducerea rezistentei nespecifice; degradarea particulelor virale, inactivarea enzimelor și inhibarea sintezei acidului nucleic viral, contribuind la eliminarea infecției și restabilirea funcțiilor fiziologice [86, 101].

Cele mai utilizate metode pentru eliminarea virusului în plantele de viță-de-vie sunt: metoda de tratare termică cu aer fierbinte [121], cultura de meristeme [84], embriogeneza somatică [157, 22] și chimeoterapia [88]. La momentul actual niciuna din aceste metode nu poate asigura eliminarea completă a virusurilor și necesită mai multe etape de tratament pentru obținerea unui rezultat stabil și reproductibil [73, 75].

Metoda de tratare termică cu aer fierbinte este cea mai frecvent utilizată metodologie terapeutică în cadrul protocoalelor de asanare. De la sfârșitul anilor 1950, termoterapia *in vivo* face parte dintr-un pachet standard de măsuri care au fost dezvoltate pentru a elimina virusurile. Termoterapia este un tratament în care plantele sunt expuse la temperaturi ridicate pentru o anumită perioadă de timp. În timpul tratamentului termic, plantele sunt expuse gradual la temperaturi moderate până la ridicate, menținute pentru o perioadă determinată, în vederea inactivării agenților patogeni fără afectarea țesuturilor vegetale. În general, cu cât temperatura este mai mare și cu cât durata expunerii este mai lungă, cu atât frecvența eradicării virusului este mai mare. La plantele de vița-de-vie se aplică termoterapia de 37–40 °C timp de 4–6 săptămâni. Alegerea unui regim de termoterapie trebuie să permită supraviețuirea plantei tratate, succesul în acest caz depinde de rezistența la căldură a virusurilor care infectează plantele tratate. Studiile

recente au arătat, că temperaturile ridicate provoacă modificări în exprimarea unor molecule mici de ARN implicate în apărarea antivirală. Astfel, în lăstarii de pere infectați cu *Apple Stem Grooving Virus*, aceste molecule reglează genele implicate în apărarea împotriva bolilor și în transmiterea semnalelor hormonale, ceea ce duce la reducerea titrului viral. Aceste rezultate sugerează că temperaturile ridicate nu doar inhibă virusul în mod direct, ci activează și mecanismele naturale de protecție ale plantei [100].

În Republica Moldova, aplicarea termoterapiei asupra materialului vegetal viticol afectat de boli de etiologie virală a început în anul 1976, conform lucrărilor realizate de cercetătorii locali Țurcan I.G., Litvac A.I., Kuzmenco A.P., Minacova R.I. și Bondarciuc V.V. Aceștia au demonstrat eficiența metodei termoterapiei în asanarea plantelor de viță-de-vie și au adaptat parametrii de tratament la particularitățile materialului biologic cercetat. Savantul Țurcan I.G. a proiectat și construit o cameră termică, cu dimensiunile de 1,5 m înălțime, 5,5 m lungime și 2,6 m lățime, asigurând o umiditate de 60–70%, în care plantele au fost tratate la temperatura de 38°C pe o durată de șase luni. Această metodă a contribuit la perfecționarea procesului de eliminare a infecțiilor virale din materialul viticol infectat și la extinderea bazei de plante sănătoase.

Metoda de tratare termică cu apă fierbinte are drept scop reducerea încărcăturii patogene a materialului viticol, prin inactivarea agenților infecțioși localizați în țesuturi, fără a afecta viabilitatea butașilor și potențialul lor de regenerare. Tratamentul termic aplicat la temperatura de 50–51°C, timp de 30–45 de minute, s-a dovedit eficient în reducerea încărcăturii patogene a materialului viticol, contribuind la diminuarea infecțiilor cauzate de fitoplasma *Ca. Phytoplasma solani* (agentul bolii *Bois noir*), a ouălor cicadelor vectori ai bolii *Flavescence dorée*, a tripșilor, precum și a bacteriilor patogene *Allorhizobium vitis*, *Agrobacterium tumefaciens* și *Xylophilus ampelinus* [15]. Totodată, metoda are un efect benefic și asupra reducerii infecțiilor cauzate de *Xylella fastidiosa*, cât și în reducerea numărului de agenți patogeni ai bolilor de trunchi, cum ar fi *Phaeomoniella chlamydospora*, *Diplodia seriata*, *Neofusicoccum parvum* și *Botryosphaeriaceae sp*., pe plantele altoite [49, 95].

Din rezultatele mai multor studii efectuate de diferiți autori [21, 65, 90, 122, 139, 163] se poate concluziona, că virusurile filamentoase restricționate la floem, precum GLRaV-1,3 și GRSPaV, sunt în general mai sensibile la eliminare prin termoterapie comparativ cu virusurile izometrice, precum GFkV. Există diferențe chiar și între virusurile filamentoase: GLRaV-1 și GLRaV-3 sunt mai ușor de eliminat decât GRSPaV, care este mai rezistent la tratamentele termice. Pe de altă parte, GFLV, deși este izometric, poate fi eliminat complet prin termoterapie în anumite condiții, ceea ce indică o sensibilitate mai mare la temperatură în comparație cu alte virusuri izometrice, precum GFkV. Eficiența eliminării depinde nu doar de forma virusului (filamentoasă

sau izometrică), de genotipul viței-de-vie, dar și de speciile de virus și de interacțiunile specifice virus-viță-de-vie. În același timp, tratamentul cu apă fierbinte utilizat pentru controlul patogenilor endogeni poate influența vitalitatea materialului săditor, în special în cazul combinațiilor de portaltoi și soiuri sensibile. Astfel, aplicarea termoterapiei reprezintă o abordare ecologică și eficientă pentru diminuarea încărcăturii patogene, a cărei eficiență depinde în mod esențial de selectarea regimului termic adecvat, corelat cu specificul biologic al virusului.

1.6 Biotehnologii utilizate pentru obținerea și multiplicarea materialului viticol

Biotehnologiile reprezintă un domeniu complex, care implică utilizarea de sisteme biologice și organisme vii pentru a crea sau modifica produse și procese în scopuri specifice. În contextul viticulturii, aceste tehnici biotehnologice sunt aplicate pentru obținerea și multiplicarea accelerată a clonelor inițiale asanate de viță-de-vie, contribuind astfel la producerea de material săditor de calitate superioară și la menținerea integrității fitosanitare a soiurilor valoroase.

Una dintre cele mai importante metode biotehnologice utilizate în multiplicarea materialului viticol sănătos este cultura *in vitro*, care presupune creșterea și dezvoltarea țesuturilor vegetale pe medii nutritive sterile, în condiții controlate de laborator. Aplicarea acestor tehnologii permite depășirea limitărilor metodelor convenționale de reproducere și oferă soluții eficiente pentru conservarea și multiplicarea genotipurilor valoroase, atât din punct de vedere agronomic, cât și fitosanitar [138]. La vița-de-vie, regenerarea plantelor *in vitro* este realizată în principal prin două căi: organogeneză și embriogeneză somatică, ambele fiind utilizate în cadrul procesului de micropropagare. Micropropagarea reprezintă o tehnică prin care fragmente de plantă (explanturi) sunt cultivate pe medii nutritive specifice, în scopul obținerii rapide a clonelor în cantitățile necesare. Organogeneza presupune formarea organelor vegetative din țesuturi competente, fie direct din meristeme (organogeneză directă), fie indirect, prin formarea prealabilă a unui calus (organogeneză indirectă). Această ultimă variantă poate duce la apariția variațiilor somaclonale, generate de modificări genetice și epigenetice ale plantelor obținute [138]. Embriogeneza somatică implică formarea de embrioni din celule somatice, capabili să se dezvolte în plante complete, iar în cazul viței-de-vie este utilizată mai ales în scopuri experimentale. În practică, organogeneza directă este frecvent preferată pentru multiplicarea clonală, datorită stabilității genetice [169].

O variantă aplicată pe scară largă a micropropagării este microbutașirea, care constă în fragmentarea plantelor, obținute prin cultura *in vitro,* în microbutași – segmente mici de tulpină ce conțin cel puțin un mugure axilar. Aceștia sunt apoi transferați pe medii nutritive potrivite pentru procesele de înrădăcinare și regenerare. Metoda permite multiplicarea eficientă a materialului biologic într-un interval scurt de timp, fiind o etapă-cheie în producerea clonelor asanate.

Metoda culturii *in vitro* pentru vița-de-vie a fost descrisă de Galzy R. (1961) pentru prima dată, care a demonstrat posibilitatea regenerării segmentelor vegetative pe un mediu nutritiv suplimentat cu micro- și macroelemente. Ulterior, în anul 1981, Silvestroni O. a propus îmbogățirea mediului de cultură cu fitohormoni, în special citokinine, pentru stimularea multiplicării plantelor de viță-de-vie, contribuind la inhibarea dominanței apicale și la intensificarea creșterii lăstarilor [138]. În prezent, se cunoaște că eficiența regenerării și multiplicării viței-de-vie pe deoparte depinde de mărimea și tipul explantelor introduse, condițiile de cultivare [169], genotipul viței-de-vie, mediul nutritiv [1] și condițiile camerei culturale, cum ar fi lumina. Etapa finală în această tehnologie, aclimatizarea la condițiile *ex vitro*, joacă un rol esențial, fiind determinantă pentru reușita procesului și pentru cantitatea totală a plantelor obținute.

Regenerarea și multiplicarea. În studiile efectuate în Italia, a fost explorat impactul culturii *in vitro* asupra fenotipului plantelor de viță-de-vie. Rezultatele obținute indică faptul, că deși majoritatea parametrilor analizați nu au prezentat diferențe semnificative, plantele obținute prin micropropagare au avut un randament mai mare comparativ cu plantele crescute din butași lemnoși [66]. În cadrul cercetărilor efectuate de cercetătorii din Coreea, prin aplicarea markerilor moleculari ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) pentru detectarea mutațiilor somatice, rezultatele au validat stabilitatea genetică a plantelor multiplicate prin cultura *in vitro* [83]. Cercetătorii din Spania au investigat efectele diferitelor medii de creștere, impactul sezonului și locul de unde se recoltează explantul [12]. S-a constatat că sezonul influențează direct starea fiziologică a plantei mamă, ceea ce, la rândul său, afectează comportamentul explanturilor în culturile *in vitro*. Studiul a evidențiat că explantele obținute din partea inferioară a lăstarilor erau mai predispuse la infestări, influențând negativ rata lor de adaptare. În cadrul unor studii, au fost testate și comparate mai multe variante de medii nutritive, printre care Murashige și Skoog (MS), Lloyd și McCown și Woody Plant Medium (WPM). Rezultatele au demonstrat că eficiența metodei de multiplicare *in vitro* este puternic influențată de genotipul soiului, iar mediul MS s-a dovedit a fi cel mai adecvat pentru creșterea și regenerarea explanturilor la soiurile de viță-de-vie [117].

Studiile analizate arată, că metoda culturii *in vitro* este eficientă pentru regenerarea și multiplicarea viței-de-vie, oferind un randament mai bun comparativ cu înmulțirea tradițională prin butași. În plus, a fost confirmată stabilitatea genetică a plantelor obținute, ceea ce demonstrează că plantele regenerate sunt identice din punct de vedere genetic cu planta-mamă.

Lumina. Unul dintre principalii factori de mediu care influențează dezvoltarea plantelor, îl reprezintă lumina, având un impact direct asupra ritmului de creștere și asupra formării organelor vegetative. Aceste efecte sunt rezultatul unor procese morfologice și fiziologice complexe, a căror succesiune este determinată în mare măsură de programul genetic al plantei. Intensitatea luminii

și capacitatea plantei de a utiliza eficient energia luminoasă sunt elemente esențiale care determină modul în care se exprimă aceste procese în condiții de cultură [59].

În condiții de laborator, caracteristicile luminii joacă un rol esențial în reglarea proceselor fotosintetice ale plantelor. Printre cei mai importanți parametri se numără: radiația fotosintetic activă (Photosynthetic Active Radiation), densitatea fluxului de fotoni fotosintetici (Photosynthetic Photon Flux Density) și integrala zilnică de lumină (Daily Light Integral). Radiația fotosintetic activă (PAR) reprezintă „lumina utilă" pentru plante, adică porțiunea din spectrul luminii (400–700 nm) pe care plantele o folosesc în mod direct în procesul de fotosinteză. Densitatea fluxului de fotoni fotosintetici (PPFD) indică numărul de fotoni din această zonă activă care ajung efectiv la nivelul suprafeței foliare într-o anumită unitate de timp. În producția de plante, stabilirea densității optime a PPFD pentru fiecare specie este esențială, deoarece influențează în mod direct ritmul de creștere, dezvoltarea aparatului vegetativ și formarea lăstarilor [12, 111]. În cercetările recente, a fost dovedit că pentru plantele cultivate în laborator este esențial să se folosească o sursă de lumină care să semene cât mai mult cu lumina naturală a soarelui care să includă o varietate de culori, de la ultraviolet până la roșu îndepărtat [2].

În prezent, diodele emițătoare de lumină (Light Emitting Diode, LED) sunt adesea preferate în condiții controlate de cultivare a plantelor datorită numeroaselor avantaje în comparație cu lămpile folosite anterior [47]. LED-urile oferă posibilitatea de a controla cu precizie parametrii luminii, precum intensitatea, durata și compoziția spectrală, care pot fi ajustați în funcție de nevoile fiziologice ale plantelor sau de stadiul lor de dezvoltare. Această capacitate de reglare fină permite optimizarea condițiilor de cultivare *in vitro*, având un impact direct asupra eficienței regenerării și creșterii plantelor [69, 165]. O altă caracteristică importantă a LED-urilor este emisia redusă de căldură radiantă, ceea ce previne supraîncălzirea plantelor în timpul cultivării. Proprietatea dată este importantă în condiții *in vitro* unde menținerea unei temperaturi constante și controlate este decisivă pentru dezvoltarea normală a plantelor și pentru evitarea stresului termic. De asemenea, LED-urile emit lumină direcționată, concentrând fluxul de fotoni direct asupra plantelor și reducând pierderile prin dispersie. În plus, acestea au o durată de viață semnificativ mai mare comparativ cu sursele convenționale și asigură un consum energetic mai eficient, ceea ce le face mai avantajoase din punct de vedere economic [9, 47, 101].

Cercetătorii din Turcia au studiat influența luminii LED monocromatice roșii, albastre și a luminii vizibile (400–700 nm) asupra creșterii plantulelor de viță-de-vie în condiții *in vitro*, folosind două niveluri de intensitate: 2500 și 5000 lux. Lumina rosie a produs cea mai mare lungime a mugurelui axilar, în timp ce lumina rosie si vizibilă la 2500 lux a produs cea mai rapidă crestere a mugurelui axilar. Rezultatele evidențiază efectul favorabil al radiației roșii asupra

dezvoltării vegetative timpurii și adaptării fotosintetice [137]. Un alt studiu comparativ a investigat influența luminii monocromatice asupra dezvoltării viței-de-vie, eficienței fotosintetice a frunzelor, distribuției carbonului în plantă și modificărilor la nivelul transcriptomului, utilizând lumina albă ca martor. Rezultatele au arătat că lumina roșie și cea albastră au stimulat creșterea plantelor într-un mod mai eficient decât lumina albă, evidențiind impactul specific al spectrului luminos asupra proceselor fiziologice și moleculare implicate în dezvoltarea viței-de-vie [101]. Concluziile acestor cercetări evidențiază importanța spectrului luminos în reglarea proceselor de creștere și dezvoltare a viței-de-vie în condiții *in vitro*. Lumina roșie și cea albastră s-au dovedit a fi cele mai eficiente în stimularea alungirii mugurilor, a activității fotosintetice și a distribuției carbonului în plantă. Trebuie menționat că studiile privind influența spectrului LED asupra dezvoltării viței-de-vie în cultura *in vitro* sunt încă limitate, ceea ce subliniază necesitatea continuării cercetărilor experimentale și aprofundate în acest domeniu.

Aclimatizarea. Cea mai sensibilă etapă din metoda culturii *in vitro* este adaptarea plantelor la condițiile nesterile de mediu, adică trecerea la creșterea *ex vitro*. În această fază, plantele devin vulnerabile la stresul cauzat de schimbările de umiditate, temperatură și expunerea la agenți patogeni. Potrivit datelor din literatură, rata de pierderi în această etapă poate fi semnificativă, în unele cazuri doar aproximativ 25% dintre plantele regenerate reușind să se adapteze cu succes la condițiile *ex vitro* [190]. Principala cauză a pierderilor semnificative de plante în timpul aclimatizării este legată de slaba dezvoltare structurală a acestora, atât din punct de vedere morfologic, cât și fiziologic. În condițiile de cultură *in vitro*, plantele prezintă adesea o fotosinteză slab activă sau chiar inactivă, fiind dependente de sursele exogene de carbon din mediu. De asemenea, acumularea de etilenă în mediile de cultură poate provoca dezechilibre metabolice și fiziologice, care reduc capacitatea plantelor de a se adapta la noile condiții *ex vitro* [180].

Mulți autori au raportat modificări structurale semnificative la plantele crescute *in vitro*, în special la nivelul țesuturilor frunzelor și rădăcinilor. În frunze, se observă reducerea numărului de straturi celulare în parenchim și prezența unor spații intercelulare mari. Umiditatea ridicată din vasele de cultură, alături de lipsa expunerii la radiații ultraviolete, afectează formarea cuticulei, ceea ce determină o diminuare a stratului ceros cuticular și modificări în structura frunzelor. Absența cuticulei determină o creștere semnificativă a pierderilor de apă prin transpirație, coeficientul de difuzie al apei crescând de până la 500 de ori. În plus, stomatele dezvoltate în condiții *in vitro* sunt adesea nefuncționale și nu răspund adecvat la factorii de mediu, rămânând deschise. La nivelul rădăcinilor, se remarcă absența perilor absorbanți, un sistem conducător slab dezvoltat și celule hipertrofiate. Aceste caracteristici contribuie la apariția vitrificării fiziologice, afectând negativ adaptabilitatea plantelor în faza de tranziție *ex vitro* [180].

O serie de lucrări științifice au fost dedicate îmbunătățirii procesului de aclimatizare a vitroplantelor de viță-de-vie, evidențiind importanța substratului, a umidității și a condițiilor de mediu pentru reușita tranziției *ex vitro*. Soluțiile propuse variază de la utilizarea amestecurilor de turbă, nisip și sol, până la integrarea unor aditivi precum zeolitul sau hidroabsoranții, care contribuie la menținerea unei umidități stabile și la reducerea stresului hidric. Astfel de intervenții au ca scop crearea unui mediu mai favorabil pentru înrădăcinare și dezvoltare, crescând șansele de supraviețuire a plantelor după transferul din condiții sterile [183]. Unele cercetări pun accentul pe rolul stimulatorilor de creștere în susținerea adaptării plantelor în faza *ex vitro*. De exemplu, savantul Rebrow A.M. a demonstrat, că utilizarea regulatorilor de creștere, precum lignohumat de potasiu, extrasol, emistim și zircon, contribuie la îmbunătățirea rezistenței fiziologice a plantelor și la o mai bună aclimatizate la mediul extern [191].

Aceste cercetări evidențiază faptul că etapa de aclimatizare constituie un moment esențial în succesul procesului de micropropagare a viței-de-vie, fiind determinată atât de proprietățile fizico-chimice ale substratului, cât și de starea fiziologică a plantelor la momentul transferului. Alegerea optimă a compoziției substratului și utilizarea materialelor cu capacitate ridicată de reținere a apei, completate cu macro- și microelemente nutritive, reprezintă o condiție indispensabilă pentru adaptarea eficientă a plantelor la mediul *ex vitro*.

În Republica Moldova, primele rezultate relevante în domeniul multiplicării viței-de-vie prin cultura *in vitro* au fost obținute în anul 1990 de Litvak A. I., Kuzimenco A. P., Guzun N. I. și Minakova R. V. în cadrul studiului „Metoda de înmulțire vegetativă a viței-de-vie". În același an, Litvak A. I. și Kuzimenco A. P., au dezvoltat un mediu nutritiv destinat introducerii explantelor în cultura *in vitro*, omologat prin certificat de autor (1990). Compoziția acestuia se baza pe microelemente conform formulei Heller, macroelemente după Knop și un complex de vitamine adaptat după Morel. Schema propusă prevedea două etape succesive de cultivare: prima etapă pentru obținerea plantelor inițiale și o a doua etapă pentru multiplicarea acestora. Direcția de cercetare orientată spre dezvoltarea biotehnologiilor pentru obținerea materialului viticol sănătos a fost continuată de Bondarciuc V., Sultanova O. și Constantinova I.

1.7 Analiza situației actuale de producere a materialului de înmulțire viticol asanat

În viticultura modernă, obținerea materialului de înmulțire liber de agenți patogeni constituie un proces complex, care implică utilizarea tehnologiilor biotehnologice avansate și conformarea la cadrul legislativ și normativ al fiecărui stat. Țările cu tradiție în domeniu au elaborat scheme tehnologice proprii pentru producerea materialului săditor sănătos, adaptate infrastructurii de cercetare, resurselor locale și priorităților naționale. Pentru a asigura

trasabilitatea, calitatea și controlul riguros în procesul de producere a materialului săditor viticol liber de boli cronice, în țările producătoare de material de plantare a fost constituită o rețea de organisme interprofesionale și interdisciplinare. Acestea colaborează cu instituții științifice și de învățământ, proprietari de pepiniere viticole, autorități de inspecție fitosanitară, precum și cu companii specializate în echipamente și produse pentru testare fitosanitară. Printre aceste structuri se numără: ENTAV și INRA din Franța, Servizio Fitosanitario Nazional din Italia, GAZENHEIM din Germania, National Grape Clean Plant Network (NCPN) din Statele Unite ale Americii, The Canadian Plant Protection Export Certification Program (PPECP) din Canada, Vine Improvement Association din Africa de Sud, New Zealand Winegrowers și The New Zealand Institute for Plant and Food Research Ltd (Plant & Food Research), și altele.

Din necesitatea coordonării acestor eforturi la nivel internațional, a fost fondat Consiliul Internațional pentru Studiul Virusurilor și Bolilor asemănătoare Virusului (International Council for the Study of Virus and Virus–like Diseases of the Grapevine, ICVG), care a reunit specialiști din principalele centre viticole ale lumii, având drept scop consolidarea cercetărilor și schimbului de informații în domeniul virologiei viței-de-vie. Consiliul ICVG a fost fondat în anul 1962 de un grup de fitopatologi din America și Europa, având drept scop promovarea cercetărilor în domeniul virologiei viței-de-vie și facilitarea schimbului de experiență între specialiști. Activitatea Consiliului s-a axat pe dezvoltarea cercetării fundamentale și aplicative, precum și pe conștientizarea impactului bolilor infecțioase asupra sectorului viticol, contribuind semnificativ la promovarea și producerea materialului de înmulțire sănătos și certificat. În cadrul celei de-a 14-a întâlniri a ICVG din 2003, a avut loc un atelier comun EPPO/NAPPO privind certificarea viței-de-vie, în urma căruia au fost elaborate două serii de „*Recomandări*" (2003, 2012) și două ediții ale cataloagelor „*Directories of Viruses and Virus– like Diseases of Grapevine*" (2007, 2014). Acestea au oferit autorităților de reglementare un cadru actualizat al cunoștințelor privind bolile viței-de-vie și servesc drept ghid în procesul de producere și comercializare a materialului de înmulțire în țările viticole.

În Uniunea Europeană (UE), procesul de producere este controlat de un cadru legislativ unitar [158-162] și de standardele EPPO [50], care reglementează procesul de obținere, testare și multiplicare a materialului viticol sănătos. Asigurarea unei producții viticole de calitate superioară, atât sub aspect calitativ, cât și cantitativ, are la bază multiplicarea soiurilor de viță-de-vie cu caracteristici valoroase și a portaltoilor rezistenți, utilizând material biologic controlat biologic și fitosanitar încă din faza de selecție a plantelor inițiale. Principiile generale includ alegerea plantelor candidați în clone din soiurile și clonele înregistrate, evaluarea și testarea acestora, izolarea lor în condiții de sere sau câmpuri speciale, și retestarea periodică.

Selecția fitosanitară are ca obiectiv eliminarea indivizilor bolnavi, prevenirea răspândirii bolilor și identificarea plantelor mai puțin sensibile la infecții. În acest context, cunoașterea aprofundată a soiului este esențială pentru distingerea simptomelor cauzate de factori abiotici (grindină, îngheț, arsuri solare, tulburări de nutriție, exces de substanțe chimice) de cele provocate de agenți biotici (boli, dăunători).

Testarea materialului selectat se efectuează prin metode de laborator (ELISA, PCR și microbiologice) pentru depistarea principalelor boli de etiologie virotică, fitoplasmatică și bacteriană. În statele membre ale UE, aplicarea acestor norme este corelată cu legislația națională, ceea ce a dus la diferențe între state. De exemplu, de neuniformitate între țările membre: complexul de boli rugozitatea scoarței (RS) în Germania era mai puțin importantă și nu era inclusă în selecția fitosanitară, iar în Italia RS era o problemă majoră, astfel era inclusă în lista maladiilor testate. La fel closterovirusurile GLRaV-1 și GLRaV-3 erau menționate în toate statele în timp ce alte virusuri leafroll erau ignorați. De exemplu, GLRaV-2 era acceptat doar în Franța ca fiind o boală endemică. În conformitate cu Regulamentul de punere în aplicare (UE) 2018/2019 al Comisiei privind sănătatea plantelor în UE, a fost introdus un pașaport fitosanitar unic („plant health label”), aplicabil tuturor categoriilor de material săditor: inițial, bază, certificat și standard [52] . Astfel, nivelul de infecție trebuie să fie de 0% pentru *Arabis mosaic virus* (ARMV), *Candidatus Phytoplasma solani* (PHYPSO), *Grapevine fanleaf virus* (GFLV), *Grapevine leafroll associated virus 1* (GLRaV-1) și *Grapevine leafroll associated virus* 3 (GLRaV-3) în genul *Vitis L*. În ceea ce privește *Grapevine fleck virus* (GFKV), nivelul de infecție trebuie să fie de 0% doar pentru portaltoi în cazul materialului de înmulțire inițial. Rezultatele obținute în urma testărilor de laborator servesc la identificarea plantelor sănătoase destinate multiplicării, iar în situațiile în care toți candidații în clone sunt infectați, se aplică metode de asanare

Asanarea clonelor testate pozitiv se realizează prin aplicarea metodelor de devirozare, precum termoterapia cu apă fierbinte, termoterapia cu aer fierbinte, cultura *in vitro*, chimioterapia și embriogeneza somatică. Plantele care corespund cerințelor fitosanitare sunt înregistrate oficial ca material de înmulțire inițial (stoc nucleu) și utilizate pentru multiplicarea în condiții controlate, care previn reinfectarea, în vederea obținerii materialului de valoare biologică Bază.

În statele membre ale UE, inclusiv România, aplicarea acestor norme este corelată cu legislația națională. Astfel, Ministerul Agriculturii și Dezvoltării Rurale (MADR) elaborează acte normative și ghiduri tehnice care completează cadrul comunitar. Un exemplu este „Ghidul de bune practici”, care oferă recomandări privind măsurile de prevenire și combatere a bolilor și dăunătorilor, precum și norme administrative și tehnice necesare pentru asigurarea unui nivel înalt de protecție fitosanitară în plantațiile viticole [112].

Un exemplu reprezentativ de implementare a principiilor de certificare și control fitosanitar stabilite la nivelul Uniunii Europene este schema aplicată în Italia, coordonată de *Servizio Fitosanitario Nazionale* în colaborare cu instituțiile de cercetare viticole, care ilustrează modul de organizare a procesului de certificare și de menținere a materialului de înmulțire de categorie biologică superioară. Schema generală a acestui proces este prezentată în figura 1.2 și reflectă etapele principale de obținere a clonelor inițiale (stoc nucleu).

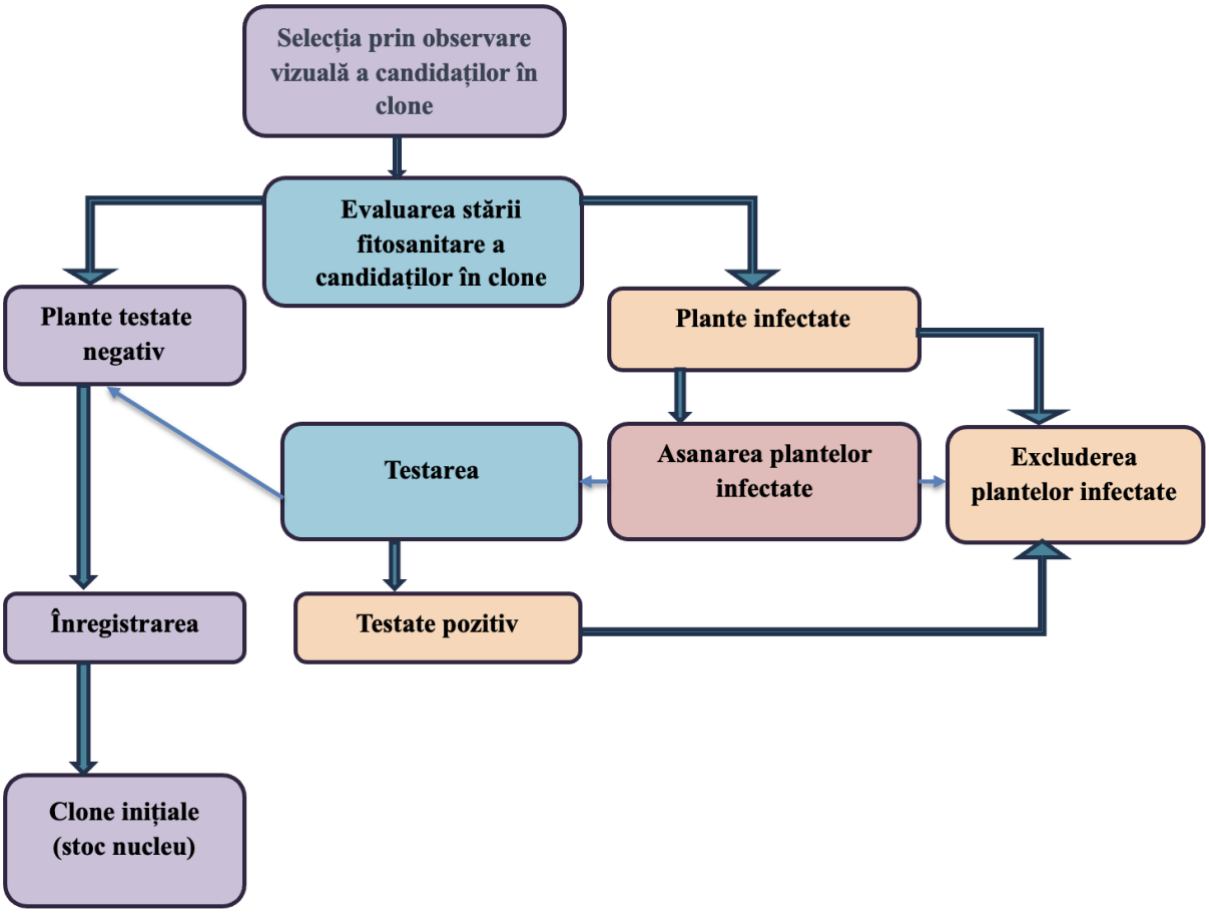

Fig. 1.2 Schema procesului aplicat în Italia pentru obținerea materialului inițial (stoc nucleu), în conformitate cu programul de certificare implementat în UE [102]

Materialul certificat, obținut din aceste plantații, este destinat pepinierelor autorizate și producătorilor viticoli, fiind utilizat pentru înființarea plantațiilor comerciale de viță-de-vie. În ansamblu, sistemul italian de certificare reprezintă un mecanism integrat, care asigură trasabilitatea, uniformitatea și calitatea materialului de înmulțire viticol.

În afara spațiului european, au fost dezvoltate și implementate modele similare de certificare și control fitosanitar, adaptate particularităților regionale ale fiecărei țări viticole. Un exemplu concludent îl reprezintă sistemul din Statele Unite ale Americii (SUA), unde procesul de obținere a materialului de înmulțire viticol sănătos se bazează pe aceleași principii conceptuale ale certificării, fiind organizat într-o structură proprie, coordonată la nivel național.

În SUA, sistemul de producere a butașilor viticoli sănătoși este ghidat de cadrul National Clean Plant Network (NCPN), sub coordonarea USDA (Departamentul de Agricultură al Statelor Unite). Se utilizează o structură pe generații (*G1–G4*): *G1* reprezintă materialul nucleu (*foundation),* obținut și menținut sub cele mai stricte condiții de izolare, retestat și supus unor metode moderne de diagnostic, precum secvențierea de nouă generație (*NGS*). Ulterior, *G2* și *G3* reprezintă stadiile intermediare de multiplicare, până când se ajunge la G4, care constituie materialul certificat destinat viticultorilor. Spre deosebire de modelul din Europa, infrastructura de menținere a acestor generații este specifică unor centre denumite *Clean Plant Centers*, care asigură testări regulate și pun în aplicare proceduri de asanare. Această schemă ține cont de cerințe similare: gestionarea vectorilor, eliminarea plantelor suspecte de infecții, utilizarea testelor moleculare și serologice pentru confirmarea stării de sănătate [119].

În contextul alinierii la standardele internaționale, Republica Moldova a întreprins acțiuni similare orientate spre crearea unui cadru normativ și instituțional armonizat cu practicile europene și internaționale. Pentru ameliorarea situației din sectorul vitivinicol și pentru stabilirea unei baze legislative solide, Guvernul Republicii Moldova a adoptat un cadru normativ specific, prin Legea nr. 420-XVI din 22 decembrie 2006 privind activitatea de reglementare tehnică și Legea viei și vinului nr. 57-XVI din 10 martie 2006 [97, 98]. În continuarea acestor legi, a fost emisă Hotărârea Guvernului nr. 418 din 9 iulie 2009, prin care a fost aprobată Reglementarea tehnică „Producerea, certificarea, controlul și comercializarea materialului de înmulțire și săditor viticol". Ulterior, această reglementare a fost abrogată prin Hotărârea Guvernului nr. 432 din 21 iunie 2024 (Monitorul Oficial nr. 314–317 din 23.07.2024, art. 633), prin care a fost stabilit noul cadru național de producere a materialului săditor viticol, împărțit în categoriile: Prebază, Bază, Certificat și Standard [73]. Principiile tehnologice includ menținerea plantațiilor de preînmulțire sub control fitosanitar anual, testări cu frecvență stabilită și excluderea plantelor infectate cu virusuri sau cu forme latente de cancer bacterian. Noul cadru normativ pune bazele formării unui sistem unitar de certificare, trasabilitate și control fitosanitar al materialului de înmulțire viticol, orientat spre armonizarea cu cerințele Uniunii Europene. Totodată, se impune elaborarea și implementarea unei tehnologii eficiente de obținere a materialului viticol sănătos, adaptate situației fitosanitare actuale, reieșind din natura și gradul de răspândire a agenților patogeni.

Reieșind din analiza modului de organizare a producției de material viticol sănătos în diferite țări, se poate concluziona, că indiferent de regiune orice tehnologie de producere a materialului săditor viticol se bazează pe aceleași pricipii și etape-cheie. Procesul de obținere a plantelor libere de agenți patogeni presupune respectarea tuturor etapelor interconectate, începând cu selecția candidaților în clone și finisând cu certificarea materialului săditor de viță-de-vie.

1.8 Concluzii la capitolul 1

1. S-a constatat că în plantațiile viticole, bolile cauzate de agenți patogeni de etiologie virală, fitoplasmatică și bacteriană sunt larg răspândite, vița-de-vie fiind una dintre speciile horticole la care a fost identificat cel mai mare număr de patogeni intracelulari: peste 100 de virusuri, 5 viroizi, 8 fitoplasme și mai multe specii de bacterii xilemice.

2. A fost stabilit că infecțiile produse de virusuri, fitoplasme și cancer bacterian provoacă pagube semnificative, reducând rezistența plantelor la factorii de stres abiotici și biotici, afectând calitatea butașilor altoi și portaltoi, reducând producția de struguri și diminuând calitatea recoltei.

3. S-a constatat că identificarea virozelor și a cancerului bacterian al viței-de-vie se realizează prin aplicarea unui ansamblu de metode biologice, serologice și moleculare, în care testarea prin metoda ELISA constituie procedura standard utilizată în laboratoarele de profil, iar tehnica PCR este tot mai frecvent implementată datorită sensibilității ridicate și specificității în detectarea agenților patogeni.

4. S-a relevat că agenții patogeni menționați sunt paraziți intracelulari obligați, fapt care limitează eficiența metodelor tradiționale de combatere. O soluție viabilă și durabilă pentru reducerea răspândirii bolilor viței-de-vie cauzate de virusuri, fitoplasme și *A. vitis* o constituie selecția fitosanitară, bazată pe obținerea și utilizarea clonelor sănătoase, completată cu măsuri preventive menite să reducă riscul reinfectării secundare.

5. S-a constatat că bolile viței-de-vie de etiologie virală și cancerul bacterian se manifestă sistemic și au un caracter cronic, iar utilizarea materialului săditor infectat contribuie la perpetuarea și extinderea acestor agenți patogeni în plantațiile viticole comerciale. Deosebit de periculoasă este transmiterea infecțiilor prin înmulțirea vegetativă, în special prin utilizarea materialului viticol provenit din surse contaminate, fapt ce favorizează răspândirea agenților patogeni în noile plantații și compromiterea stării fitosanitare a acestora.

6. S-a evidențiat necesitatea elaborării și implementării unei tehnologii eficiente de obținere și multiplicare rapidă a clonelor sănătoase de viță-de-vie, în scopul prevenirii răspândirii agenților patogeni ai bolilor virale, fitoplasmatice și ai cancerului bacterian în plantațiile viticole din Republica Moldova. Această tehnologie trebuie să includă înființarea plantațiilor-mamă de categorii biologice Prebază și Bază, care să asigure tranziția sectorului pepinieristic la producerea materialului săditor viticol de categoria Certificat, conform reglementărilor naționale.

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). În teză sunt incluse rezultatele investigațiilor științifice efectuate în colaborare cu colegii de laborator: Bondarciuc Victor, doctor în științe agricole; Sultanova Olga, doctor în științe biologice; Haustov Evghenii, doctor în științe agricole; Constantinova Irina, cercetător științific; Sâtnic Feodora, cercetător științific; Lisnic Tamara, inginer superior în agricultură; Mihailiuc Natalia, inginer coordonator; Costina Svetlana, laborant.

Studiile au fost desfășurate în condiții de laborator, seră și câmp utilizând material vegetal provenit din plantații viticole, din 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 cultivate. Evaluările pentru soiurile Copceac și Tudor au fost efectuate în parcelele de selecție situate în orașul Codru, str. Vierul nr. 59; pentru soiurile Plăvaie și Tudor în plantațiile din satul Costești, raionul Ialoveni; pentru soiul Moldova în plantația din satul Scoreni, raionul Strășeni.

În urma inspecțiilor de teren, au fost selectați butuci de viță-de-vie care nu prezentau simptome de boli virale, fitoplasmatice sau de cancer bacterian și care se caracterizau prin vigoare vegetativă, productivitate constantă și calitate superioară a strugurilor. Materialul biologic colectat din acești butuci a fost analizat și utilizat ulterior în cercetările de laborator pentru asanare, regenerare, multiplicare *in vitro* și testare fitosanitară complexă.

În cadrul cercetărilor au fost incluse soiuri autohtone de viță-de-vie, care prin particularitățile lor biologice și agro-oenologice reprezintă un patrimoniu genetic esențial pentru viticultura Republicii Moldova. Ele constituie baza tradițională a sortimentului național și au un rol important în menținerea diversității și în programele de selecție clonală.

Fetească Albă – este un soi vechi, răspândit în Republica Moldova, România, Ungaria, Ucraina și Germania. Strugurii se maturizează în septembrie și prezintă o mare capacitate de acumulare a zaharurilor. Vinurile obținute sunt catifelate, cu gust echilibrat și fin, utilizate atât pentru vinuri seci de calitate superioară, cât și pentru vinuri demidulci și spumante [149].

Fetească Neagră – este un soi autohton cunoscut din timpuri străvechi, cultivat astăzi pe scară largă în Moldova și peste hotare. Este întâlnit sub diferite sinonime (Coada Rândunicii, Păsărească Neagră, Poama Fetei Neagră, Fekete Leányka, Chornaya Fetyaska). Din struguri se obțin vinuri roșii seci, echilibrate, cu arome caracteristice de prune uscate, vișine și fructe de pădure, cu gust armonios, textură plină și potențial ridicat de maturare la butoi [149].

Fetească Regală – descoperită după 1920 în Transilvania, are ca genitori confirmați prin analize moleculare Fetească Albă și Frâncușa. Vinurile au o culoare alb-verzuie, evoluând spre galben-pai la maturare, cu tărie alcoolică moderată și aciditate ridicată, ce le conferă prospețime, echilibru și o aromă floral distinctă. Este utilizată pentru vinuri seci, spumante și distilate [149].

Rară Neagră – este un soi vechi, considerat rar, sinonim cu Băbească Neagră în România. Prezintă productivitate ridicată și rezistență la secetă. Vinurile au o culoare roșu-rubinie cu reflexe de rodie, sunt catifelate, cu note de fructe uscate și vanilie. Se disting prin aciditate mai ridicată decât alte vinuri roșii, ceea ce le conferă prospețime. Este un soi de referință pentru cupaje, fiind component esențial al celebrului Negru de Purcari [149].

Copceac – este o formă ameliorată a soiului Rară Neagră, cu maturare mai târzie (sfârșit de septembrie – început de octombrie). Produce vinuri roșii seci de calitate superioară, dar și vinuri de desert, cu culoare intensă și aromă distinctă. Vinurile roșii seci din Copceac sunt frecvent utilizate în cupaje pentru îmbogățirea structurii [149].

Plăvaie – este un soi autohton vechi, cunoscut prin numeroase sinonime (Plăvană, Bălana, Bălaia, Poama Plăvaie). În trecut ocupa suprafețe mari în sudul Moldovei, Panciu și Odobești. Produce vinuri albe seci de consum curent, culoare galben-verzuie și aromă discretă. Strugurii sunt utilizați și pentru spumante și distilate [149].

Negru de Căușeni – furnizează vinuri roșii seci cu arome de fructe uscate, gust armonios și plăcut, cu tărie alcoolică medie și fructuozitate ridicată. Aceste vinuri se recomandă pentru consum în stare tânără, fără maturare suplimentară [149].

Busuioaca de Bohotin – soi aromat, cu vinuri caracterizate printr-un buchet intens, floral, cu note de busuioc, utilizat pentru vinuri aromate de calitate și pentru cupaje speciale [25].

Frâncușa și **Zghihara** – soiuri albe vechi, cultivate tradițional în podgoriile Moldovei și României. Vinurile din Frâncușa sunt seci, ușoare, cu aciditate ridicată, prospețime caracteristică

și un conținut moderat de alcool, fiind potrivite pentru consumul tânăr. Zghihara produce vinuri albe verzi-gălbui, cu gust vioi, plăcut și echilibrat, recomandate pentru consum curent [142].

Telti Curuc (Coada vulpii) – este un soi vechi, originar din zona Mării Negre, menționat în sursele ampelografice ca Telti-Kuruk (din turcă „coadă de vulpe", denumire ce reflectă aspectul ciorchinilor). În prezent, soiul este cultivat cu precădere în sudul Ucrainei, în regiunea Odesa, unde centrul vinicol Șabo îl valorifică drept component al patrimoniului vitivinicol local. În Republica Moldova este întâlnit sporadic în plantațiile vechi și în colecții ampelografice, fiind cunoscut sub sinonimul „Coada vulpii" [152].

Au fost valorificate și soiurile de selecție nouă, create în Republica Moldova, cu valoare biologică și economică deosebită. Aceste soiuri au fost obținute prin programe de ameliorare derulate de cercetătorii moldoveni începând cu a doua jumătate a secolului XX și se disting prin rezistența sporită la stresul abiotic și boli criptogamice, stabilitatea producțiilor și calitatea vinurilor sau a strugurilor de masă pe care le furnizează. Ele reprezintă o contribuție la diversificarea bazei genetice a viticulturii naționale și constituie un element esențial în consolidarea competitivității sectorului vitivinicol al Republicii Moldova.

Moldova – obținut prin hibridarea Guzali Kara × Villard Blanc, creat de Juraveli M.S., Gavrilov I.P., Borzicova G.M. și Guzun N.I. Este unul dintre cele mai răspândite soiuri moldovenești de masă, valorificat pe scară largă datorită productivității ridicate, aspectului comercial al ciorchinilor și calității gustative a boabelor. Se remarcă prin rezistență sporită la boli criptogamice și printr-o bună capacitate de păstrare a strugurilor după recoltare, ceea ce îl face deosebit de apreciat atât pe piața internă, cât și la export [173].

Luminița – rezultat din încrucișarea Cabernet Sauvignon × Seibel 13-666; autori: Guzun N.I., Olari F.A., Țâpco M.V. Este un soi tehnic, valorificat pentru producerea vinurilor aromate și caracterizat printr-o bună adaptabilitate la condițiile pedoclimatice locale. Luminița este recomandat pentru fabricarea vinurilor albe seci și a spumantelor albe de calitate [149, 173].

Muscat de Ialoveni – derivat din combinația Seibel 13-666 × Aleatiko; creat de Guzun N.I., Olari F.A., Țâpco M.V., Caidan E.A., Conovalova A.V., Naidenova I.N., Nedov P.N. Soiul este apreciat pentru aromele tipice de muscat și pentru calitatea superioară a vinurilor obținute. Este utilizat la producerea vinurilor albe seci de calitate, a vinurilor demidulci, precum și a sucurilor. Datorită rezistenței sporite la factorii stresanți ai mediului, Muscat de Ialoveni este recomandat și pentru obținerea produselor vinicole ecologice [149, 173].

Basarabia – hibrid interspecific (VI-39-93 × VII-11-30), creat de Savin Gh., Cornea V., Baca I., Popov A. Soi de masă promițător, cu boabe mari de culoare neagră-albastră [5].

Codrinschii – obținut prin încrucișarea soiurilor Băbească neagră × Cabernet Sauvignon; autor: Vedeneeva V.S. Soiul de struguri Codrinschii este destinat producerii vinurilor roze și roșii seci de calitate, fiind recomandat totodată pentru elaborarea vinurilor spumante și utilizarea ca element valoros în cupaje de vinuri roșii de calitate superioară [196].

Meleag – hibrid obținut prin încrucișarea Varousset × Malvoisie rouge, creat de Guzun N., Olari T., Cazac T. și colaboratori. Este un soi de stuguri, destinat producerii vinurilor roșii de calitate, cu recunoaștere recentă pe piața viticolă. În anul 2021, Meleag a fost omologat de Comisia de Stat pentru Testarea Soiurilor de Plante și inclus în Registrul de Stat al culturilor agricole din Republica Moldova, conform adeverinței nr. 803 [8].

Tudor – rezultat din combinația Datier de St. Vallier × Pobeda; creat de savanții Olari F., Cazac F., Guzun N., Țâpco M., Djurii V., Nezalzova I., Cogîlniceanu I., Supostat L. Este un soi de struguri pentru masă, adaptat la condițiile pedoclimatice locale [3].

Onițcanschii belâi – creat prin hibridarea Cili Ghiuliabi × [SV 20-366 + polen liber de Pinot blanc]; autori: Verderevschii D.D., Voitovici C.A., Naidenova I.N. Soi de struguri pentru vin cu boabe albe, atractive și rezistență sporită la factori biotici și abiotici [173].

Legenda – rezultat din încrucișarea Royal Vinyard × Traminer roz; creat de Guzun N., Olari T., Țîpko M., Nedov P., Găină B. Soi de struguri pentru vin. Producția de struguri a acestui soi este destinată obținerii vinurilor albe seci, caracterizate printr-o aromă floral plăcută, de trandafir, specifică soiului, și printr-un gust plin și proaspăt. Datorită rezistenței sporite la factorii stresanți ai mediului, soiul este recomandat și pentru producerea băuturilor vinicole ecologice [34].

Chișmiș lucistâi – hibrid între Cardinal × Chișmiș roz; creat de Juraveli M.S., Borzicova G.M., Gavrilov I.P. Este un soi apiren de masă, foarte apreciat pentru aspectul boabelor și calitățile gustative. Boabele sunt mari, crocante, cu o textură plăcută și un gust echilibrat, dulce-aromat, ceea ce îl face deosebit de valoros pentru consumul în stare proaspătă [7].

În cadrul cercetărilor au fost incluse și soiuri europene consacrate, cultivate pe scară largă în podgoriile Republicii Moldova și recunoscute la nivel internațional pentru valoarea lor oenologică, adaptabilitatea bună la condiții pedoclimatice variate și calitatea constantă a producțiilor. Acestea au servit drept reper comparativ, fiind utilizate atât pentru evidențierea candidaților în clone, cât și pentru analiza stării fitosanitare în raport cu alte categorii de soiuri.

Sauvignon blanc – soi originar din regiunea Bordeaux, cultivat din secolul al XVIII-lea. Este apreciat pentru aromele sale erbacee și florale caracteristice și este utilizat la producerea vinurilor albe seci de calitate superioară, cu aciditate proaspătă și potențial bun de maturare. Se adaptează bine condițiilor temperate, însă prezintă sensibilitate la mucegai și mană [58].

Merlot – originar din Bordeaux (Franța), atestat documentar din secolul al XVIII-lea. Este unul dintre cele mai răspândite soiuri roșii la nivel mondial, valorificat pentru vinuri roșii seci, corpolente, dar și pentru cupaje. Se remarcă prin adaptabilitatea la diferite tipuri de soluri și condiții de climă, dar este sensibil la ger și la înghețurile târzii [58].

Pinot noir – soi de struguri pentru vin cu origine în Burgundia (Franța), considerat unul dintre cele mai vechi soiuri europene, cu istorie de peste 2000 de ani. Utilizat pentru producerea vinurilor roșii elegante și a spumantelor de calitate, Pinot noir este sensibil la condițiile pedoclimatice nefavorabile și la boli criptogamice (în special mucegaiul cenușiu și mană), dar în zonele potrivite oferă vinuri de mare finețe, complexitate aromatică și tipicitate distinctă [58].

Chardonnay – originar din Burgundia (Franța), rezultat probabil din hibridarea naturală a soiurilor Pinot noir × Gouais blanc. Este cel mai răspândit soi alb internațional, utilizat pentru vinuri albe seci de calitate și spumante. Se caracterizează prin plasticitate ecologică și prin capacitatea de a exprima terroir-ul local, dar este sensibil la înghețurile severe [58].

Pinot gris – derivat din Pinot noir, cu origine în Burgundia și Alsacia (Franța). Cunoscut și sub alte denumiri (Grauburgunder, Ruländer, Tokay d'Alsace), este apreciat pentru vinurile albe catifelate, cu aromă fructată și echilibru bun între zaharuri și aciditate. Se adaptează bine la zonele cu climă temperată și soluri fertile, dar este predispus la mucegai și putregaiul cenușiu în condiții ploioase, ceea ce necesită o atenție sporită în lucrările agrotehnice și fitosanitare [58].

Cabernet Sauvignon – soi apărut natural în Bordeaux (Franța) din încrucișarea Cabernet Franc × Sauvignon blanc. Considerat un „soi clasic" la nivel mondial, este cultivat pe scară largă în toate regiunile viticole importante. Produce vinuri roșii de calitate superioară, cu conținut ridicat de tanin uri și o capacitate excelentă de învechire. Se remarcă prin rezistența la secetă și adaptabilitatea largă, însă prezintă sensibilitate la temperaturi critice joase și la geruri mari [58].

Alegerea portaltoiului are o însemnătate promordiala, deoarece de el depinde valorificarea superioară a diferotor tipuri de sol vigoarea de creștere, intrarea pe rod, cantitatea si calitatea recoltei. În cadrul cercetărilor au fost utilizați portaltoi interspecifici consacrați în viticultura europeană, caracterizați printr-o bună adaptabilitate la diferite condiții pedoclimatice și rezistență la filoxeră. 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.

Berlandieri × Riparia SO4 (Selection Oppenheim 4) este un hibrid interspecific obținut prin încrucișarea speciilor *V. berlandieri* și *V. riparia* la Geisenheim (Germania). Acest portaltoi prezintă o vigoare moderată și se adaptează bine solurilor compacte, grele și umede. Este rezistent

la filoxeră și manifestă toleranță relativă la clorozăcalcară, fiind utilizat pe scară largă în plantațiile comerciale datorită stabilității producției pe care o asigură [130].

Berlandieri × Riparia Kober 5BB este un hibrid obținut la Klosterneuburg (Austria), caracterizat printr-o vigoare ridicată și o rezistență bună la filoxeră. Se adaptează la o gamă largă de soluri și prezintă toleranță moderată la clorozăcalcară. Este unul dintre cei mai răspândiți portaltoi folosiți pentru altoirea soiurilor de *V. vinifera* în plantațiile comerciale, unde contribuie la obținerea unor producții mari și stabile [130].

Riparia × Rupestris 101-14 Mgt, creat la Montpellier (Franța), este un portaltoi cu vigoare redusă, apreciat pentru faptul că induce timpurietate și maturarea mai rapidă a strugurilor. Prezintă rezistență bună la filoxeră, dar este mai sensibil la secetă și la solurile cu conținut ridicat de calcar. Se utilizează cu succes pe soluri aluviale și fertile, unde umiditatea este mai ridicată, având un rol important în controlul vigorii soiurilor altoite [130].

Maleque, un hibrid interspecific obținut în Franța, rezultat din încrucișarea genitorilor Couderc 4401 × Castel 120, creați de către amelioratorul Vincent Malègue. În literatura de specialitate este cunoscut și sub denumirea de Bon Roussillon. Plantele de Maleque prezintă flori hermafrodite și o formare completă a semințelor. Acest portaltoi este apreciat pentru rezistența genetică sporită, atestată prin analizele moleculare (SSR-marker data) și pentru prezența unor loci de rezistență identificați în genom, ceea ce îi conferă o adaptabilitate bună la condițiile pedoclimatice variate [154]. Datorită originii sale genetice, Maleque manifestă o combinație favorabilă de trăsături: toleranță la factori abiotici, comportament bun în altoire și potențial de utilizare în viticultura modernă, inclusiv în programele de selecție clonală din Republica Moldova. Materialul biologic introdus utilizat în cercetări a provenit din plantația de portaltoi din localitatea Geamăna, raionul Anenii Noi, unde au selectat candidații în clone Maleque 3-1, 3-2, 3-3 și 3-4 pentru testările fitosanitare și evaluările ulterioare.

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 – *Grapevine Fanleaf Virus*), virusul răsucirii frunzelor de viță-de-vie tip 1 (GLRaV-1 – *Grapevine Leafroll-associated Virus 1*), virusul răsucirii frunzelor de viță-de-vie tip 3 (GLRaV-3 – *Grapevine Leafroll-associated Virus 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 bucăți; soiuri de selecție nouă – 62.100 bucăți; soiuri europene – 202.850 bucăți.

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 din loturile de selecție butucii care prezentau simptome de boli virotice precum: scurt-nodarea viței-de-vie, mozaicul galben, mozaicul nervurilor, boala fleck și enațiunea. A doua etapă de evaluare a avut loc în perioada maturării strugurilor. În această fază, 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 dublu-anticorp dezvoltat de Clark și Adams [32], cu utilizarea seturilor comerciale de diagnostic produse de compania Agritest [6]. 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).

Probele au fost pregătite prin omogenizarea țesutului lignificat, urmată de incubarea materialului în soluție tampon extractivă specifică pentru virusuri, timp de 2 ore. Ulterior, extractul a fost distribuit în plăci ELISA cu 96 godeuri, acoperite anterior cu anticorpi specifici fiecărui virus. Etapele testării au inclus:

1. Incubarea probelor la 4 °C peste noapte, pentru legarea antigenului la anticorpul fixat;
2. Spălări intermediare automate cu soluție tampon, realizate cu spălătorul de microplăci INTELIWASHER 3D – IW8 (Biosan, Letonia);
3. Adăugarea anticorpului conjugat și incubarea timp de 2 ore la 37 °C în incubator cu agitare DYNATECH Microshaker – Incubator;
4. Spălarea finală și adăugarea substratului;
5. Reacția enzimatică s-a realizat în incubator, la 37 °C, timp de 10–15 minute.

Citirea absorbției optice (OD) s-a efectuat la 405 *nm* cu fotometrul de microplăci HiPo MPP-96 (Biosan), cu analiză computerizată a datelor. Un eșantion a fost considerat pozitiv dacă absorbția optică a fost de cel puțin două ori mai mare decât valoarea martorilor negativi. Fiecare probă a fost analizată în dublu tehnic, iar rezultatele pozitive au fost reconfirmate prin re-testare.

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 & Sasser utilizat pentru izolarea bacteriilor *Agrobacterium spp*. [132]. 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. Pentru identificarea moleculară a tulpinilor patogene de *A. vitis* și *A. tumefaciens*, au fost analizate probe de viță-de-vie, reprezentate prin coarde maturate de un an, prelevate din soiuri și forme de selecție studiate în cadrul cercetării. Probele au fost supuse izolării bacteriilor din complexul *Agrobacterium spp*. pe mediu semiselectiv Roy & Sasser, cu incubare timp de 7 zile la 27 °C. Coloniile bacteriene dezvoltate au fost prelevate și supuse extracției ADN-ului. Procedura a inclus recoltarea masei bacteriene într-un microtub Eppendorf de 1,5 ml, resuspendarea în tampon de extracție, urmată de liză termică la 95 °C timp de 10 minute. După centrifugare, supernatantul clar a fost utilizat ca șablon de ADN pentru reacția PCR.

Diagnosticul molecular a fost realizat cu kitul comercial „PCR Agrobacterium vitis", dezvoltat de compania Qualiplante, conform protocolului oficial al producătorului [129]. Reacția PCR a fost efectuată cu utilizarea markerilor moleculari pentru genele *pehA*, *virD* și *virF*, care permit diferențierea între tulpinile patogene și nepatogene *A. vitis* și *A. tumefaciens.*

Echipamente utilizate: Termociclator model Prime Thermal Cycler (Techne, UK)– utilizat pentru amplificarea fragmentelor de ADN prin reacția în lanț a polimerazei; Sistem de electroforeză în gel de agaroză și transiluminator cu cameră digitală integrată – utilizat pentru vizualizarea produselor PCR; Alte echipamente auxiliare: centrifugă, bloc termic, micropipete

calibrate, vortex, surse de alimentare pentru electroforeză.

Pentru analiza produselor PCR s-a folosit marker de greutate moleculară de 100 bp și colorant intercalant bromură de etidiu/alternativ SYBR Safe. 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 (cifrul 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 menținută la temperatura constantă de 50 °C timp de 45 minute. Condițiile de tratament au fost stabilite în conformitate cu fișa tehnică a proiectului *WINETWORK* și cu recomandările metodologice internaționale privind aplicarea terapiei cu apă fierbinte pentru materialul viticol [54].

Tratamentul termic cu aer fierbinte a fost aplicat pentru candidații în clone din soiul Codrinschii (cifrul I-9-7-4 și I-9-8-1). Tratamentul a fost realizat în camere de termoterapie de tip KK 500TOP+FIT, echipată cu sistem de convecție forțată și control digital al temperaturii, care permite menținerea constantă a parametrilor de tratament. Condițiile aplicate au inclus o temperatură de 37–38 °C, pe o durată de 4 săptămâni, în conformitate cu protocoalele standard de asanare fitosanitară, recomandate de OIV și reglementate de standardul EPPO PM [146].

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

La etapa de multiplicare accelerată a clonelor asanate prin metoda de multiplicare *in vitro* au fost supuse 20 de clone, fiind obținute 6.349 de plante din următoarele soiuri și clone: Moldova (cl. INVV13-12), Chișmiș lucistîi (cl. INVV5-81), Chișmiș Moldavschii (cl. INVV), Apiren roz (cl. INVV40-42), Plăvaie (cl. INVV21-22), Copceac (cl. INVV18-2), Negru de Căușeni (cl. INVV), Telti Curuc (cl. INVV10-91), Feteasca neagră (cl. INVV18-2), Feteasca regală (cl. INVV10-71), Feteasca albă (cl. INVV13-11), Sauvignon (cl. INVV10-91), Merlot (cl. INVV14-41), Pinot noir (cl. INVV12-44), Floricica (cl. INVV21-31), Legenda (cl. INVV21-36), Onițcanskii belâi (cl. INVV9-14), BxR Kober 5 BB (cl. INVV3-21), BxR SO4 (cl. INVV6-42) și RxR 101-14 (cl. INVV11-32).

Obținerea materialului biologic destinat multiplicării a fost realizată în condiții controlate, în camere de creștere de tip KK 500TOP+FIT, în care s-au menținut parametri optimi pentru cultura *in vitro*, respectiv temperatură constantă de 25 ± 1 °C și un regim fotoperiodic de 16 ore lumină și 8 ore întuneric [2, 6]. Iluminarea a fost asigurată de surse LED, cu o intensitate luminoasă de 4000 lux. Recoltarea materialului vegetal pentru introducerea în cultură a fost efectuată în perioada de creștere activă a plantelor, la 35–38 de zile de la inițierea procesului de înrădăcinare a butașilor. Pentru inițierea culturii *in vitro* au fost utilizate porțiuni apicale ale lăstarilor tineri de viță-de-vie, aflate în fază intensă de creștere prelevate din plante-mamă.

Sterilizarea materialelor, spațiilor și mediilor de cultură. Pentru desfășurarea activităților de cultură *in vitro* în condiții aseptice, toate materialele, echipamentele și suprafețele de lucru au fost supuse unor proceduri de sterilizare, adaptate în funcție de natura și rezistența acestora la tratamente termice sau chimice.

Vesela de laborator și alte echipamente rezistente la temperaturi ridicate au fost sterilizate cu aer cald uscat, utilizând dulapuri de uscare de tip BioBase, model BKQ-B100, la temperaturi cuprinse între 160–180 °C, timp de 2–3 ore. Înainte de sterilizare, vesela a fost spălată chimic și clătită abundent cu apă distilată, pentru a elimina urmele de detergenți sau impuritățile aderente. Printre recipientele utilizate au fost: eprubete de sticlă cu baza plată (Ø 40 mm, H 150 mm), vase conice (Erlenmeyer), pahare cotate, baloane, cilindri graduați, cutii Petri și pipete.

Mediile nutritive, atât cele agarizate, cât și lichide, au fost sterilizate în autoclav de laborator de tip BioBase, model BKQ-B100, la temperaturi de 115–121 °C, timp de 20–25 minute. Mediul nutritiv „Biona-311” utilizat pentru micropropagare și aclimatizare, a fost sterilizat direct în recipientele de plastic, prin expunere la 115 °C timp de 30 de minute. Substratul de turbă utilizat în etapa de aclimatizare a fost sterilizat prin opărire cu apă clocotită, procedură care a permis reducerea semnificativă a încărcăturii microbiene.

Pentru sterilizarea explantelor de viță-de-vie, reprezentate de fragmente apicale de lăstari tineri aflați în fază activă de creștere, a fost utilizată soluție de hipoclorit de calciu $Ca(ClO)_2$ de 10%, în care explanturile au fost imersate timp de 5–7 minute. Ulterior, acestea au fost clătite de trei ori cu apă distilată sterilă, în boxă cu flux laminar de tip BIOBASE BBS-V1300, pe durata de10 minute. Sterilizarea chimică a explantelor a fost adaptată pentru a asigura eliminarea microorganismelor de pe suprafață fără afectarea meristemelor.

Instrumentele de lucru (pense, bisturie, spatule) au fost sterilizate termic înainte de utilizare, prin expunere timp de 2 ore la 160 °C. În timpul procesului de inoculare și multiplicare, acestea au fost flambate repetat, la flacăra unei spirtiere, după fiecare utilizare, pentru a evita contaminările încrucișate și a menține condițiile aseptice în întregul flux de lucru.

Spațiile de lucru aseptice, inclusiv hota cu flux laminar și suprafețele adiacente, au fost sterilizate prin expunere la radiații ultraviolete (UV) timp de 60 de minute, înainte de fiecare etapă de lucru. Ulterior, toate suprafețele de contact au fost șterse cu alcool etilic 74%, pentru a elimina orice contaminanți reziduali. Aceeași procedură a fost aplicată echipamentelor de protecție personală și accesoriilor utilizate în timpul manipulării materialului biologic.

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 standart 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 si FeEDTA 56 mg/L. Pentru prepararea mediilor nutritive utilizate în cultura *in vitro* a viței-de-vie, au fost pregătite soluții stoc de macroelemente și microelemente, respectând proporțiile și volumele indicate în protocolul de laborator (tabelele 2.1-2.3).

Tabelul 2.1 Soluții stoc de macroelemente

Substanța	Cantitate/volum	Volum soluție stoc final	Dozaj în mediu final
KNO_3	28,75 g / 280 mL	1 L	1 mL/L
NH_4NO_3	9,2 g / 280 mL	1 L	1 mL/L
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	45,5 g / 250 mL	1 L	1 mL/L
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	40,5 g / 250 mL	1 L	1 mL/L
NaCl	30,5 g / 250 mL	1 L	1 mL/L
KH_2PO_4	2,55 g / 250 mL	1 L	1 mL/L

Pentru prepararea soluțiilor stoc, macroelementele au fost cântărite cu balanța analitică Radwag PS 2100.R2, iar microelementele cu balanța analitică FA-N Series FA2204N. Substanțele chimice au fost dizolvate în apă distilată și completate până la volumul final cu cilindru cotat. Fiecare soluție a fost preparată separat, transferată în recipiente de sticlă brună etichetate și păstrată la temperatura de +4 °C, în frigider de tip Samsung RB30J3000WW.

Tabelul 2.2 Soluții stoc de microelemente

Substanța	Concentrație soluție stoc	Dozaj în mediu final
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	100 mg / 100 mL	1 mL/L
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	100 mg / 100 mL	1 mL/L
H_3BO_3	100 mg / 100 mL	1 mL/L
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	100 mg / 100 mL	100 µl/L
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	19 mg / 100 mL	100 µl/L
$NiCl_2 \cdot 6H_2O$	16 mg / 100 mL	100 µl/L
KI	10 mg / 100 mL	100 µl/L

Microelementele au fost dozate conform rețetei, utilizând micropipete calibrate, cu respectarea normelor de sterilitate, pentru a preveni contaminarea mediului.

Tabelul 2.3 Soluții stoc de vitamine

Substanța	Concentrație soluție stoc	Dozaj în mediu final
Tiamină (B_1)	100 mg / 100 mL	1 mL/L
Piridoxină (B_6)	100 mg / 100 mL	1 mL/L
Acid nicotinic (PP)	100 mg / 100 mL	1 mL/L
Calciu D-pantotenat	100 mg / 100 mL	1 mL/L

Inocularea explantelor în mediile nutritive pentru dezvoltarea vitroplantelor a fost realizată în boxă cu condiții sterile, dotată cu lampă UV și hotă cu flux laminar de tip BIOBASE BBS-V1300. Explantele sterilizate au fost plasate pe mediu nutritiv solidificat cu agar, în eprubete de sticlă sau în containere din plastic termorezistent. Pentru menținerea sterilității, partea superioară a eprubetelor a fost acoperită cu folie de aluminiu, prevenind pătrunderea contaminanților din mediul ambiant. După inoculare, vasele cu material biologic au fost transferate în camera de cultură, unde a fost inițiat procesul de dezvoltare și multiplicare a vitroplantelor în condiții controlate de temperatură, lumină și umiditate.

Multiplicarea plantelor regenerate de viță-de-vie a fost realizată 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 dezvoltate de Soldatov V. [143]. 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. În fiecare container de cultură au fost introduse 130–150 g de substrat „Biona-311”, iar multiplicarea a fost realizată prin inocularea a câte 3–4 microbutași, cu o lungime de 0,7–1,0 cm. Pe fiecare microbutaș era prezent cel puțin un mugure axilar viabil. Umezirea substratului a fost efectuată cu apă distilată sterilizată, pentru a menține un nivel constant de umiditate.

Cultivarea plantelor de viță-de-vie în condiții *in vitro* a fost realizată într-o cameră de cultură special amenajată, pe o durată de 5–7 săptămâni. Materialul biologic a fost amplasat în containere și eprubete, dispuse pe rafturi organizate pe trei niveluri. Suprafața totală utilă a rafturilor permitea plasarea a aproximativ 1400 de containere, cu un număr estimativ de 4500–5000 de plante cultivate simultan. Temperatura în camera culturală a fost menținută constant, prin

intermediul unui sistem de control automatizat, în intervalul de 25–26 °C, pe tot parcursul anului. Iluminarea a fost asigurată cu lămpi LED, cu o intensitate luminoasă de 5000–6000 lux și un regim fotoperiodic de 16 ore de lumină pe zi.

După cultura *in vitro* plantele regenerate de viță-de-vie au fost extrase din vasele de cultură și transplantate în casete din plastic, cu 32 sau 54 de celule, umplute cu substrat de turbă sterilizat. Transplantarea a fost efectuată manual, cu atenție pentru a preveni lezarea sistemului radicular și a părților vegetative. Casetele cu vitroplante au fost transferate în camera de vegetație, amenajată special pentru susținerea dezvoltării plantelor în faza de adaptare la condițiile *ex vitro*. Camera a fost dotată cu rafturi dispuse pe trei niveluri. Regimul termic a fost controlat automat, temperatura fiind menținută constant la 26±1 °C pe toată durata perioadei de vegetație. Iluminarea a fost realizată cu ajutorul lămpilor LED, cu spectru complet (400–700 nm). Intensitatea luminoasă la nivelul plantelor a fost în limitele de 5 000–6 000 lux, iar regimul fotoperiodic a fost setat la 16 ore lumină / 8 ore întuneric.

2.5 Cultivarea materialului săditor de viță-de-vie pentru înființarea plantațiilor-mamă Prebază și Bază

Pentru constituirea plantațiilor-mamă de categorie biologică Prebază au fost utilizate plante obținute prin multiplicarea clonelor inițiale sănătoase de viță-de-vie, prin metoda microbutășirii *in vitro*. Vitroplantele obținute au fost transferate în casete individuale umplute cu substrat pe bază de turbă, cu scopul înrădăcinării și dezvoltării sistemului radicular. După obținerea unui sistem radicular bine dezvoltat și reluarea creșterii active a lăstarilor, plantele au fost transferate în seră pentru continuarea procesului de aclimatizare și creștere până la stadiul de vițe vegetante înrădăcinate. Plantarea materialului biologic în plantația-mamă de categoria biologică Prebază, s-a efectuat în a doua jumătate a lunii august, în condiții optime de umiditate și temperatură, asigurându-se prinderea rapidă și adaptarea plantelor în sol.

Plantația-mamă de categorie biologică Bază a fost înființată cu plante altoite. Coardele de altoi și portaltoi, destinate realizării altoirilor, au fost obținute din plantația-mamă de categorie biologică Prebază. În toamnă, după căderea frunzelor, coardele au fost recoltate și depozitate în spații frigorifice la temperatura de 1–4 °C și umiditatea relativă de 60–80%.

Înainte de altoire, butașii de altoi și portaltoi au fost supuși tratamentului cu apă fierbinte, la temperatura de 50 °C, timp de 45 de minute, în scopul eliminării posibilelor infecții virale și bacteriene. Operațiunile de altoire, stratificare și parafinare s-au efectuat conform tehnologiei standard aplicate în pepinierit, în complexul de altoire al FPC „VITIS COJUȘNA” SRL. Butașii altoiți au fost parafinați și stratificați în lăzi de lemn, pe un strat de rumeguș, în condiții controlate:

la temperatură de 26–28 °C și umiditate relativă a aerului de 60–85%, substrat permanent umed și bine aerisit, cu lumină redusă până la finalizarea procesului de calusare.

După stratificare, sortare și parafinare, butașii altoiți au fost plantați în casete umplute cu substrat de turbă, în condițiile controlate ale serei. Creșterea butașilor altoiți în sera Laboratorului de Virusologie și Control Fitosanitar al IP INCAAMV și utilizarea unui substrat liber de nematozi-vectori ai virusurilor au avut ca scop prevenirea infecțiilor în faza de școlire. Temperatura în sezonul de vară s-a menținut la valori maxime de 28–30 °C, prin aerisirea zilnică a serei și utilizarea ventilatoarelor pentru circulația aerului, prevenind supraîncălzirea și uscarea substratului. În perioadele de temperaturi extreme s-a aplicat și umbrirea parțială a serei cu plasă de umbrire, iar pereții și acoperișul serei au fost vopsiți cu var pentru reducerea radiației solare directe. Umiditatea relativă a aerului a fost menținută la 75–85% prin udări prin aspersiune, completată cu udări zilnice manuale prin furtun, asigurând umiditatea constantă a substratului.

Îngrijirea plantelor în seră a inclus udări regulate, tratamente fitosanitare preventive și fertilizări cu îngrășăminte minerale. Pe parcursul perioadei de creștere s-au aplicat trei fertilizări cu un complex de îngrășăminte hidrosolubile NPK + microelemente (20:20:20).

Tratamente fitosanitare: pentru prevenirea bolilor criptogamice (mucegai cenușiu – *Botrytis cinerea*, mană – *Plasmopara viticola*, făinare – *Uncinula necator*), s-au aplicat fungicide de contact și sistemice, la intervale de 10–14 zile, ajustate în funcție de condițiile climatice și presiunea de infecție.

Plantarea materialului vegetant în plantația-mamă Bază s-a efectuat în a doua jumătate a lunii august, utilizând butași vegetanți înrădăcinați bine dezvoltați, cu un sistem radicular format și lăstari maturați la nivelul a 3–5 muguri. În următoarele două luni, plantele s-au înrădăcinat complet în sol, iar primăvara, odată cu apariția condițiilor favorabile, au reluat creșterea activă.

2.6 Particularitățile terenului destinat înființării plantațiilor-mamă de categorie biologică Prebază și Bază

Terenul destinat înființării plantațiilor-mamă Prebază și Bază a fost alocat Institutului Național de Cercetare în Agricultură și Medicină Veterinară și este amplasat pe teritoriul orașului Codru, municipiul Chișinău, la o distanță de aproximativ 7 km de centrul capitalei. Suprafața este situată în perimetrul administrativ al Primăriei orașului Codru și, la momentul proiectării, a fost utilizată ca teren arabil. Relieful prezintă o pantă cu expunere estică și sud-estică, cu o înclinație de circa 0,5°, iar altitudinea față de nivelul mării variază între 165–185 m.

Condiții agroclimatice: Zona se încadrează în raionul agroclimateric II al Republicii Moldova, fiind caracterizată printr-un climat favorabil înființării plantațiilor viticole.

Temperatura medie anuală este de +9,2 °C, cu minime absolut de –21,0…–22,2 °C și maxime de +21,0…+21,8 °C în luna cea mai caldă. Durata perioadei fără îngheț constituie în medie 174–189 zile, cu 177–182 zile având temperaturi medii zilnice mai mari de +10 °C. Suma temperaturilor active se situează între 3000–3250 °C. Cantitatea totală de precipitații înregistrată anual atinge 445 mm, dintre care 100 mm cad în perioada toamnă–iarnă (noiembrie–martie), iar 345 mm în perioada primăvară–vară (aprilie–octombrie). Coeficientul hidrotermic variază între 1,1 și 0,8, ceea ce indică o relativă echilibrare a resurselor de căldură și umiditate. Data primului îngheț de toamnă este, de regulă, în intervalul 19–23 septembrie, iar ultimul îngheț de primăvară survine între 16–19 mai. Aceste caracteristici confirmă oportunitatea și pretabilitatea terenului pentru obținerea materialului săditor viticol sănătos de categoria Prebază și Bază.

Condiții pedologice. Investigațiile pedologice au fost realizate conform Instrucțiunii privind investigarea, cartografierea și alegerea solurilor pe sectoarele de teren preconizate pentru înființarea plantațiilor multianuale în Republica Moldova (Chișinău, 1971), completată de prevederile Hotărârii Guvernului RM nr. 24 din 11.01.1995 [68]. În urma cercetărilor de câmp, a analizelor de laborator și a prelucrărilor de birou, s-au identificat cernoziomuri levigate, moderat erodate, cu textură luto-argiloasă și lutoasă.

6. Cernoziomurile levigate erodate moderat luto-argiloase prezintă un conținut de humus de 2,4–3,6% în stratul arabil, o reacție neutră (pH 6,7–6,9), cu textură luto-argiloasă (51–54% argilă fizică). Rezervele de humus în stratul 0–100 cm constituie 169–175 t/ha. Nivelul de asigurare cu fosfor mobil este redus, iar cel cu potasiu ridicat.
7. Cernoziomurile levigate erodate moderat lutoase se caracterizează printr-un conținut de humus de 1,9–2,1% în stratul arabil, reacție neutră până la slab alcalină (pH 6,3–7,8) și textură lutoasă (42–43% argilă fizică). Rezervele de humus constituie circa 143 t/ha. Nivelul de asigurare cu fosfor mobil este scăzut, iar cel cu potasiu ridicat.

Înființarea plantațiilor. Pentru asigurarea continuității bazei biologice și a diversității sortimentale, înființarea plantațiilor-mamă a fost realizată etapizat, prin extinderea anuală a suprafețelor. Această strategie a permis adaptarea treptată a materialului biologic la condițiile pedoclimatice locale și menținerea uniformității lucrărilor tehnologice. În plantațiile de altoi au fost introduse treptat soiuri pentru masă și vin, pe portaltoi de tip Berlandieri × Riparia SO4 sau pe rădăcini proprii, cu conducere în cordon bilateral orizontal și dirijarea verticală a lăstarilor.

Pentru plantațiile de portaltoi au fost utilizate soiurile Riparia × Rupestris 101-14, Berlandieri × Riparia Kober 5BB și Berlandieri × Riparia SO4, plantate la distanțe de 3,20 × 1,75 m, cu o densitate de 1786 plante/ha. Forma de conducere aplicată a fost „fără tulpină cu brațe scurte”, adaptată pentru obținerea uniformă a butașilor portaltoi.

Schema de plantare: Plantațiile-mamă de altoi au fost înființate la distanțe 3,0 × 1,0 m și 3,0 × 1,40 m, rezultând o densitate de 2381–3333 plante/ha; plantațiile-mamă de portaltoi au fost înființate la distanța de 3,20 × 1,75 m, cu densitatea de 1786 plante/ha.

Prin această schemă s-a urmărit crearea unei structuri viticole moderne, conforme cerințelor pentru obținerea materialului viticol de categorie biologică Prebază și Bază, asigurând condițiile optime pentru menținerea sănătății biologice a plantelor.

Înființarea plantațiilor a fost realizată conform normativelor tehnice viticole în vigoare, cu respectarea prevederilor standardelor Uniunii Europene și a schemei de certificare EPPO PM 4/8(2), în corelare cu cerințele legislației naționale (HG nr. 418/2009) [50, 73].

2.7 Implementarea metodei PCR pentru identificarea tulpinilor patogene *A. vitis* responsabile de cancerul bacterian al viței-de-vie

Evaluarea metodei PCR pentru identificarea prezenței tulpinilor patogene de *Allorhizobium vitis* și *Agrobacterium tumefaciens* a fost aplicată pe elite și soiuri infectate de viță-de-vie: Basarabia, Apiren roz, Meleag, 11_2-13-66, IV-32-75 și BU-24-6-4. Probele biologice au fost colectate în perioada 2022–2024 din plantații experimentale și colecția ampelografică. Materialul de prelevare a fost reprezentat de vițe maturate de un an.

Izolarea ADN-ului genomic bacterian a fost realizată din culturi pure de bacterii din complexul *Agrobacterium*, izolate pe mediu semiselectiv Roy & Sasser [14], incubate timp de 7 zile la 27 °C. Coloniile caracteristice au fost recoltate cu ajutorul unei anse sterile și suspendate în 1 ml de apă ultra-purificată (H_2O mQ). Suspensiile bacteriene au fost transferate în eprubete de 1,5 ml și supuse lizării termice la 95 °C, timp de 10 minute, pentru eliberarea ADN-ului.

Testarea moleculară a izolaților a fost realizată prin metoda clasică PCR, utilizând un set de markeri ADN specifici pentru genele *pehA*, *virF* și *virD*, implicate în patogenitatea *A vitis*. Reacțiile PCR au fost efectuate cu ajutorul kitului comercial „PCR Agrobacterium vitis", care permite diferențierea între *Agrobacterium vitis*, *Agrobacterium tumefaciens* și tulpinile nepatogene. Protocolul de lucru a fost urmat conform instrucțiunilor furnizate de producătorul kitului, disponibile pe site-ul oficial Qualiplante [11].

Electroforeza produselor PCR. Pentru separarea și vizualizarea fragmentelor de ADN amplificate, produsele PCR au fost supuse electroforezei într-un gel de agaroză de 2%. Ca marker molecular, au fost utilizați trei standarde de greutate moleculară, cu dimensiuni între 100 și 10.000 perechi de baze (pb), în vederea estimării lungimii fragmentelor amplificate. Etapele PCR și ale electroforezei au fost efectuate în condiții controlate și utilizate echipamente calibrate pentru asigurarea acurateței determinarilor.

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

Sistemele de iluminat. 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), îmbogățit cu componente din spectrele roșu și albastru. Sursele au diferențiat prin temperatura de culoare (K), fluxul fotosintetic activ maxim (PPFDmax) și cantitatea totală de lumină fotosintetic activă recepționată zilnic de suprafață (PAR), exprimată prin indicatorul Daily Light Integral (DLImax). Sursa de lumină „alb-rece" (5950 ± 50 K), cu PPFDmax de 63 $\mu mol \cdot s^{-1} \cdot m^{-2}$ și DLImax de 4,05 $mol \cdot m^{-2} \cdot zi^{-1}$; Sursa de lumină „alb-cald" (3200 ± 50 K), cu PPFDmax de 30 $\mu mol \cdot s^{-1} \cdot m^{-2}$ și DLImax de 2,04 $mol \cdot m^{-2} \cdot zi^{-1}$; Sursa de lumină „Fito" (≤1700 K), cu PPFDmax de 25 $\mu mol \cdot s^{-1} \cdot m^{-2}$ și DLImax de 1,64 $mol \cdot m^{-2} \cdot zi^{-1}$.

Fiecare raft de cultură a fost iluminat cu trei bare LED, instalate la o distanță de 40 cm deasupra vitroplantelor, pentru a asigura o distribuție uniformă a fluxului luminos. Durata iluminării a fost de 16 ore pe zi, la o temperatură de 25 ± 2 °C și umiditate relativă de 70%. Utilizarea lămpilor LED a permis controlul precis al compoziției spectrale și al intensității luminoase, asigurând condiții experimentale stabile și uniforme, fără efectele termice nedorite ale surselor fluorescente convenționale.

Factori de evaluare a aplicării luminii. Luxmetria a fost efectuată cu ajutorul luxmetrului CEM DT-1308. Parametrii PPFD și DLI au fost înregistrați cu ajutorul PAR-metrului MQ-200X. 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). Toate eprubetele au fost divizate în 3 eșantioane a câte 30 fiecare și expuse sub trei sisteme de iluminat în camera de cultură, în 3 repetări analitice. Evaluarea lăstarilor a fost efectuată la 14 zile de cultură și la a 30-cea zi. În cadrul studiului, au fost analizați și evaluați urmatorii factori: numărul de plante care au dezvoltat rădăcini, formarea de calus, numărul de internoduri, numărul de frunze, înălțimea medie a plantelor, lungimea medie a rădăcinilor și suprafața medie a frunzei. Pentru evaluarea suprafeței limbului foliar al plantelor , a fost utilizată aplicația mobilă PetiolePro [124].

Analize statistice. Pentru prelucrarea statistică a datelor a fost utilizat software-ul Microsoft Office, metoda de analiză dispersională univariată, cu valoarea pragului de semnificație 0,05, sau 5%. Pentru evaluare calitativă a indicatorilor a fost utilizată scala Chaddock, unde valoarea 0,1–0,3 este considerată slabă; 0,3–0,5 moderată; 0,7–0,9 ridicată. Formulele utilizate pentru calculul indicatorilor statistici sunt prezentate în Anexa 9.

2.9 Evaluarea influenței fitohormonilor IAA și 2iP asupra dezvoltării viței-de-vie în cultura *in vitro*

În cadrul studiului, evaluarea influenței fitohormonilor asupra dezvoltării viței-de-vie în cultura *in vitro*, ca material biologic au fost utilizate porțiunile apicale ale lăstarilor tineri de viță-de-vie (*Vitis vinifera L.*), soiul Meleag, selectate din plante-mamă sănătoase, testate și confirmate ca fiind libere de viroze și cancer bacterian. Recoltarea explantelor a fost realizată în perioada de creștere activă, inoculate în eprubete de sticlă (Ø 40 mm, H 140 mm) cu mediu nutritiv agarizat.

Compoziția mediilor nutritive. Pentru testarea influenței fitohormonilor asupra regenerării, au fost pregătite patru variante de mediu nutritiv pe bază de Murashige & Skoog modificat (½ concentrație de săruri), după cum urmează: Varianta 1: 1,0 mg/L acid indolacetic (IAA); Varianta 2: 2,0 mg/L acid indolacetic (IAA); Varianta 3: 1,0 mg/L IAA + 0,3 mg/L 2-iP (6-(γ,γ-dimetilalilamino) purină); Varianta 4: 2,0 mg/L IAA + 0,6 mg/l 2-iP. Mediile de cultură au fost solidificate cu agar (4,75 g/L), iar drept sursă de carbon a fost utilizată zaharoza în concentrație de 18 g/L. Înainte de sterilizarea mediului în autoclav, pH-ul a fost ajustat la valoarea de 5,8–6,2. După inocularea explantelor, eprubetele au fost transferate în camera de cultură.

Evaluarea dezvoltării plantelor. La 30 de zile de cultură, plantele regenerate au fost analizate din punct de vedere morfologic și biometric. Cantitatea de biomasă acumulată în rădăcini și frunze a fost determinată prin cântărire, după uscare la temperatura camerei timp de 48 de ore, utilizând o balanță analitică de laborator de tip PS 2100 R2.

Analiza statistică. Rezultatele experimentale au fost prelucrate statistic utilizând testul ANOVA pentru determinarea semnificației diferențelor între variante și analiza corelațiilor Pearson [113, 121]. Formulele de calcul și datele experimentale utilizate pentru evaluarea influenței fitohormonilor asupra dezvoltării in vitro a viței-de-vie sunt prezentate în Anexa 10.

2.10 Selectarea mediilor nutritive pentru regenerare, multiplicare și aclimatizare

Pentru multiplicarea și adaptarea vitroplantelor, a fost utilizat substratul artificial pe bază de schimbători de ioni „Biona-311”, constituit din ionite sintetice (*KU*-2, *EDE*-10P) și ionite naturale (clinoptilolit), saturate cu macro- (K^+, Ca^{2+}, Mg^{2+}, NH_4^+, Fe^{3+}, NO_3^-, SO_4^{2-}, $H_2PO_4^-$) și microelemente (Mn^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}, MoO_4^{2-}, $B_4O_7^{2-}$, Co^{2+}, Na^+, Cl^-) esențiale pentru creșterea și dezvoltarea plantelor. Au fost analizate 25 de soiuri de viță-de-vie în procesul de adaptare de la cultura *in vitro* la condiții *ex vitro*, utilizând substratul „Biona-311”: Plăvaie, Chișmiș moldavschii, Crâmpoșie, Copceac, Apiren roz, Legenda, Moldova, Telti Curuc, BxR Kober 5 BB, RxR 101-14, BxR SO4, Busuiocă de Moldova, Busuiocă de Bohotin, Onițcanskii belîi, Maleque, Freedom, Chișmiş lucistîi, Sauvignon, Tudor, Feteasca regală, Negru de Căuşeni, Feteasca albă, Merlot.

2.11 Concluzii la capitolul 2

1. În cadrul cercetării, obiectele de studiu au inclus soiuri de viță-de-vie autohtone, soiuri de selecție nouă și soiuri europene, selectate în funcție de valoarea lor biologică, economică și de gradul de afectare fitosanitară.
2. S-a stabilit complexul de metode utilizate pentru obținerea și pregătirea materialului săditor viticol sănătos, care a cuprins etapele de selecție fitosanitară, prelevarea probelor, testarea prin metode imunologice și moleculare, aplicarea procedurilor de asanare, precum și multiplicarea in vitro și aclimatizarea *ex vitro*.
3. Au fost caracterizate condițiile agroclimatice și pedologice ale terenului destinat plantațiilor-mamă, confirmând pretabilitatea acestuia pentru producerea materialului viticol de categorie biologică Prebază și Bază.
4. Particularitățile de înființare a plantațiilor-mamă au vizat selecția soiurilor și a portaltoilor, schema de plantare, densitatea și forma de conducere a vițelor, toate fiind realizate în conformitate cu normele tehnice viticole, standardele Uniunii Europene și schema de certificare EPPO PM 4/8(2), în corelare cu legislația națională (HG nr. 418/2009).
5. S-au prezentat în detaliu mediile nutritive utilizate în diferite etape ale culturii in vitro: medii agarizate pentru inoculare și regenerare, precum și substratul artificial ionitic „Biona-311”, aplicat pentru multiplicarea și aclimatizarea vitroplantelor.
6. Procedurile de sterilizare a mediilor nutritive, a materialului biologic, a instrumentarului și a spațiilor de lucru au fost aplicate riguros, în conformitate cu cerințele aseptice, ceea ce a permis evitarea contaminării cu agenți patogeni.
7. Condițiile de cultură *in vitro* (temperatura, regimul de iluminare cu LED, fotoperioada și umiditatea) au fost optimizate în raport cu cerințele biologice ale soiurilor investigate, fapt ce a asigurat regenerarea și multiplicarea eficientă a plantelor.
8. Metodologia elaborată s-a demonstrat a fi eficientă, reproductibilă și flexibilă, constituind baza științifică și practică pentru producerea materialului viticol sănătos de categorie biologică Prebază și Bază, cu aplicabilitate directă în programele naționale de certificare și multiplicare, în concordanță cu cerințele cadrului normativ național și european.

3 OBȚINEREA CLONELOR ASANATE DE VIȚĂ-DE-VIE

Vița-de-vie este una dintre cele mai importante culturi horticole din Republica Moldova, având un rol semnificativ în economia națională datorită producției de struguri de masă, vinuri și alte produse vitivinicole. Pentru a asigura viabilitatea și productivitatea plantațiilor viticole, este esențial să se folosească material săditor de înaltă calitate, sănătos și liber de boli virale, fitoplasmatice și bacteriene. Aceste boli au un impact negativ nu doar asupra productivității viței-de-vie, ci și asupra calității strugurilor și a vinurilor obținute.

Plantele infectate prezintă simptome precum slăbirea vigorii, reducerea dimensiunii boabelor, colorarea neuniformă și, în cazuri grave, uscarea lăstarilor sau chiar pierderea întregii plante. Agenții patogeni pot persista în țesuturile infectate pe tot parcursul vieții plantei, ceea ce face ca măsurile de combatere să fie extrem de dificile și adesea ineficiente. Având în vedere că nu există metode chimice eficiente pentru combaterea bolilor virale și a cancerului bacterian la vița-de-vie, soluția optimă rămâne utilizarea materialului săditor liber de agenți patogeni. Procesul de selecție fitosanitară, combinat cu metode biotehnologice, precum metoda *in vitro*, reprezintă soluția optimă pentru a produce material săditor viticol de cea mai înaltă categorie biologică [50]. Totodată, aplicarea acestor tehnologii moderne contribuie la modernizarea bazei genetice a soiurilor cultivate și la sporirea competitivității producției viticole la nivel național.

Capitolul de față prezintă rezultatele evaluării stării fitosanitare a materialului săditor viticol din Republica Moldova, obținute în urma testărilor realizate în perioada 2018–2023. Analiza s-a axat pe determinarea incidenței agenților patogeni de etiologie virală și bacteriană, în scopul aprecierii nivelului actual de infecție a materialului destinat înmulțirii în pepinierele viticole. Sunt prezentate date privind gradul de infectare a materialului viticol cu virusurile GFLV, GFkV, GLRaV-1 și GLRaV-3, precum și cu agentul patogen al cancerului bacterian — *A. vitis*. Rezultatele au permis caracterizarea riscurilor fitosanitare asociate și identificarea candidaților în clone pentru selecția fitosanitară. În baza acestor rezultate au fost formulate recomandări practice privind selectarea materialului biologic de bază, care să corespundă cerințelor pentru înființarea plantațiilor-mamă de categorie superioară.

În continuare, sunt reflectate etapele-cheie aplicate în procesul de obținere a clonelor sănătoase: evidențierea candidaților în clone, testarea acestora, tratamentele de asanare prin termoterapie și multiplicarea *in vitro* a plantelor inițiale. La final, se descrie valorificarea materialului biologic prin înființarea plantațiilor-mamă de categorii biologice Prebază și Bază, și schema tehnologică integrată aplicabilă în condițiile Republicii Moldova pentru producerea materialului săditor certificat, liber de agenți patogeni și conform standardelor europene actuale.

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 de viță-de-vie. Evaluarea stării fitosanitare a materialului săditor viticol a fost realizată prin testarea la prezența infecțiilor virale și a bacteriei *A. vitis*. 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 vin, astfel încât să reflecte obiectiv starea fitosanitară a întregului lot. Pentru testare, au fost prelevate mostre de material vegetal în formă de vițe altoite și înrădăcinate de un an. Testarea prezenței virusurilor a fost efectuată prin metoda ELISA, utilizând kituri comerciale specifice pentru virusurile GFLV, GLRaV-1 și GLRaV-3 conform protocolului de la producător [129]. Analiza prezentată se axează pe unul dintre eșantioanele testate în perioada 2018–2023 și oferă informații despre rata de infecție a materialului săditor viticol din soiuri autohtone, selecție nouă și soiuri europene, pentru principalele virusuri care afectează vița-de-vie.

Datele obținute în urma testării probelor de material săditor viticol autohton sunt sistematizate în tabelul 3.1. Tabelul prezintă structura și frecvența infecțiilor virale în funcție de soi și combinația portaltoi–altoi, evidențiind particularitățile fitosanitare ale loturilor analizate.

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 la infecții virale /%			Total probe infectate/%
				GFLV	GLRV-1	GLRV-3	
1	Fetească Neagră/ BxR Kober 5BB	12000	10	4/40	3/30	2/20	9/90
2	Fetească Regală/ BxR Kober 5BB	9000	10	1/10	1/10	0	2/20
3	Fetească Regală/ BXR SO4	9400	10	5/50	4/40	2/20	11/100
4	Fetească Neagră/ BXR SO4	31000	30	0	0	0	0
5	Rară Neagră/ BxR Kober 5BB	29600	20	0	0	0	0
6	Fetească 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%

Analizând datele din tabelul 3.1, se observă că în cadrul studiului, a fost examinat un eșantion format din 118.400 de butași de viță-de-vie din soiuri autohtone, grupați în 6 loturi, fiecare cu un număr de butași cuprins între 9.000 și 27.400. În urma testării celor 105 probe, au fost

identificate 22 cu rezultate pozitive, ceea ce constituie o rată de infecție de 20,9%. La nivel de loturi, din cele 6 evaluate, infecții au fost depistate în loturile cu nr. 1, 2 și 3 cu o incidență variabilă între 20% și 100%, iar celelalte trei au fost confirmate ca fiind neinfectate. În loturile testate pozitiv s-au observat coinfecții: în unele cazuri cu două virusuri, de exemplu, în Fetească Regală/BxR Kober 5BB, iar în altele cu toate cele trei virusuri diagnosticate, cum ar fi Fetească Neagră/BxR Kober 5BB și Fetească Regală/BxR SO4. Virusul GFLV a fost cel mai frecvent identificat în materialul săditor viticol din soiuri autohtone (9,5%), urmat de GLRV-1 (7,6%), iar GLRV-3 a fost cel mai rar diagnosticat, cu o rată de 3,8%.

Din datele obținute reiese, că nu poate fi stabilită o corelație clară între combinația soiului cu portaltoiul și rata de infecție, deoarece unele loturi au prezentat o incidență foarte ridicată a infecțiilor virale (de exemplu, 90% în cazul Fetească Neagră/BxR Kober 5BB, lotul nr. 1), în timp ce altele, cu aceeași combinație, nu au înregistrat infecții (de exemplu, Fetească Neagră/BxR Kober 5BB, lotul nr. 6). Această situație sugerează că, pe lângă influența caracteristicilor genetice ale soiului și portaltoiului, un rol determinant în apariția infecțiilor virale îl are calitatea fitosanitară a materialului de înmulțire utilizat.

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/ B x R 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%

Evaluând rezultatele prezentate în tabelul 3.2, se remarcă că eșantionul din soiuri de selecție nouă, compus din 62.100 de butași, este compus în 7 loturi, cu cantități variind de la 5.000

la 23.400 de butași. Din cei 75 de butași testați 24 de probe au fost diagnosticate pozitiv la virusurile testate, ceea ce înseamnă o rată medie de infecție de 32%. Ratele de infecție variază semnificativ între loturi: de exemplu, lotul Viorica/BxR SO4 cl. 5 a prezentat o infecție de 50%, iar loturile Riton/BxR SO4 și Codreanca/BxR Kober 5BB au înregistrat rate de 10%.

Din datele prezentate în tabelul 3.2 se observă că virusurile GFLV, GLRV-1 și GLRV-3 au fost identificate în proporții similare, de câte 10,7% din probe. Aceste rezultate sugerează că, în materialul săditor din soiurile de selecție nouă, GLRaV-1 și GLRaV-3 se răspândesc mai frecvent decât în cazul soiurilor autohtone, unde rata de depistare a fost de 7,6 și 3,8% respectiv. Virusul GFLV a fost depistat în proporții aproape similare în ambele categorii de soiuri, fiind prezent în 9,5% în probele din soiuri autohtone și 10,7% în probele din soiuri de selecție nouă.

În cele 7 loturi analizate, la patru din ele a fost înregistrată infecția cu un singur virus, precum sunt loturile Moldova/BxR Kober 5BB din lotul cu 5000 buc, Riton/BxR SO4, Codreanca/BxR Kober 5BB și Viorica/BxR SO4, la care au fost identificate virusurile GLRaV-1 și GLRaV-3. Totodată, la 3 dintre loturile testate s-au observat coinfecții, adică prezența simultană a mai multor virusuri. De exemplu, în lotul Viorica/BxR SO4 cl.5 au fost depistate toate cele trei virusuri testate, iar în loturile Moldova/B x R Kober 5BB și Bianca/BXR SO4 au fost detectate virusurile GFLV și GLRaV-3. Rezultatele obținute 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 (tabelul 3.3). Analizând datele obținute se remarcă faptul că ratele de infecție la soiurile europene, variază semnificativ între loturi. De exemplu, lotul Saperavi/BxR SO4 a prezentat o infecție de 60%, indicând o prezență ridicată a virusurilor, pe când loturile precum Cabernet-Sauvignon/BxR Kober 5BB, Merlot/BxR SO4 sau Cardinal/R x R 101-14 nu au înregistrat nicio infecție. De asemenea, 6 loturi au fost infectate cu mai multe virusuri concomitent. Loturile Saperavi/BXR SO4, Muscat Ottonel/ BxR Kober 5BB și Aligote/BXR Kober 5BB au fost testate pozitiv pentru virusurile GFLV, GLRV-1 și GLRV-3. Iar loturile Sauvignon/BXR SO4, Pinot Gris/BXR SO4 și Sauvignon/BxR Kober 5BB au fost depistate două virusuri simultan, cel mai des fiind asocierea GLRV-1 și GLRV-3. Loturile infectate cu un singur virus au fost: Muscat de Hamburg/B x R Kober 5BB și Saperavi/BXR SO4.

Comparativ, analiza datelor din tabelele 3.1–3.3 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. Aceste diferențe pot fi explicate prin particularitățile de întreținere a plantațiilor și sursa materialului biologic.

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 la infecții virale /%			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%

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, GLRV-1 și GLRV-3 au fost identificate la cel mai înalt nivel, în proporții egale, de câte 10,66% fiecare. Iar soiurile autohtone din Republica Moldova 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 și vinificatorilor pentru valorificarea resurselor genetice locale. În trecut, aceste soiuri nu au fost multiplicate intensiv, ceea ce a limitat răspândirea infecțiilor virale în materialul săditor provenit din acestea. 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 compus din 26 de loturi, în cantitate de 383350 de butași de viță-de-vie, din care 370 au fost testați, iar 78 s-au dovedit a fi infectați, ceea ce reprezintă o rată de infecție de 21%. 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%. 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 (tabelele 3.1–3.3). Distribuția loturilor în funcție de gradul de infecție este prezentată în figura 3.14.

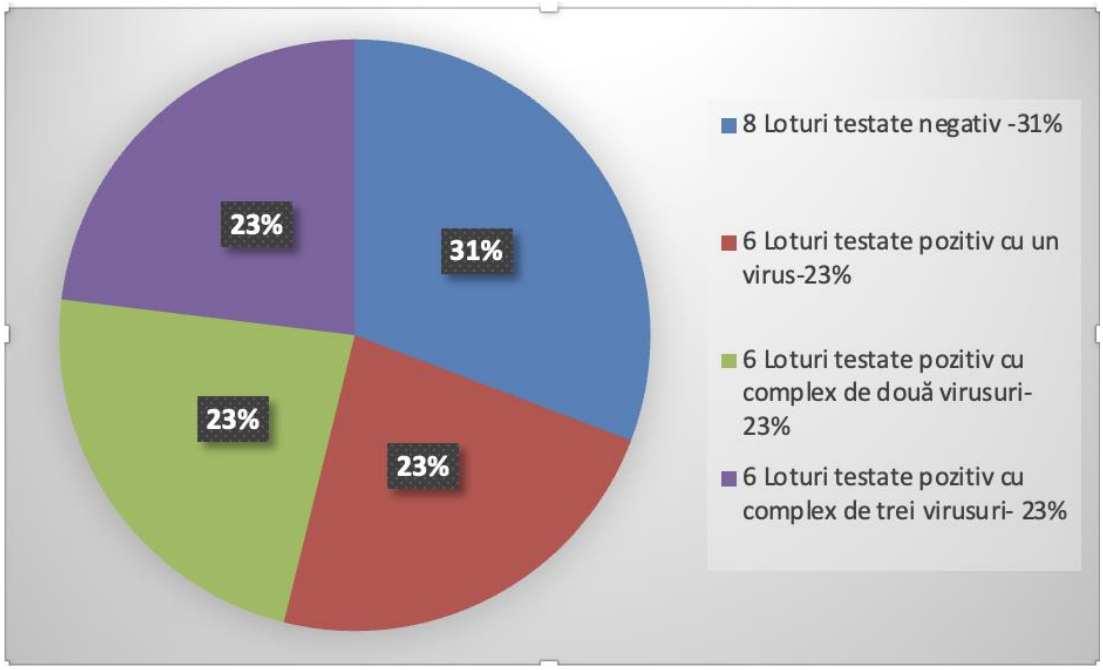

Fig. 3.1 Distribuția infecțiilor virale în materialul săditor viticol din pepiniere în Republica Moldova (2018-2023)

Din figura 3.1 se observă că, din cele 26 de loturi testate, în 8 loturi nu au fost identificate infecții virale, ceea ce constituie 31% din total. Acest fapt demonstrează că în plantațiile viticole din Republica Moldova există butuci sănătoși, liberi de infecții virale, care pot constitui surse valoroase pentru selecția și multiplicarea materialului săditor cu statut fitosanitar înalt. În schimb, 18 loturi, s-au 69%, au fost infectate cu unul sau mai multe dintre virusurile testate. Astfel, 6 loturi (23%) au fost infectate cu un singur virus. Din acestea, la 3 loturi – și anume: Moldova/BxR Kober 5BB, Viorica/BxR SO4 și Saperavi/BxR SO4 – a fost depistat virusul GLRaV-1, iar la alte 3 loturi

– Riton/BxR SO4, Codreanca/BxR Kober 5BB și Muscat de Hamburg/BxR Kober5BB – infecția s-a manifestat prin prezența virusului GLRaV-3. Conform analizelor efectuate, au fost identificate 6 loturi cu infecții mixte, adică plante care au prezentat infecții cu două virusuri simultan (23%), dintre care 3 loturi – Moldova/BxR Kober 5BB, Bianca/BxR SO4 și Pinot Gris/BXR SO4 – au fost infectate cu virusurile GFLV și GLRV-3. Un alt aspect important constă în faptul, că 6 loturi – Feteasca Neagră/BxR Kober 5BB, Feteasca Regală/BxR SO4, Viorica/BxR SO4, Saperavi/BXR SO4, Muscat Ottonel/BxR Kober 5BB, Aligote/BXR Kober 5BB – din 26 studiate, ce constituie 23%, au fost infectate cu toate cele trei virusuri. Acest rezultat indică la o coinfecție între virusuri, care poate agrava impactul bolilor virale asupra sănătății viței-de-vie.

În baza analizelor efectuate, se poate concluziona, că starea fitosanitară a materialului săditor viticol cultivat în Republica Moldova indică la un nivel înalt de infecții virale, cu o rată de infecție de 0 până la 100% din probele testate. Fiecare al cincilea butaș de viță-de-vie este purtător de una sau mai multe infecții virale. Rezultatele obținute subliniază necesitatea elaborării tehnologiei de obținere a clonelor sănătoase de viță-de-vie și a înființării plantațiilor viticole cu material săditor sănătos.

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

Cancerul bacterian, cunoscut științific ca fiind cauzat de *Allorhizobium vitis* (sin. *Agrobacterium vitis, Rhizobium vitis*), reprezintă una dintre cele mai grave boli bacteriene ale viței-de-vie. În continuare, această specie va fi menționată sub forma prescurtată *A. vitis*. Această afecțiune se regăsește în toate regiunile viticole din țară și inactivarea acestei boli bacteriene are o importanță semnificativă din perspectivă economică pentru industria vitivinicolă a Republicii Moldova. Este important de menționat că, într-adevăr, cancerul bacterian al viței-de-vie se manifestă în special în urma unor condiții meteorologice specifice, cum ar fi temperaturile scăzute în timpul înghețurilor și grindinei, care pot provoca răni la butașii de viță-de-vie afectați. Schimbările climatice observate în ultimele decenii au dus la o reducere a frecvenței înghețurilor în Republica Moldova, rezultând în absența manifestărilor evidente ale bolii în aceste condiții. Cu toate acestea, boala rămâne prezentă într-o formă latentă, ceea ce înseamnă, că agenții patogeni pot persista în plantele de viță-de-vie fără a provoca simptome evidente. Aceasta poate reprezenta o amenințare latentă și poate apărea în mod activ atunci când condițiile devin favorabile. În acest context, monitorizarea permanentă a stării fitosanitare a materialului viticol reprezintă o etapă importantă pentru excluderea plantelor infectate din circuitul de multiplicare. În cadrul LVCFCH, a fost testat materialul săditor provenit din gospodăriile viticole la prezența *A. vitis* (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 *A. vitis*	
				bucăți	%
1	Fetească Neagră/ BxR Kober 5BB	12000	10	3	30
2	Fetească Regală/ BxR Kober 5BB	9000	10	2	20
3	Fetească Regală/ BXR SO4	9400	10	0	0
4	Fetească Neagră/ BXR SO4	31000	30	9	30
5	Rară Neagră/ BxR Kober 5BB	29600	20	12	60
6	Fetească Neagră/ BxR Kober 5BB	27400	25	15	60
Total:		118400	105	41	39%

Analiza datelor din tabelul 3.4 evidențiază că, din totalul celor 105 butași testați din materialul săditor autohton, 41 au fost testați pozitiv la prezența bacteriei *A. vitis*, ceea ce corespunde unei rate medii de infecție de 39%. Ratele infecției variază considerabil între loturi, de la 0% până la 60%. De exemplu, loturile Fetească Neagră/BxR Kober 5BB și Rară Neagră/BxR Kober 5BB au înregistrat cele mai ridicate rate (60%), în timp ce lotul Fetească Regală/BXR SO4 nu a prezentat rezultate pozitive pentru bacteria *A.vitis*.

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 *A. vitis*	
				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%

Conform datelor din tabelul 3.5, au fost supuse testării 75 probe, dintre care 24 s-au dovedit infectate, ceea ce indică o rată de infecție de 32%. La soiul Moldova rezultatele au fost diferite:

un lot altoit pe BxR Kober 5BB nu a prezentat infecții, în timp ce un alt lot, pe același portaltoi, a înregistrat o incidență de 20%. Situație similară a fost constatată și la soiul Viorica, unde lotul altoit pe BxR SO4 cl.5 s-a dovedit a fi lipsit de infecții, pe când în lotul Viorica/BxR SO4 a fost înregistrată o incidență de 30%. Aceste rezultate indică o variabilitate semnificativă a stării fitosanitare chiar și în cadrul aceluiași soi și tip de altoire, sugerând influența calității materialului de înmulțire și a condițiilor de producere.

Lotul Riton/BxR SO4 a înregistrat cea mai mare infecție, de 40%, iar loturile Bianca/BxR SO4 și Viorica/BxR SO4 au avut rate de 30%. Probele din soiul Codreanca/BxR Kober 5BB nu a prezentat infecții. Comparativ, în materialul săditor autohton, rata infecției cu *A. vitis* a fost de 39%, ceea ce evidențiază că infecțiile în materialul de selecție nouă (32%) sunt mai reduse decât în cel autohton, reflectând o îmbunătățire a calității fitosanitare a materialului biologic utilizat.

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%. Examinând datele din tabelul 3.6, se observă că, din cele 13 loturi testate, doar lotul Pinot Gris/BxR SO4 s-a dovedit a fi liber de cancer bacterian, iar în celelalte loturi rata de infectare a variat între 10% și 50%. Loturile cu infecție între 10%–20% au fost identificate în 8 loturi din soiurile de selecție nouă. Dintre acestea, 4 loturi – Muscat Ottonel/BxR Kober 5BB, Cabernet-Sauvignon/BxR Kober 5BB, Merlot/BxR SO4 și Aligote/BxR Kober 5BB – au înregistrat o rată de 10%, iar alte 4 loturi – Saperavi/BxR SO4, Sauvignon/BxR SO4, Sauvignon/BxR Kober 5BB și Cabernet Sauvignon/BxR SO4 – au prezentat o rată de 20%. Două loturi, Muscat de Hamburg/ BxR Kober 5BB și Saperavi/BxR SO4, au avut o rată medie de infectare de 30%. Cel mai remarcabil este lotul Merlot/BxR SO4, care s-a distins printr-o rată de infecție de 50%, urmat de lotul Cardinal/BxR 101-14, cu 40% infecție.

Pe baza rezultatelor din tabelul 3.6 putem concluziona, că materialul săditor de viță-de-vie din soiuri europene este cel mai puțin infectat (21,6%), comparativ cu cel din soiurile autohtone și selecția nouă cu rata de infecție de 39% și respectiv 32%. Această constatare poate fi explicată prin faptul că, în statele europene, controlul fitosanitar al materialului săditor este realizat mai riguros, în conformitate cu regulamentele privind certificarea materialului de înmulțire, precum și prin frecvența mai mare a reînnoirii plantațiilor, care contribuie la reducerea riscului acumulării infecțiilor bacteriene în timp. otodată, utilizarea materialului certificat și a tehnologiilor standardizate de altoire și înmulțire asigură o trasabilitate clară a originii biologice, sporind astfel nivelul de siguranță fitosanitară al materialului săditor produs.

Tabelul 3.6 Evaluarea *A. vitis* 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.)	Total probe infectate cu *A. vitis*	
				bucăți	%
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%

Analiza rezultatelor prezentate în tabelele 3.4–3.6 indică faptul, că în pepinierele viticole din Republica Moldova răspândirea cancerului bacterian în materialul săditor de viță-de-vie reprezintă o problemă fitosanitară majoră. Din cele 26 de loturi testate doar 19,2% (5 loturi) au fost complet lipsite de infecție cu *A. vitis*, totodată, 57,7% (15 loturi) au prezentat un grad de infectare până la 20%, iar 38,5% (10 loturi) au înregistrat rate de infectare de peste 20%. Aceste loturi prezintă un risc ridicat pentru sănătatea și productivitatea plantațiilor și nu sunt recomandate pentru înființarea de noi plantații viticole.

Analiza comparativă a loturilor testate pentru prezența virusurilor și a cancerului bacterian a evidențiat că, în numeroase cazuri, loturile considerate libere de una dintre infecții au fost totuși afectate de cealaltă. Astfel, loturile fără infecție cu cancer bacterian, precum Moldova/BxR Kober 5BB, Viorica/BxR SO4, Feteasca Regală/BxR SO4 ș.a., au fost testate pozitiv pentru diferite virusuri. Invers, loturile care au fost testate negativ la prezența virusurilor viței-de-vie s-au dovedit

infectate cu bacteria responsabilă de cancerul bacterian, cum este cazul soiurilor Cabernet-Sauvignon/BxR Kober 5BB și Merlot/BxR SO4.

Conform datelor din tabelele 3.1–3.6 concluzionăm că materialul săditor viticol crescut în pepinierele din Republica Moldova este infectat cu diverse boli virale și de cancer bacterian. Printre bolile virale a fost depistat virusul scurt-nodării (GFLV), virusul răsucirii frunzelor de tip 1 (GLRV-1) și virusul răsucirii frunzelor de tip 3 (GLRV-3). Aceste infecții virale pot fi prezente individual sau în combinații de doi ori trei virusuri simultan. 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% (de exemplu, 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%, în funcție de soi și condițiile de multiplicare. Prezența acestor boli 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, prin aplicarea metodelor biotehnologice moderne, pentru a asigura tranziția sectorului pepinierist din Republica Moldova către producerea unui material săditor de categoria certificat.

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

În condițiile actuale, caracterizate printr-o răspândire extinsă a agenților patogeni de etiologie virotică, fitoplasmatică și bacteriană, care afectează grav starea fitosanitară a plantațiilor de viță-de-vie, reducând semnificativ producția și calitatea recoltei, aplicarea unei selecții fitosanitare riguroase asupra plantelor inițiale reprezintă cea mai eficientă strategie de prevenire și control al bolilor. Obiectivul principal al acestei metode constă în identificarea și multiplicarea clonelor sănătoase de viță-de-vie, cu potențial productiv și calitativ ridicat, libere de infecții virale, fitoplasmatice și bacteriene, destinate introducerii rapide în plantațiile viticole de producție. Etapa de selecție fitosanitară, realizată în conformitate cu cerințele standardelor internaționale, constituie baza procesului de creare a plantațiilor-mamă de categorie biologică Prebază și Bază.

Obținerea materialului biologic sănătos prin selecția fitosanitară reprezintă un proces de lungă durată, care include o serie de etape interconectate, desfășurate în următoarea ordine:

1. Evidențierea candidaților în clone prin metoda de observare vizuală;
2. Testarea acestora la prezența infecțiilor latente cu boli virale și cancer bacterian prin metode serologice și moleculare;
3. Multiplicarea accelerată a clonelor de soi sănătoase prin cultură *in vitro*;

4. Înființarea plantației de preînmulțire (categoria biologică Prebază);
5. Producerea butașilor altoiți utilizând material viticol din plantația-mamă Prebază;
6. Înființarea plantației-mamă de categoria biologică Bază.

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

Evidențierea candidaților în clone de viță-de-vie prin metoda de observare vizuală a fost efectuată în colaborare cu savanții amelioratori a Institutului, în plantațiile de selecție ale IP INCAAMV și cele industriale din Republica Moldova cu vârsta de peste 20 de ani, în perioada anilor 2018–2023. Metoda de observare vizuală se bazează pe capacitatea multor boli virale, fitoplasmatice și a cancerului bacterian de a provoca la butucii de viță-de-vie afectați simptome specifice exterioare caracteristice numai lor. Prin intermediul unei analize vizuale, este posibilă identificarea și realizarea unui diagnostic preliminar pentru diverse afecțiuni a plantelor afectate. În cadrul metodei de observare vizuală, este imperativ cunoașterea deplină a soiului, pentru a recunoaște simptomele cauzate de stresele abiotice (grindină, îngheț, soare, arsuri, tulburări de nutriție, doze chimice în exces) de cele biotice (boli, dăunători).

La momentul actual, în plantațiile de viță-de-vie din Republica Moldova au fost identificate 11 boli de etiologie virală, o boală fitoplasmatică (*Bois noir*) și cancerul bacterian (*A. vitis*). Caracteristica principală a unor boli virale, precum mozaicul galben al viței-de-vie (GYMV), mozaicul nervurian al viței-de-vie (GVMV) și scurt-nodarea (GFLV), este apariția simptomelor sub formă de diverse tipuri de mozaic pe frunzele butucilor infectați (fig. 3.2). La soiurile de struguri roșii, frunzele se înroșesc, cu excepția unor fâșii înguste de-a lungul nervurilor, în timp ce la soiurile de struguri albi, frunzele prezintă clorozã.

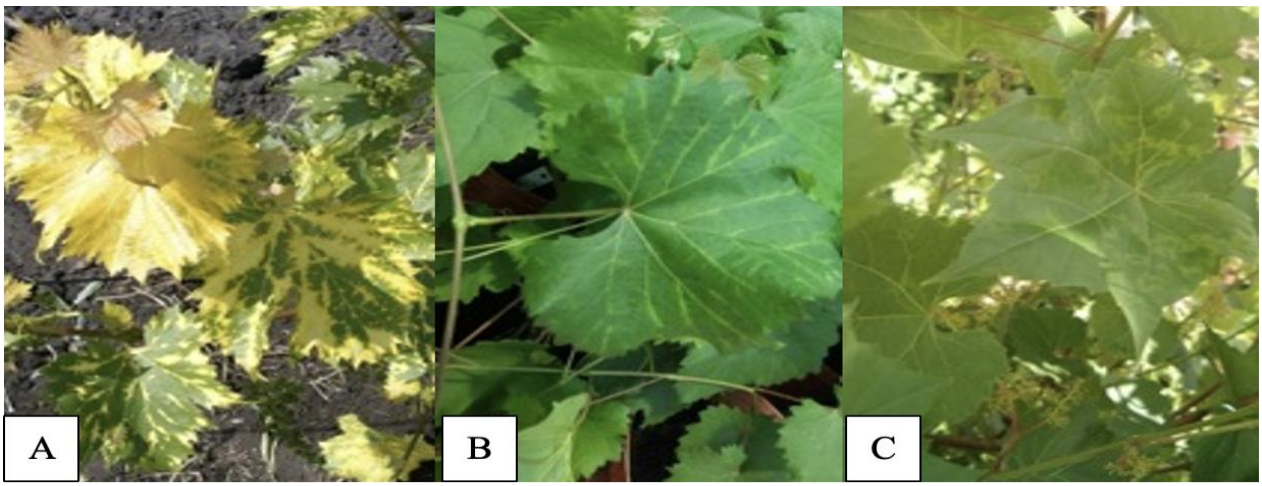

Fig. 3.2 Simptome foliare ale unor viroze ale viței-de-vie. A – mozaicul galben al viței-de-vie (GYMV); **B** – mozaicul nervurian al viței-de-vie (GVMV); **C** – scurt-nodarea (GFLV).

Începând cu sfârșitul lunii august și continuând în lunile septembrie și octombrie,

simptomele bolii fitoplasmatice a viței-de-vie, cunoscută sub denumirea de înnegrirea lemnului (*Bois noir*), devin bine pronunțate. La butucii afectați, frunzele soiurilor de struguri roșii se înroșesc complet, în timp ce frunzele soiurilor de struguri albi capătă o nuanță galben-aurie, devin rigide la atingere și se răsucesc cu marginile în jos. Un semn diagnostic important al infecției fitoplasmatice al viței-de-vie este faptul, că lăstarii afectați rămân verzi și nu se maturizează până la sfârșitul perioadei de vegetație. Din august până în septembrie, aceste simptome pot fi observate clar în plantațiile viticole din Republica Moldova, ce permite identificarea și monitorizarea bolii.

Din luna august până în luna septembrie, pe plantațiile de viță-de-vie din Republica Moldova poate fi observată boala virală – Conturarea nervurilor viței-de-vie (*Grapevine vein banding virus*, GVBV*).* La butucii de viță-de-vie infectați cu GVBV, o tulpină a virusului scurt-nodării, se observă inițial pete crom-galbene de-a lungul nervurilor principale ale frunzelor, care evoluează treptat în dungi galbene (fig. 3.3 A, B).

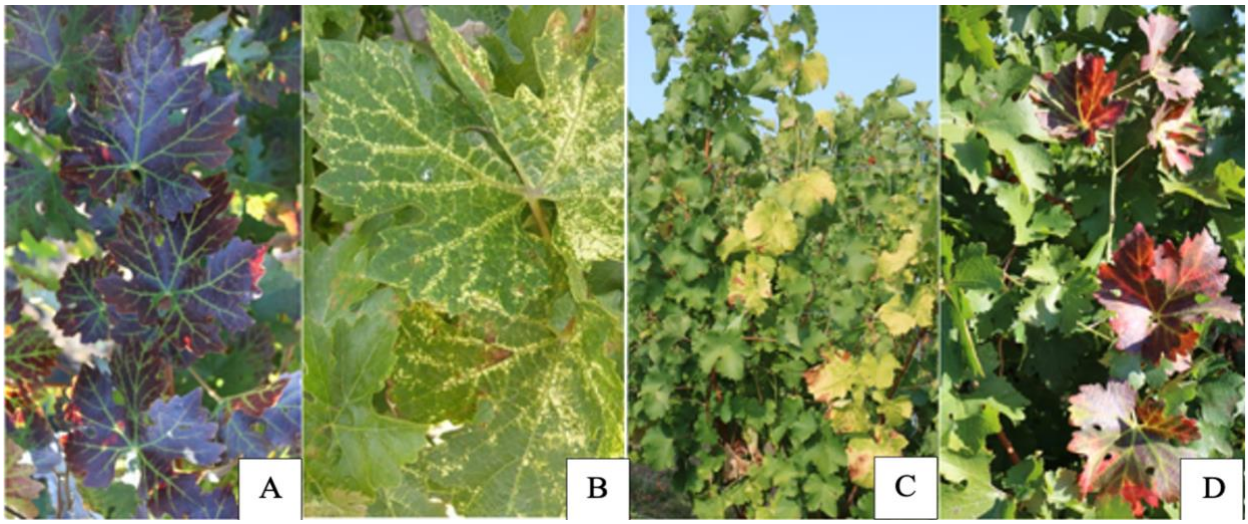

Fig. 3.3 Simptome foliare ale unor viroze și fitoplasmose ale viței-de-vie. A – răsucirea frunzelor la soiuri roșii (Leafroll); **B** – conturarea nervurilor viței-de-vie (GVBV); **C** – boala înnegrirea lemnului (BN) la soiuri albe; **D** – boala înnegrirea lemnului (BN) la soiuri roșii.

În cazurile de infecție severă, dungi galbene apar și de-a lungul nervurilor secundare, fiind mai pronunțate pe frunzele bazale. Deoarece GVBV este o tulpină a virusului scurt-nodării, pe lăstarii viței-de-vie pot fi observate și alte simptome specifice acestei boli: noduri duble, bifurcarea lăstarilor, frunze deformate și lăstari cu aspect de panglică.

Simptomele bolilor dăunătoare, precum scurt-nodarea, răsucirea frunzelor și *Bois noir*, sunt bine vizibile începând de la sfârșitul lunii august și până în luna octombrie (fig. 3.3 C, D). În această perioadă, plantele își manifestă cel mai clar semnele fiziologice de afectare, ceea ce permite o identificare mai precisă și obiectivă a butucilor infectați. În legătură cu aceasta, a doua inspecție pentru evidențierea candidaților în clone sănătoase a fost realizată în această perioadă.

În timpul inspecției vizuale a plantațiilor, atât în prima, cât și în a doua perioadă, au fost eliminați butucii care prezintau simptome de mozaic nervurian al viței-de-vie, scurt-nodare, mozaic galben al viței-de-vie, răsucirea frunzelor și înnegrirea lemnului. La finalul perioadei de vegetație, toamna, după căderea frunzelor, în timpul recoltării lăstarilor pentru a fi testați la prezența agenților infecțioși, butașii au fost atent inspectați pentru a detecta prezența simptomelor de strierea lemnului, scurt-nodare și cancer bacterian (fig. 3.4).

Fig. 3.4 Simptomele de cancer bacterian la vița-de-vie

În studiu au fost incluși doar butuci care corespundeau caracteristicilor ampelografice specifice soiului, au fost aparent sănătoase, s-au caracterizat prin producție înaltă și calități valoroase ale strugurilor. Au fost identificați și marcați un total de 109 butuci de viță-de-vie proveniți dintr-o varietate mare de soiuri, inclusiv 12 soiuri autohtone, 11 soiuri de selecție nouă, 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	Moldova, Luminița, Muscat de Ialoveni, Basarabia, Codrinschii, Meleag, Tudor, Apiren roz, Onițcanschii belâi, Legenda și Chișmiș lucistâi
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 portaltoi	BxR Kober 5 BB, BxR SO4, RxR 101-14, Maleque

La finalul perioadei de vegetație a viței-de-vie, după căderea frunzelor, au fost prelevate coarde anuale mature de pe butucii marcați, iar plantele care nu prezentau simptome de boală au fost transferate spre etapa de testare. Materialul biologic selectat a fost ulterior supus analizelor de laborator pentru confirmarea stării fitosanitare și identificarea plantelor lipsite de infecții de etiologie virotică, fitoplasmatică și cancer bacterian. Această etapă a permis formarea unui lot de plante cu potențial ridicat pentru selecția fitosanitară ulterioară.

3.3.2. Diagnosticarea candidaților în clone de viță-de-vie

Pentru evaluarea stării sanitare a candidaților în clone selectate, au fost colectate coarde de la butucii marcați și testate la prezența agenților patogeni, inclusiv bacterieni (*A. vitis*) și virali (GFLV, GLRaV-1, GLRaV-3, GFkV, GVA). Detectarea infecțiilor virale latente a fost efectuată utilizând metoda ELISA, iar identificarea infecțiilor latente cu cancer bacterian a fost realizată prin metoda microbiologică.

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 provinite 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. Rezultatele obținute în urma testelor serologice, care includ identificarea candidaților liberi de agenți patogeni și a celor infectați, sunt prezentate în tabelele 3.8–3.9.

Tabelul 3.8 Rezultatele testării candidaților în clone din soiuri de struguri de selecție nouă cu bobul alb la prezența infecțiilor latente cu boli virale și cancer bacterian (2018-2023)

Nr. crt.	Soiul de struguri	Identificator	Bacterii	Virusuri				
			A. vitis	GFLV	GLRaV-1	GLRaV-3	GFkV	GVA
1	Luminița	T2-2-11	+	-	-	-	-	-
2	Luminița	T2-3-40	-	-	-	-	-	-
3	Luminița	T2-3-5	+	-	-	-	-	-
4	Luminița	T2-2-38	+	-	-	-	-	-
5	Muscat de Ialoveni	T1-11-25	+	-	-	-	+	-
6	Muscat de Ialoveni	T1-11-6	+	-	-	-	-	-
7	Onițcanschii belâi	T2-9-16	-	-	-	-	-	-
8	Onițcanschii belâi	T2-9-14	+	-	-	-	-	-
9	Onițcanschii belâi	T2-9-44	+	-	-	-	-	-
10	Onițcanschii belâi	TI-9-1-4	-	-	-	-	-	-
11	Onițcanschii belâi	TI-11-1-5	-	-	-	+	-	-
Total probe infectate (buc./%):			7 63,6%	0	0	1 9%	1 9%	0

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

Conform rezultatelor prezentate în tabelul 3.8, majoritatea candidaților în clone de viță-de-vie din soiurile de selecție nouă cu bobul alb au fost infectați cu bacteria *A. vitis*, identificată la 63,6% dintre probe. Virusurile GLRaV-3 și GFkV au fost depistate în mod egal, fiecare fiind prezent în 9% din probe. Virusurile GLRaV-1, GFLV și GVA nu au fost detectate în probele analizate. În proba Muscat de Ialoveni T1-11-25 a fost identificată o combinație de infecții, caracterizată prin prezența bacteriei *A. vitis* și a virusului GFkV. Aceste rezultate sugerează o

răspândire semnificativă a bacteriei *A. vitis* în materialul de înmulțire viticol de selecție nouă cu bob alb, pe de altă parte, virusurile au fost detectate doar în câteva cazuri izolate.

Pe baza datelor din tabelul 3.8, dintre cele patru probe analizate ale soiului Luminița, doar una (Luminița T2-3-40) s-a dovedit sănătoasă, în timp ce la celelalte trei a fost identificată bacteria *A. vitis*. În ambele plante testate din soiul de viță-de-vie Muscat de Ialoveni (T1-11-25 și T1-11-6) a fost diagnosticată bacteria *A. vitis*. De asemenea, în proba Muscat de Ialoveni T1-11-25 a fost depistată infecția cu GFkV. Dintre cei 5 candidați în clone analizate ale soiului Onițcanschii belâi, două variante (T2-9-16 și TI-9-1-4) au prezentat rezultate negative, fără infecții virale sau cancer bacterian. Celelalte trei plante au fost diagnosticate cu diverse infecții, doi candidați în clone (T2-9-14 și T2-9-44) au fost infectați cu *A. vitis*, în absența infecțiilor virale, iar o variantă tesatată (TI-11-1-5) a fost infectată doar cu virusul GFkV. Rezultatele obținute redau fidel situația fitosanitară a materialului săditor de viță-de-vie analizat și servesc drept bază pentru selectarea plantelor candidați în clone destinate procesului de asanare și obținerii clonelor sănătoase.

Analizând datele din tabelul 3.9 referitoare la soiurile de selecție nouă de struguri cu bobul roșu, se observă că infecțiile cu virusul GFkV sunt cele mai frecvente, fiind diagnosticate la 20 dintre cele 31 de probe analizate (64,5%). Virusul GLRaV-1 a fost identificat în 5 probe (16,1%), Virusurile GLRaV-3 și GFLV au fost fiecare identificate în câte 4 probe (12,9%). Infecția cu bacteria *A. vitis* a fost detectată la 9 candidați în clone (41%).

În cadrul testărilor fitosanitare, candidații în clone din soiurile Apiren roz, Chișmiș lucistâi și Legenda au fost reprezentați de câte o singură variantă, toate fiind diagnosticate ca fitosanitar sănătoase, fără prezența infecțiilor virale sau bacteriei *A. vitis.* Soiul de struguri de selecție nouă Basarabia a fost reprezentat de 4 candidați în clone, dintre care Basarabia A-36 (33) a fost identificat ca sănătos, fără infecții virale sau bacteriene. Celelalte 3 probe au fost infectate cu virusul GFkV, fie de unul singur (în cazul probei Basarabia A-36 (36), fie în combinație cu alți agenți patogeni. Proba Basarabia A-36 (37) a fost infectată atât cu *A.vitis*, cât și cu virusul GFkV, iar varianta Basarabia A-36(46) a prezentat o infecție combinată cu virusurile GFkV și GLRaV-3.

Pe baza datelor din tabelul 3.9, se observă că din soiul Codrinschii Pleșeni au fost testate 6 probe și toate s-au dovedit a fi infectate. Virusul GFkV a fost depistat în toate variantele. Doi candidați în clone (I-9-1-3 și I-9-7-4) au fost infectați atât cu virusul GFkV, cât și cu virusul GFLV, iar în varianta Codrinschii Pleșeni I-10-7-5 a fost identificată o infecție cu virusul GLRaV-1 în combinație cu GFkV. Alte două probe (I-11-6-1 și I-11-15-1) au fost infectate atât de virusul GFkV, cât și cu bacteria *A.vitis*. O singură probă de Codrinschii Pleșeni (I-9-8-1) a fost infectată doar cu virusul GFkV, fără prezența altor agenți patogeni. Aceste rezultate evidențiază variabilitatea stării fitosanitare la soiurile de selecție nouă.

Tabelul 3.9 Rezultatele testării candidaților în clone din soiuri de struguri de selecție nouă cu bobul roșu la prezența infecțiilor latente cu boli virale și cancer bacterian (2018-2023)

Nr. crt.	Soiul de struguri	Identificator	Bacterii	Virusuri				
			A. vitis	GFLV	GLRaV-1	GLRaV-3	GFkV	GVA
1	Apiren roz	40-42	-	-	-	-	-	-
2	Basarabia	A-36-33	-	-	-	-	-	-
3	Basarabia	A-36-36	-	-	-	-	+	-
4	Basarabia	A-36-37	+	-	-	-	+	
5	Basarabia	A-36-46	-	-	-	+	+	-
6	Chișmiș lucistâi	5-8-1	-	-	-	-	-	-
7	Codrinschii Pleșeni	I-9-1-3	-	+	-	-	+	-
8	Codrinschii Pleșeni	I-9-7-4	-	+	-	-	+	-
9	Codrinschii Pleșeni	I-9-8-1	-	-	-	-	+	-
10	Codrinschii Pleșeni	I-11-6-1	+	-	-	-	+	-
11	Codrinschii Pleșeni	I-10-7-5	-	-	+	-	+	-
12	Codrinschii Pleșeni	I-11-15-1	+	-	-	-	+	-
13	Legenda	2-13-6	-	-	-	-	-	-
14	Meleag	T2-19–25	-	+	-	-	+	-
15	Meleag	T2-19-9	-	+	-	-	+	-
16	Meleag	T2-19-7	+	-	-	-	-	-
17	Moldova	13-1-1	+	-	+	-	+	-
18	Moldova	17-1-1	+	-	-	-	-	-
19	Moldova	17-1-3	-	-	-	+	+	-
20	Moldova	13-1-2	-	-	-	-	-	-
21	Moldova	17-1-2	-	-	-	+	+	-
22	Moldova	13-2-3	-	-	-	-	+	-
23	Moldova	17-1-4	-	-	+	-	+	-
24	Moldova	8-1-3	-	-	-	-	+	-
25	Moldova	8-1-2	+	-	-	+	-	-
26	Moldova	7-1-3	-	-	+	-	+	-
27	Moldova	13-2-2	-	-	+	-	+	-
28	Tudor	56-2-6	+	-	-	-	-	-
29	Tudor	56-3-6	-	-	-	-	-	-
30	Tudor	56-3-2	+	-	-	-	-	-
31	Tudor	56-5-6	-	-	-	-	+	-
Total probe infectate (buc/%):			9/ 29%	4/ 12,9%	5/ 16,1%	4/ 12,9%	20/ 64,5%	0

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

Toate plantele din soiul de struguri Meleag au fost găsite infectate. Candidații în clone Meleag T2-19-25 și T2-19-9 au fost infectate cu virusurile GFkV cât și cu virusul GFLV, în timp ce proba Meleag T2-19-7 a fost diagnosticată cu *A. vitis*.

Dintre cele 11 probe de viță-de-vie din soiul Moldova testate, doar o singură probă (Moldova 13-1-2) este complet liberă de infecții, atât virale, cât și bacteriene. Majoritatea candidaților au fost afectați de infecții virale, cu predominarea virusului GFkV (8 plante). Asocierile între anumite tipuri de virusuri sunt frecvente în plantele cercetate, iar cel mai des întâlnite a fost combinația între virusurile GLRaV-1,3 și GFkV (5 plante). La unele variante testate

au fost stabilite și infecții complexe: Moldova 13-1-1 a fost infectată cu un complex de infecții format din cancer bacterian și două virusuri (GLRaV-1 și GFkV), iar Moldova (8-1-2) a fost infectată cu un complex de cancer bacterian și GLRaV-3.

Analiza comparativă a rezultatelor testărilor pentru candidații în clone de viță-de-vie din soiurile de selecție nouă cu bob alb și cu bob roșu evidențiază diferențe semnificative în prevalența infecțiilor bacteriene și virale. Infecțiile cu *A. vitis* au fost mai frecvent identificate la candidații în clone din soiurile de selecție nouă cu bob alb, unde bacteria a fost depistată în 63,6% din probe, evidențiind un grad ridicat de afectare a plantelor din aceste soiuri cu agentul cauzator al cancerului bacterian. În cazul soiurilor cu bob roșu, prezența bacteriei *A. vitis* a fost semnificativ mai redusă, fiind depistată în 29% din probele analizate. Spre deosebire de infecțiile bacteriene, infecțiile virale au fost mai frecvent întâlnite la candidații în clone din soiuri de selecție nouă cu bob roșu. Virusul GFkV a fost identificat în 64,5% din probe, fiind cel mai răspândit agent patogen viral în acest grup. Acest virus a fost prezent atât izolat, cât și în combinație cu alți agenți, inclusiv GLRaV-1, GLRaV-3, GFLV sau bacteria *A. vitis*.

Un aspect important ce trebuie evidențiat este frecvența ridicată a infecțiilor mixte în cadrul acestui grup, fiind identificate 12 cazuri de asociere între diferite virusuri, precum și 5 cazuri de coinfecție cu *A. vitis*. Frecvența înaltă a infecțiilor mixte evidențiază un grad înalt de contaminare a materialului biologic, ceea ce impune necesitatea efectuării testărilor fitosanitare în toate etapele procesului de selecție fitosanitară.

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), Oniţcanschii 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) (tabelul 3.10).

Din rezultatele prezentate în tabelul 3.10, se observă că probele de viță-de-vie din soiurile autohtone cu bobul alb sunt afectate în principal de bacteria *A. vitis* (30,8%) și virusul GLRaV-1 (30,8%). În mod similar, virusurile GFkV și GVA au fost identificate în 23% dintre probe, iar virusul GLRaV-3 a fost depistat în 7,7% din probe.

Tabelul 3.10 Rezultatele testării candidaților în clone din soiuri de struguri autohtone cu bobul alb la prezența infecțiilor latente (2018–2023)

Nr. crt.	Soiul de struguri	Identificator	|Bacterii	Virusuri				
			A. vitis	GFLV	GLRaV-1	GLRaV-3	GFkV	GVA
1	Frâncușa	2-2-5-5	+	-	+	-	-	-
2	Frâncușa	2-2-4-2	-	-	+	-	-	+
3	Frâncușa	2-2-3-1	-	-	+	-	-	+
4	Frâncușa	2-3-3-1	-	-	+	+	-	+
5	Fetească alba	B II-13-11-1	-	-	-	-	-	-
6	Fetească regală	B II-10-13-1	-	-	-	-	+	-
7	Fetească regală	B II-10-7-1	-	-	-	-	-	-
8	Fetească regală	B II-10-2-1	-	-	-	-	-	-
9	Plăvaie	II-21-2-2	-	-	-	-	-	-
10	Telti Curuc	11-5-5	-	-	-	-	-	-
11	Zghihara de Huși	6-9-5	+	-	-	-	+	-
12	Zghihara de Huși	7-8-6	+	-	-	-	+	-
13	Zghihara de Huși	12-10-1	+	-	-	-	-	-
Total probe infectate (buc./%):			4/ 30,8%	0	4/ 30,8%	1/ 7,7%	3/ 23%	3/ 23%

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

Toate probele din soiul Frâncușa au arătat infecții mixte, iar un aspect important este că virusul GLRaV-1 a fost prezent în toate variantele analizate. Dintre cele patru probe, două variante (Frâncușa 2-2-4-2 și 2-2-3-1) au fost infectate atât cu GLRaV-1, cât și cu GVA. În cazul candidatului Frâncușa 2-2-5-5, au fost depistate atât bacteria *A. vitis* cât și virusul GLRaV-1.

Pe baza rezultatelor prezentate în tabelul 3.10, se constată că probele de viță-de-vie din soiuri autohtone cu bob alb au fost infectate în proporții similare cu bacteria *A. vitis* și virusul GLRaV-1, fiecare fiind identificat în 30,8% din cazuri. Virusurile GFkV și GVA au prezentat o incidență mai redusă, fiind detectate în 23% din probele analizate. Virusul GLRaV-3 a fost identificat cu o frecvență de 7,7%, iar virusul GFLV nu a fost depistat în probele examinate.

Rezultatele obținute pentru candidații în clone din soiuri autohtone cu bob roșu, prezentate în tabelul 3.11, arată o incidență moderată a infecțiilor bacteriene și virale. La soiul Busuiocă de Bohotin, trei din cele cinci variante testate (19-9-2, 18-6-7 și 18-4-7) au fost testate pozitiv *la A. vitis*, iar celelalte două (19-2-4 și 17-6-3) s-au dovedit a fi sănătoase. În cazul soiului Busuiocă de Moldova, dintre cele două probe analizate, una (19-5-7) a fost infectată cu virusul GFkV, iar cealaltă (19-3-4) a fost liberă de infecții latente. Din cei 7 candidați din soiul Copceac, 3 variante (1-18-1, 1-18-6 și 1-18-9) au fost infectate cu cancer bacterian, iar 2 variante (1-18-5, 1-18-8) au fost identificate cu virusul GLRaV. Probele Copceac (1-18-2) și (1-18-15) au fost diagnosticate ca fiind sănătoase. În cazul soiului Negru de Căușeni, varianta (III-2-1-1) a fost testată negativ, confirmând statutul fitosanitar sănătos. Candidatul în clonă din soiul Rară Neagră R-1-1 a fost infectat cu virusul GLRaV-3. Variantele din soiul autohton de struguri Feteasca Neagră (6-9-5) și

(12-10-1) au fost afectate de cancerul bacterian al viței-de-vie. În plus, probele Fetească Neagră (6-9-5 și 7-8-6) au fost diagnosticate pozitiv la virusul GFkV, evidențiind astfel o asociere de diferiți patogeni în aceste variante.

Tabelul 3.11 Rezultatele testării candidaților în clone din soiuri de struguri autohtone cu bobul roșu la prezența infecțiilor latente (2018–2023)

Nr. crt.	Soiul de struguri	Identificator	Bacterii	Virusuri				
			A. vitis	GFLV	GLRaV-1	GLRaV-3	GFkV	GVA
1	Busuioca de Bohotin	19-9-2	+	-	-	-	-	-
2	Busuioca de Bohotin	19-2-4	-	-	-	-	-	-
3	Busuioca de Bohotin	18-6-7	+	-	-	-	-	-
4	Busuioca de Bohotin	18-4-7	+	-	-	-	-	-
5	Busuioca de Bohotin	17-6-3	-	-	-	-	-	-
6	Busuioca de Moldova	19-3-4	-	-	-	-	-	-
7	Busuioca de Moldova	19-5-7	-	-	-	-	+	-
8	Copceac	1-18-1	+	-	-	-	-	-
9	Copceac	1-18-2	-	-	-	-	-	-
10	Copceac	1-18-5	-	-	-	+	-	-
11	Copceac	1-18-6	+	-	-	-	-	-
12	Copceac	1-18-8	-	-	+	-	-	-
13	Copceac	1-18-9	+	-	-	-	-	-
14	Copceac	1-18-15	-	-	-	-	-	-
15	Negru de Căușeni	III-2-1-1	-	-	-	-	-	-
16	Rară Neagră	R-1-1	-	-	-	+	-	-
17	Fetească Neagră	6-9-5	+	-	-	-	+	-
18	Fetească Neagră	7-8-6	-	-	-	-	+	-
19	Fetească Neagră	12-10-1	+	-	-	-	-	-
Total probe infectate (buc./%):			8/ 33,3%	0	1/ 5,2%	2/ 10,5%	3/ 15,7%	0

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

Testarea candidaților în clone din soiuri autohtone de viță-de-vie a relevat că 11 probe (36,7%) din 32 testate sunt libere de virusuri și de infecții bacteriene. Printre acestea sunt următoarele: Fetească albă (BII-13-11-1), Fetească regală (BII-10-7-1, BII-10-2-1), Plăvaie (II-21-2-2), Telti Curuc (11-5-5), Busuioacă de Bohotin (19-2-4, 17-6-3) și Busuioacă de Moldova (19-3-4), Copceac (1-18-2, 1-18-15) și Negru de Căușeni (III-2-1-1).

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 este prezența virusului GVA exclusiv în eșantioanele provenite din soiuri autohtone cu bob alb (23%), acesta fiind absent în probele din soiuri autohtone cu bob roșu și în cele din soiuri de selecție nouă. Virusul GFLV nu a fost identificat în niciuna dintre probele analizate din soiurile autohtone.

Aceste rezultate evidențiază faptul că infecțiile de etiologie virotică sunt mai frecvente în soiurile autohtone cu bob alb. Această constatare poate fi explicată prin modul diferit de manifestare a simptomelor provocate de virusurile răsucirii frunzelor (GLRaV-1 și GLRaV-3), în funcție de culoarea bobiței. Astfel, la soiurile cu bob roșu, infecția cu GLRaV-1 și GLRaV-3 determină o colorație intensă a frunzelor și o reducere semnificativă a creșterii lăstarilor, simptome care facilitează excluderea timpurie a acestor plante din procesul de înmulțire. În schimb, la soiurile cu bob alb, aceleași virusuri provoacă o cloroză ușoară, ceea ce face ca plantele infectate să fie mai greu de identificat vizual.

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. Variantele selectate au fost evaluate la prezența cancerului bacterian și a unor virusuri specifice viței-de-vie: GFLV, GLRaV-1 și GLRaV-3, GFkV și GVA (tabelele 3.12–3.13),

Tabelul 3.12 Rezultatele testării candidaților în clone din soiuri europene de viță-de-vie cu bobul alb pentru infecții latente (2018–2023)

Nr. crt.	Soiul de struguri	Identificator	Bacterii	Virusuri				
			A. vitis	GFLV	GLRaV-1	GLRaV-3	GFkV	GVA
1	Chardonnay	1-15-5-1	-	-	-	-	-	-
2	Chardonnay	1-15-5-5	-	-	-	-	-	-
3	Chardonnay	1-15-3-4	-	-	-	-	-	-
4	Chardonnay	1-16-2-2	-	-	-	-	-	-
5	Chardonnay	1-14-1-4	-	-	-	-	+	-
6	Pinot gris	1-65-6-2	-	-	-	-	+	-
7	Pinot gris	1-65-3-1	+	-	-	-	-	-
8	Pinot gris	1-65-9-2	-	-	-	-	+	-
9	Pinot gris	1-65-4-1	+	-	+	-	-	-
10	Pinot gris	1-65-5-4	-	-	-	-	-	-
11	Pinot gris	1-65-2-2	-	-	-	-	-	-
12	Sauvignon	BII-14-4-1	-	-	+	-	+	-
13	Sauvignon	BII-10-9-1	-	-	-	-	-	-
Total probe infectate buc./%			2/ 15,4%	0	2/ 15,4 %	0	4/ 30,7%	0

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

Din rezultatele prezentate în tabelul 3.12 se observă că, în cazul clonelor din soiurile europene de viță-de-vie cu bobul alb, materialul biologic este relativ puțin afectat de infecțiile bacteriene și virale. Bacteria *A. vitis* a fost identificată în 15,4% dintre probe. Dintre virusuri, GFkV a fost cel mai frecvent diagnosticat, în 30,7% dintre probe. Virusul GLRaV-1 a fost detectat în 15,4% din cazuri, iar virusul GLRaV-3 nu a fost identificat în probele analizate. De asemenea, virusurile GFLV și GVA nu au fost depistate la candidații analizați din eșantionul soiurilor de struguri europene cu bobul alb. Această situație demonstrează o prevalență general mai scăzută a infecțiilor mixte la soiurile cu bobul alb din grupul soiurilor europene.

În urma analizelor efectuate, probele din soiul Chardonnay au arătat rezultate negative, cu excepția variantei Chardonnay (1-14-1-4), care a fost infectată cu GFkV. La soiul Pinot gris, testarea a arătat că două probe au fost infectate cu GFkV, alte două probe sunt infectate cu agentul cancerului bacterian, iar două s-au dovedit complet sănătoase (Pinot gris 1-65-5-4 și 1-65-2-2). În cazul soiului Sauvignon, au fost testate două probe, dintre care varianta Sauvignon (BII-14-4-1) a fost identificată ca fiind infectată cu virusurile GLRaV-1 și GFkV, iar varianta Sauvignon (BII-10-9-1) a arătat rezultate negative la prezența agenților patogeni testați.

Aceste date confirmă eficiența selecției preliminare a materialului biologic analizat și argumentează oportunitatea includerii soiurilor Chardonnay, Pinot gris și Sauvignon în programele naționale de obținere a clonelor fitosanitare de viță-de-vie.

Rezultatele testării candidaților în clone din soiuri europene de viță-de-vie cu bobul roșu, prezentate în tabelul 3.13, denotă că infecțiile bacteriene sunt relativ puține comparativ cu cele virale, predominând infecțiile asociate cu complexul *Leafroll*. Bacteria *A. vitis* a fost identificată în 18,2% dintre probe, fiind prezentă în special la soiurile Cabernet Sauvignon și Pinot Noir. Dintre virusuri, GLRaV-3 este cel mai frecvent întâlnit, diagnosticat în 40,9% dintre probe. Virusul GFkV a fost identificat în 27,2% dintre probe, în timp ce GLRaV-1 a apărut în 9% din variante. Virusurile GFLV și GVA nu au fost depistate în niciuna dintre probele analizate.

Dintre cele 12 probe din soiul Cabernet Sauvignon, o variantă (2-1-3) a fost diagnosticată cu cancer bacterian, două (15-1 și 15-2) au fost depistate cu infecții complexe cu *A. vitis*, GLRaV-1 și GLRaV-3. Candidații în clone Cabernet Sauvignon 8-8-1 și 8-4-1 au fost infectați cu GLRaV-3 și GFkV. Cinci probe studiate din soiul Cabernet Sauvignon (3-1, 7-1, 6-5, 4-1 și 5-2) au fost infectate cu GFkV. Probele Cabernet Sauvignon 2-1-1 și 2-1-2 nu au prezentat infecții virale sau bacteriene. Dintre cele 7 probe din soiul Pinot Noir, două variante – Pinot Noir 1-27-13-7 și Pinot noir 1-27-7-4, au fost infectate cu GFkV, iar proba Pinot Noir 1-25-4-6 a fost diagnosticată cu *A. vitis*. Patru probe studiate din acest soi nu au prezentat semne de infecție virală sau bacteriană (1-2-4-4, 1-27-11-5, 1-28-1-4, 1-27-6-3).

Tabelul 3.13 Rezultatele testării candidaților în clone din soiuri europene de viță-de-vie cu bobul roșu pentru infecții latente (2018–2023)

Nr. crt.	Soiul de struguri	Identificator	Bacterii	Virusuri				
			A. vitis	GFLV	GLRaV -1	GLRaV-3	GFkV	GVA
1	Cabernet Sauvignon	8-8-1	-	-	-	+	+	-
2	Cabernet Sauvignon	8-4-1	-	-	-	+	+	-
3	Cabernet Sauvignon	2-1-1	-	-	-	-	-	-
4	Cabernet Sauvignon	2-1-2	-	-	-	-	-	-
5	Cabernet Sauvignon	2-1-3	+	-	-	-	-	-
6	Cabernet Sauvignon	3-1	-	-	-	+	-	-
7	Cabernet Sauvignon	7-1	-	-	-	+	-	-
8	Cabernet Sauvignon	6-5	-	-	-	+	-	-
9	Cabernet Sauvignon	4-1	-	-	-	+	-	-
10	Cabernet Sauvignon	5-2	-	-	-	+	-	-
11	Cabernet Sauvignon	15-1	+	-	+	+	-	-
12	Cabernet Sauvignon	15-2	+	-	+	+	-	-
13	Pinot Noir	1-2-4-4	-	-	-	-	-	-
14	Pinot Noir	1-27-11-5	-	-	-	-	-	-
15	Pinot Noir	1-27-13-7	-	-	-	-	+	-
16	Pinot Noir	1-28-1-4	-	-	-	-	-	-
17	Pinot Noir	1-27-7-4	-	-	-	-	+	-
18	Pinot Noir	1-25-4-6	+	-	-	-	-	-
19	Pinot Noir	1-27-6-3	-	-	-	-	-	-
20	Merlot	BS- 20-2-1	-	-	-	-	+	-
21	Merlot	BS-14-4-1	-	-	-	-	-	-
22	Merlot	BS-14-9-1	-	-	-	-	+	-
Total probe infectate buc/%			4/ 18,2%	0	2/ 9%	9/ 40,9%	6/ 27,2%	0

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

Din tabelul 3.13 se poate observa, că probele din soiul Merlot au arătat o incidență scăzută a infecțiilor virale și bacteriene. Dintre cele trei probe analizate, două au fost diagnosticate pozitiv la virusul GFkV (Merlot BS-20-2-1 și Merlot BS-14-9-1), iar una a fost liberă de infecții virale sau bacteriene (Merlot BS-14-4-1).

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

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).

Analiza infecțiilor la candidații în clone de viță-de-vie din soiuri de portaltoi. Bolile cronice ale viței-de-vie au un caracter sistemic, afectând integral structura vegetativă a plantei. În acest context, utilizarea unui altoi sau portaltoi infectat în procesul de obținere a butașilor altoiți conduce inevitabil la transmiterea agenților patogeni și, implicit, la propagarea materialului săditor contaminat. Prin urmare, în procesul de producere a materialului biologic sănătos, este esențial ca ambele componente utilizate la altoire să fie lipsite de infecții cronice si sitemice.

Conform cerințelor pentru încadrarea materialului săditor în categoria biologică Certificat, este obligatoriu ca atât lăstarii altoi, cât și cei portaltoi să provină din plantații-mamă de aceeași categorie biologică. În cazul în care una dintre componente este inferioară din punct de vedere al categoriei, butașii altoiți vor fi declasificași la nivelul celei mai joase categorii.

În cadrul cercetărilor efectuate a fost inițiat un program de selectare a clonelor sănătoase din principalele soiuri de portaltoi omologate și considerate promițătoare pentru condițiile pedoclimatice ale Republicii Moldova. Activitățile de selecție fitosanitară au fost desfășurate în cadrul plantației (conservatorului de clone) a IP INCAAMV, și au avut drept scop identificarea exemplarelor viguroase, cu potențial productiv sporit și fără simptome de boli de etiologie virală, fitoplasmatică sau bacteriană, din soiurile de portaltoi: Berlandieri x Riparia SO4, Berlandieri x Riparia Kober 5BB și Riparia x Rupestris 101-14. Soiul de portaltoi Maleque, a fost selectat din plantația de portaltoi amplasată în localitatea Geamăna, raionul Anenii Noi (tabelul 3.14).

Tabelul 3.14 Rezultatele testarii candidaților în clone de portaltoi de viță-de-vie pentru depistarea infecțiilor latente (2018)

Nr. crt.	Soiul	Bacterii	Virusuri				
		A. vitis	GFLV	GLRaV-1	GLRaV-3	GFkV	GVA
1	B x R SO4	-	-	-	-	-	-
2	B x R Cober 5BB	-	-	-	-	-	-
3	R x R 101-14	-	-	-	-	-	-
4	Maleque 3-1	-	-	-	-	-	-
5	Maleque 3-2	-	-	-	-	-	-
6	Maleque 3-3	-	-	-	-	-	-
7	Maleque 3-4	-	-	-	-	-	-

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

În urma examinării fitosanitare, s-a constatat că au fost lipsiți de infecții virale și de cancer bacterian următorii candidați în clone: Berlandieri x Riparia SO4, Berlandieri x Riparia Kober 5BB, Riparia x Rupestris 101-14, precum și 4 variante din soiul Maleque.

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 *A. vitis*, atât în funcție de categoria soiurilor, cât și de culoarea boabelor (tabelul 3.15).

Tabelul 3.15 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	*A. vitis*	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 neinfectat	27,3	19,3	38,5	31,6	53,8	31,8

Soiurile de selecție nouă au înregistrat cele mai înalte rate de infecție cu *A. vitis* – 63,6% la cele cu bob alb și 29% la cele cu bob roșu, ceea ce reflectă o contaminare sporită a materialului de înmulțire utilizat. Această situație poate fi explicată prin faptul că multe dintre aceste soiuri au fost propagate inițial din plante infectate.

În mod similar, și soiurile autohtone prezintă niveluri înalte de infecție, cu o incidență relativ apropiată între cele două grupe analizate de 30,8% la soiurile cu bob alb și 33,3% la cele cu bob roșu. Aceasta indică faptul că, până în prezent, aceste soiuri nu au beneficiat de o selecție fitosanitară sistematică. Deși în ultimii ani a fost înregistrată o creștere a interesului pentru conservarea și valorificarea soiurilor autohtone în plantațiile viticole, materialul de înmulțire utilizat provine, de regulă, din plantații vechi, unde nu au fost aplicate măsuri de monitorizare și eliminare a plantelor infectate. Lipsa unui control fitosanitar confirmat a favorizat acumularea treptată a infecțiilor cu *A. vitis* în forma latentă, ceea ce explică gradul actual de contaminare.

Spre deosebire de acestea, soiurile europene de viță-de-vie au prezentat o incidență mai redusă a infecțiilor bacteriene, atât pentru cele cu bob alb (15,4%), cât și pentru cele cu bob roșu (18,2%). Acest fapt poate fi explicat prin mai mulți factori. În primul rând, soiurile europene au fost în centrul atenției viticultorilor și au beneficiat de o supraveghere fitosanitară mai riguroasă. În al doilea rând, plantațiile cu soiuri europene au fost mai frecvent supuse reconversiei și reînnoirii, fiind utilizat material săditor, deseori importat din UE cu certificare fitosanitară.

În ceea ce privește bolile de etiologie virală, în cazul soiurilor de selecție nouă, este relevată o frecvență mai înaltă a infecțiilor virale la soiurile cu bob roșu. La această categorie au fost identificate infecții cu GLRaV-1 în 16,1% din probe, iar cu GLRaV-3 în 19,3% din cazuri. Virusul GFkV a fost depistat în 64,5% din probe, ceea ce indică o contaminare înaltă a materialului de înmulțire viticol. În cazul soiurilor cu bob alb, incidența infecțiilor virale a fost mai redusă – 9% din probe au fost pozitive pentru GLRaV-3 și 9% pentru GFkV.

În cazul soiurilor autohtone, infecțiile virale au fost mai frecvent identificate la soiurile cu bobul alb comparativ cu cele cu bobul roșu. Virusul GLRaV-1 a fost diagnosticat în 30,8% din probe, iar virusul GFkV – în 23%. Un aspect deosebit este frecvența virusului GVA, identificat în 23% dintre probele provenite din această categorie, în timp ce acest virus a fost absent în celelalte grupe de soiuri analizate. Incidența virusului GLRaV-3 a fost redusă la 7,7%. La soiurile autohtone cu bob roșu, incidența infecțiilor virale a fost mai scăzută: GLRaV-1 – 5,2%, GLRaV-3 – 10,5% iar pentru GFkV – 15,7%.

Soiurile europene de viță-de-vie prezintă diferențe semnificative în ceea ce privește incidența infecțiilor virale, în funcție de culoarea bobului. La soiurile cu bob alb, virusul GFkV a fost identificat cu cea mai mare frecvență (30,7%), fiind urmat de GLRaV-1 (15,4%), în timp ce virusul GLRaV-3 nu a fost depistat. La soiurile cu bob roșu predomină infecțiile cu virusul GLRaV-3 (40,9%), urmate de cele cu GFkV (27,2%) și GLRaV-1 (9%).

Aceste rezultate sunt în concordanță cu datele din literatura de specialitate, conform cărora virusul GLRaV-3 este cel mai frecvent diagnosticat în plantațiile comerciale de viță-de-vie din diferite regiuni viticole ale lumii, în timp ce GLRaV-1 are o răspândire semnificativă, dar mai puțin extinsă geografic [26, 46, 166].

Răspândirea înaltă a virusului GFkV, identificat în toate grupele de soiuri testate, indiferent de culoarea bobului, cu o prevalență cuprinsă între 9% și 64,5% – este determinată de doi factori principali: caracterul său latent și absența simptomelor vizibile în plantații, ceea ce îngreunează identificarea plantelor infectate în lipsa testării de laborator, precum și cadrul normativ actual, care prevede obligativitatea testării pentru acest virus doar în cazul portaltoilor și exclusiv pentru categoria materialului de înmulțire inițial. Această abordare este insuficientă, în condițiile în care GFkV poate migra cu ușurință între altoi și portaltoi prin conexiunile de floem, contribuind astfel la menținerea infecției în materialul săditor și la perpetuarea sa în plantații. Prin urmare, procesul de testare a candidaților în clone pentru prezența bolilor virale și a cancerului bacterian a permis identificarea plantelor inițial sănătoase, confirmând importanța diagnosticului de laborator în selecția clonală și în programele de certificare a materialului viticol. Această etapă marchează începutul procesului de obținere a clonelor fitosanitare destinate multiplicării.

Din totalul de 109 probe de struguri din 25 de soiuri de viță-de-vie, au fost identificate 31 de plante sănătoase din 22 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

Asanarea constituie o etapă esențială în procesul de obținere a clonelor fitosanitare de viță-de-vie, având drept obiectiv eliminarea infecțiilor latente și restabilirea stării fiziologice normale a plantelor candidați în clone destinate multiplicării. Aplicarea acestor procedee contribuie la menținerea stabilității fitosanitare a materialului biologic, creând totodată premisele pentru obținerea și utilizarea materialului de înmulțire sănătos, aspect fundamental în viticultură, mai ales în contextul înființării plantațiilor-mamă [60]. În vederea asigurării sănătății materialului viticol, este necesară eliminarea agenților patogeni care cauzează boli cronice, precum virusurile, fotoplasmele și cancerul bacterian. Prezența acestor agenți patogeni în materialul de înmulțire poate avea consecințe negative asupra culturilor viticole, reducând randamentul, afectând calitatea producției și, în cazuri extreme, compromițând întreaga cultură [87]. Din acest motiv, este foarte important să fie eliminați agenții patogeni din candidații în clone selectați, înainte ca aceștea să fie incluși în procesul de multiplicare a materialului viticol.

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 3.16). Această constatare confirmă faptul că evaluarea vizuală, deși necesară în etapa inițială a selecției, nu este suficientă pentru determinarea stării reale de sănătate a viței-de-vie. Doar aplicarea metodelor de diagnostic imunologic și molecular, precum testarea ELISA și PCR, permite identificarea infecțiilor ascunse care pot persista în țesuturile plantei fără manifestări exterioare evidente. În astfel de cazuri, când toți candidații în clone selectați dintr-un soi au prezentat rezultate pozitive la prezența virusurilor sau a bacteriilor *A. vitis*, se impune aplicarea unui set de măsuri specifice de asanare a plantelor afectate, în funcție de tipul agenților patogeni detectați și de gradul de infecție. Implementarea acestor măsuri reprezintă o etapă importantă în procesul de obținere a materialului biologic curat, asigurând eliminarea agenților patogeni din genotipurile valoroase care nu pot fi înlocuite prin selecție convențională.

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.

Tabelul 3.16 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				
			A. vitis	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 infecție

Pe baza datelor din tabelul 3.16, se observă că 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.

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 vița-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 [140].

În practică, se recomandă utilizarea metodelor de asanare, în special în cazurile în care materialul viticol are o valoare economică sau genetică ridicată. Selectarea de noi candidați poate fi aplicată ca măsură suplimentară, dar asanarea oferă o soluție mai rapidă și mai sigură pentru a obține plante sănătoase și pentru valorificarea materialului biologic existent. În programele

naționale de ameliorare și conservare, aplicarea acestor metode contribuie la menținerea purității fitosanitare și la perpetuarea soiurilor autohtone valoroase.

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

Terapia cu apă fierbinte (TAF) aplicată butașilor de viță-de-vie este una dintre metodele eficiente pentru suprimarea agentului patogen al cancerului bacterian de viță-de-vie. Cercetările efectuate de specialiști din Australia, Italia și Ungaria indică faptul, că tratarea viței-de-vie cu apă fierbinte la o temperatură de 50 °C timp de 30 de minute suprimă dezvoltarea *A. vitis* [15], iar timp de 45 de minute are impact pozitiv asupra fitoplasmoselor [27]. Având în vedere faptul că în plantațiile viticole din Republica Moldova bolile viței-de-vie de etiologie fitoplasmatică sunt răspândite pe scară largă [70], a apărut necesitatea de a modifica durata tratamentului cu apă fierbinte pentru suprimarea concomitentă atât a bacteriei *A. vitis*, cât și a bolilor fitoplasmatice.

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. Tratamentul a fost efectuat într-un termostat de laborator, cu o expunere cu durata de 45 de minute și temperatura ale apei de 50–52 °C. Temperatura apei a fost monitorizată cu ajutorul unui termometru cu mercur. Butașii martor au fost ținuți timp de 45 de minute în apă la temperatura de 20–22 °C. După tratament, butașii studiați și cei martor au fost plasați în pungi de polietilenă și menținuți la temperatura 20–22 °C timp de 14 zile. La sfârșitul acestei perioade a fost evaluat numărul de muguri viabili în toate variantele. Denumirea soiurilor, numărul de butași tratați și rezultatele evaluărilor viabilității mugurilor după tratare cu apă fierbinte sunt prezentate în tabelul 3.17.

Tabelul 3.17 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 (ºC)	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

Din tabelul 3.17 se observă că, la temperaturile de 50–51 °C și durata de expunere de 45 minute, procentul de muguri viabili la butașii de viță-de-vie din soiul Aligote a fost practic identic, constituind 90,1% și 90,7% respectiv. Aceste valori se apropie de viabilitatea martorului netratat (94%), ceea ce demonstrează că tratamentul termic la aceste temperaturi nu a afectat semnificativ viabilitatea mugurilor. Creșterea temperaturii apei până la 52 °C a dus la reducerea considerabilă a viabilității mugurilor, care a scăzut până la 33,5%, confirmând sensibilitatea materialului biologic la temperaturi înalte.

Pentru soiul de struguri Pinot blanc, cea mai redusă influență asupra viabilității mugurilor a fost observată la temperatura de 51 °C, unde procentul de muguri viabili a constituit 89,2%. La temperatura de 50 °C, viabilitatea a fost de 81,3%, iar creșterea temperaturii până la 52 °C a condus la o scădere bruscă a viabilității, până la 34,7%. În comparație cu varianta martor, unde viabilitatea mugurilor a fost de 93%, se observă o diminuare a acestui indicator în toate variantele tratate, în special la temperatura de 52 °C, ceea ce denotă sensibilitatea soiului Pinot blanc la temperaturi ridicate în cadrul tratamentului cu apă fierbinte.

Din datele obținute, se poate concluziona că temperatura optimă a apei pentru menținerea unui procent înalt de muguri viabili se situează în intervalul de 50–51 °C. La temperatura de 52 °C, viabilitatea mugurilor scade semnificativ, atât pentru soiul Aligote, cât și pentru soiul Pinot blanc, indicând o limită critică la tratarea termică a butașilor. Soiul de struguri Aligote are o viabilitate puțin mai mare decât soiul Pinot blanc la temperaturile de 50–51 °C, dar pentru ambele soiuri viabilitatea mugurilor la temperatura de 52 °C este aceeași (34,5–34,6% respectiv). Aceste date sugerează că temperaturile de tratare cu apă fierbinte trebuie respectate cu strictețe, evitând supraexpunerea la temperaturi înalte.

Rezultatele studiului arată că prelungirea timpului de tratare cu apă fierbinte la temperaturi de 50–51 °C până la 45 de minute nu afectează semnificativ viabilitatea mugurilor de viță-de-vie. Acest lucru înseamnă că tratamentul cu apă fierbinte la aceste temperaturi poate fi folosit eficient în scopul combaterii patogenilor de etiologie fitoplasmatică și pentru reducerea infecției cu *A. vitis*, fără a compromite sănătatea materialului de înmulțire viticol. Aceste rezultate confirmă aplicabilitatea metodei în practica viticolă, oferind o soluție sigură și eficientă.

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. 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 (fig. 3.5).

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. 3.6). 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.

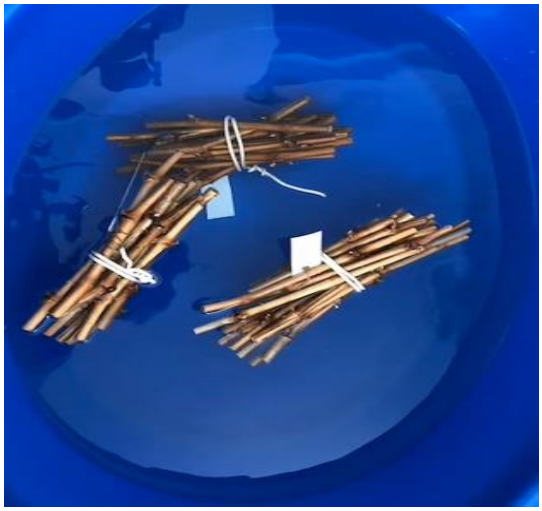

Fig. 3.5 Pregătirea butașilor pentru tratamentul cu apă fierbinte

Fig. 3.6 Tratarea butașilor de viță-de-vie în termostat de laborator

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.

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%, atât la soiul Aligote, cât și la Pinot Blanc. Aceste date demonstrează că durata tratamentului termic de 45 de minute la o temperatură de 50±1 °C nu afectează semnificativ viabilitatea mugurilor.

Rezultatele obținute sunt în concordanță cu datele raportate de alți cercetători în domeniu, care au studiat eficiența tratamentului termic al butașilor de viță-de-vie. Studiile realizate în Spania privind tratarea termică a butașilor de viță-de-vie au arătat că tratamentul cu apă fierbinte la temperaturi de până la 50 °C este eficient pentru utilizarea în pepinierele viticole, fără a compromite viabilitatea mugurilor. Autorii au subliniat că temperaturile mai mari de 50 °C pot

avea un efect negativ asupra viabilității materialului de înmulțire, ceea ce este în concordanță cu observațiile făcute privind reducerea viabilității mugurilor la 52 °C [61]. Un alt studiu realizat în Australia a demonstrat că tratamentul termic la 50 °C, aplicat timp de 30-45 de minute, este eficient pentru eliminarea mai multor patogeni, inclusiv *A. vitis*, fără a compromite viabilitatea butașilor. Autorii au observat că soiurile precum Pinot Noir și Chardonnay sunt mai sensibile la acest tip de tratament, în timp ce Cabernet Sauvignon a prezentat o toleranță mai mare [167]. În cadrul studiului efectuat, la fel a fost constatată o sensibilitate similară la soiul Pinot Blanc, ceea ce confirmă diferențele de răspuns la tratamentul termic în funcție de soiurile de viță-de-vie. Un alt studiu recent realizat în Turcia a demonstrat că tratamentele termice la 50 °C timp de 45 de minute sunt eficiente în reducerea infecțiilor cu *A. vitis* la butașii altoiți, fără a afecta în mod semnificativ formarea calusului [80]. În cadrul studiului în Italia a fost investigată eficiența tratamentului cu apă fierbinte în combaterea fitoplasmelor la vița-de-vie. Cercetătorii au raportat că tratarea materialului săditor în apă la 50 °C timp de 45 de minute a fost eficientă în eliminarea fitoplasmelor confirmând că termoterapia cu apă fierbinte este o strategie perspectivă pentru obținerea de material săditor sănătos [104].

În cadrul studiului realizat, a fost analizată eficiența tratamentului termic cu apă fierbinte pentru combaterea agenților patogeni, în special *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 fitoplasmelor, în special a fitoplasmei asociate cu boala *Bois Noir*. Rezultatele obținute au demonstrat că tratamentul cu apă fierbinte la 50±1 °C timp de 45 de minute poate fi aplicat fără a afecta negativ viabilitatea mugurilor, ceea ce face ca această metodă să fie eficientă pentru eradicarea simultană a bacteriei *A. vitis* și a fitoplasmelor, fără a compromite calitatea materialului de înmulțire.

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

Una dintre cele mai mari provocări în viticultură este reprezentată de prezența virusurilor, care se transmit prin materialul săditor în procesul de înmulțire vegetativă și prin altoire. Aceste virusuri pot cauza scăderi semnificative atât în cantitatea, cât și în calitatea producției viticole, afectând astfel eficiența economică a plantațiilor [150]. Pentru a reduce riscul de transmitere a virusurilor și a asigura obținerea de material săditor sănătos, o metodă eficientă este producerea de plante libere de virusuri. Eliminarea virusurilor din vița-de-vie se poate realiza prin termoterapie sau prin cultura vârfurilor de lăstari. Numeroase studii au demonstrat că aplicarea combinată a

acestor două metode asigură o eficiență ridicată. Tratamentele termice contribuie la reducerea titrului viral prin expunerea plantelor la temperaturi înalte, inhibând replicarea virusurilor sau chiar inactivându-le complet. Cultura de vârfuri de lăstari, datorită activității intense de diviziune celulară, permite obținerea de plante mai puțin afectate de virusuri [46].

Tratamentul plantelor infectate cu virusuri se realizează prin metoda termoterapiei cu aer fierbinte în faza de vegetație. În acest scop, planta care urmează să fie tratată trebuie sa fie înrădăcinată în ghivece mari cu un substrat de turbă, timp de un an sau doi. Procedeul se efectuează în camere termice speciale, cu iluminare și umiditate controlate, la temperatură de 25–38 °C. Deși tratamentul termic afectează întreaga plantă, doar vârfurile lăstarilor care cresc în timpul termoterapiei cu aer fierbinte devin libere de infecții virale, astfel sunt prelevate doar părțile apicale și înrădăcinate în cultura *in vitro*. Plantele crescute din vârfurile înrădăcinate sunt ulterior testate pentru prezența infecțiilor virale. Dacă rezultatele testelor sunt negative, plantele sunt considerate libere de virusuri și trec la etapa următoare de înmulțire accelerată.

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 (tabelul 3.14). 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. 3.7).

Fig. 3.7 Ghivece cu folie protectoare cu butași de viță-de-vie în cameră climatică

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 lucși. 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. 3.7).

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 (fig. 3.8). 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.

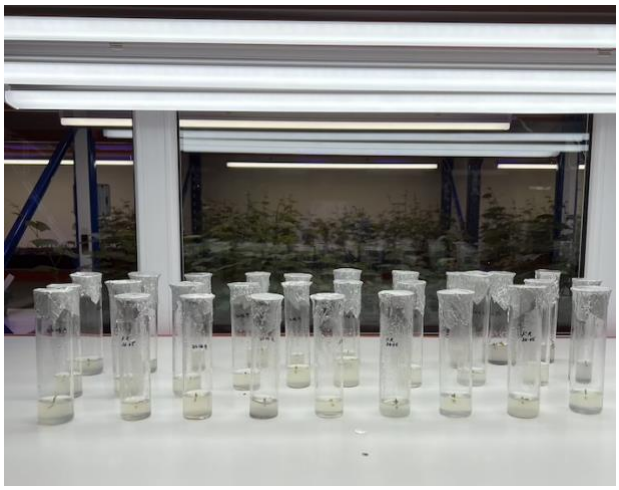

Fig. 3.8 Explante introduse în eprubete cu mediu nutritiv agarizat în camera culturală

Fig. 3.9 Plantele regenerate cu 6-8 internoduri, după 40 zile de cultură

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 (fig. 3.9). În această perioadă, plantele au prezentat o dezvoltare uniformă și o activitate meristematică intensă, caracterizată prin formarea de lăstari viguroși și frunze bine diferențiate.

La finalul acestei perioade, plantele regenerate au fost supuse testării prin metoda ELISA pentru a verifica prezența virusurilor. După cum se observă din tabelul 3.17, din cele 24 de probe analizate, doar una a prezentat rezultat pozitiv la virusul GFkV. Proba dată a fost prelevată de la plantă care a fost supusă termoterapiei cu aer fierbinte timp de 30 de zile.

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.

Tabelul 3.18 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 infecție

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.

Rezultatele obținute în cadrul studiului nostru privind tratamentul termic cu aer fierbinte pentru eliminarea virusurilor GFLV și GFkV din materialul viticol sunt în concordanță cu cele raportate de savanții din Republica Cehă pentru eliminarea virusului GFLV [90]. În studiul de față a fost aplicat un regim termic la 38 °C timp de 30 și 40 de zile și a demonstrat o eliminare completă a virusului GFLV după 40 de zile de tratament. Cercetătorii din Cehia au obținut rezultate pozitive în eliminarea virusului GFLV prin aplicarea unui regim de temperatură de 37 °C pe parcursul a 45 de zile, obținând eliminarea virusului la 91,2%. De asemenea, autorii au observat că, prin utilizarea diferitelor medii de cultivare eficiența tratamentului a variat.

Combinația termoterapiei cu cultura de meristem *in vitro* sau cu cultura vârfurilor de lăstar a fost utilizată cu succes pentru eliminarea virusurilor localizate în celulele parenchimatice și care pot pătrunde în zonele meristematice, precum nepovirusurile, și de alți cercetători.

În studiul realizat de cercetătorii din Spania, unde plantele-mamă erau infectate cu GFLV și GLRaV-3, la fel fost aplicată termoterapia, în combinație cu cultura *in vitro* a vârfurilor de lăstari și a mugurilor axilari de la soiul autohton de viță-de-vie Napoleon [163]. Rezultatele au arătat un

procent mare de plante libere de virusuri (91–100%) obținute prin cultura vârfurilor de lăstari de la plantele-mamă infectate din clonele soiului Napoleon. Și un procent mai mic de plante libere de virusuri (71–87%) au fost obținute din a doua și a treia pereche de muguri axilari de la lăstarii distali. De asemenea, autorii au subliniat că plantele libere de GFLV și GLRaV-3 au fost obținute doar prin combinarea termoterapiei cu metodele de cultură *in vitro*. Rezultatele obținute demonstrează că eficiența asanării este determinată de poziția și vârsta explantului, precum și de interacțiunea dintre tipul de virus și intensitatea tratamentului termic. Aceste constatări confirmă eficiența combinării termoterapiei cu cultura in vitro pentru obținerea materialului viticol sănătos.

Studiul realizat de Cretazzo și colab. a investigat eliminarea virusului *Grapevine fleck virus* dintr-un clon selectat al soiului autohton de viță-de-vie Manto Negro și a evaluat efectele acestei eliminări asupra fotosintezei și parametrilor fiziologici asociați [90]. În regiunile viticole calde, unde camerele climatice sunt absente sau dificil de aplicat, tratamentul termic natural în câmp reprezintă o alternativă economică și practică pentru obținerea clonelor inițiale asanate.

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*. Astfel, protocolul propus poate contribui la asanarea clonelor de viță-de-vie, atât în cazul nepovirusurilor, cât și al closterovirusurilor, contribuind la îmbunătățirea calității materialului săditor viticol utilizat.

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

Perioada de la selectarea unui clon nou de viță-de-vie până la fondarea plantațiilor-mamă depinde în mare măsură de viteza de multiplicare a plantelor inițiale. La momentul actual, în viticultură sunt utilizate diverse metode de multiplicare a viței-de-vie, printre care se numără: altoirea în uscat la masă, altoirea în uscat și în verde direct în plantație, butășirea în uscat și în verde. Au fost aplicate următoarele metode de multiplicare a clonelor fitosanitare: altoirea în verde în plantație (fig. 3.10 A), altoirea în verde în seră (fig. 3.10 B), altoirea în uscat la masă (fig. 3.10 C). Fiecare metodă prezintă anumite avantaje și dezavantaje specifice, iar toate metodele existente de multiplicare în producție permit obținerea materialului săditor viticol în cantitate necesară pentru înființarea plantației-mamă într-o perioada de 4–5 ani.

Fig. 3.10 Procedee de multiplicare a viței-de-vie. A – altoirea în verde în plantație; **B** – altoirea în verde în seră; **C** – altoirea în uscat la masă.

În contextul modernizării tehnologiilor aplicate în agricultură, multiplicarea prin cultura *in vitro* reprezintă o metodă inovatoare care permite obținerea rapidă a clonelor de viță-de-vie. Aplicarea acestei tehnici asigură multiplicarea eficientă prin utilizarea segmentelor nodale de mici dimensiuni, care sunt supuse proceselor de regenerare în medii nutritive și condiții de creștere optimizate. Coeficientul ridicat de multiplicare permite obținerea rapidă a unui număr mare de plante dintr-o singură plantă-mamă timp de 1an [135]. Un alt avantaj este posibilitatea de a crește plantele în condiții controlate pe tot parcursul anului. Acest lucru elimină dependența de factorii externi, cum ar fi sezonul sau condițiile meteorologice.

Multiplicarea prin cultura *in vitro* la vița-de-vie este utilizată în principal pentru producerea plantelor de categorie Prebază, care constituie sursa de butași pentru obținerea butașilor altoiți și pentru înființarea plantațiilor-mamă de categorie Bază. Din aceste plantații-mamă se recoltează butași care sunt furnizați pepinierelor, asigurând astfel producerea materialului săditor destinat înființării plantațiilor viticole de producție.

În cadrul cercetărilor realizate, a fost utilizată metoda de multiplicare *in vitro* pentru obținerea clonelor asanate de viță-de-vie. Scopul acestei proceduri a fost producerea de plante pe rădăcini proprii, libere de boli virotice, fitoplasmatice și cancer bacterian, destinate înființării plantației-mamă de categorie biologică Prebază. Pentru atingerea acestui scop, au fost stabilite mai multe obiective: cultivarea lăstarilor tineri pentru obținerea masei vegetative, regenerarea plantelor prin metoda *in vitro*, multiplicarea accelerată prin metoda microbutășirii *in vitro* pe substrat artificial de ioniți și aclimatizarea regeneranților.

Clonele obținute prin selecția fitosanitară și asanate prin metode termo-terapeutice au fost transferate la etapa de multiplicare accelerată. Astfel, materialul biologic destinat introducerii în cultură *in vitro*, vârfurile verzi ale lăstarilor, a fost prelevat în timpul fazei lor active de creștere, când meristemele prezintă o activitate mitotică intensă și o capacitate ridicată de regenerare

Fig. 3.11 Butașii de viță-de-vie plantați în ghivece cu substrat de turbă. **A** – la 7 zile după plantare; **B** – butașii cu mugurii înfloriți în a 14-a zi după plantare.

În scop preventiv, 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 (fig. 3.11 A). Această etapă a permis obținerea materialului biologic viguros necesar pentru inițierea culturii sterile.

După șapte zile de la plantare în ghivece, mugurii butașilor au început să se dezvolte, iar la a paisprezecea zi aceștia și-au deschis frunzele (fig. 3.11 B). 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*.

Pentru inocularea in condiții *in vitro*, sterilizarea și introducerea explantelor în cultură au fost realizate într-o încăpere special amenajată (boxă sterilă), echipată cu lămpi bactericide și sistem de laminare a aerului, asigurând astfel un mediu aseptic. Plantarea explantatelor inițiale, cu dimensiuni de 0,8-1,0 cm, a fost realizată pe un mediu nutritiv solidificat cu agar. Vârfurile sterilizate au fost inoculate pe un mediu nutritiv optimizat pentru micropropagarea viței-de-vie, bazat pe mediu MS, cu un conținut redus de macroelemente (jumătate din concentrația standard), suplimentat cu zaharoză (20 g/L) ca sursă de carbon și agar (5,5 g/L). Înainte de sterilizare, pH-ul mediului a fost ajustat la 6,2, iar 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 într-o încăpere adiacentă – camera de cultură (fig. 3.12–3.13).

Fig. 3.12 Cultivarea explantelor de viță-de-vie în condiții *in vitro* sub iluminare cu LED

Fig. 3.13 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 lucistii 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 [45].

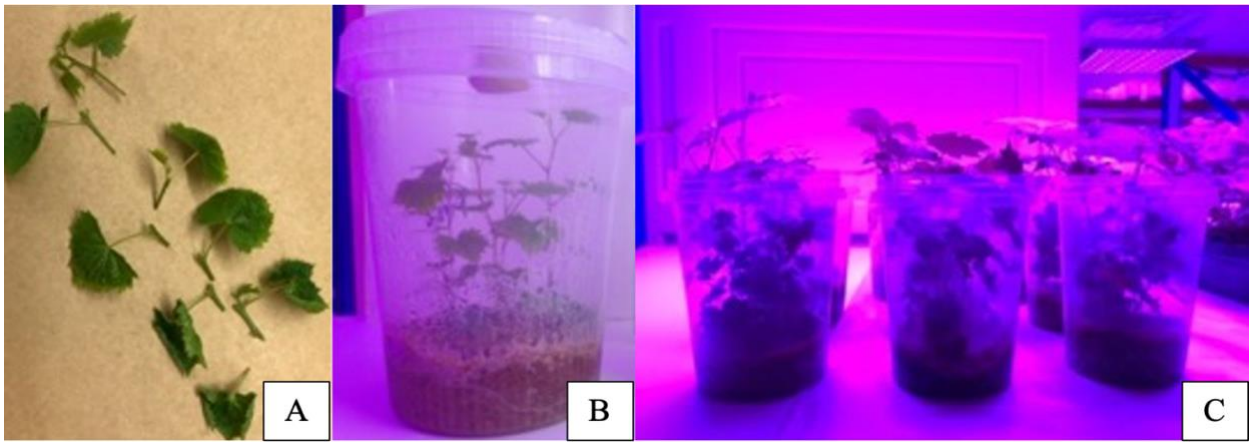

Fig. 3.14 Micropropagarea viței-de-vie pe substratul „Biona-311”. A – multiplicarea plantei regenerate; **B** – dezvoltarea microbutașilor în condiții *in vitro* în containere

Plantele de viță-de-vie regenerate au fost multiplicate accelerat prin metoda de microbutășire *in vitro*, care constă în fragmentarea vitroplantelor în microbutași de mici dimensiuni, utilizând segmente nodale sau apicale (fig. 3.14 A). Fiecare plantă regenerată a fost multiplicată în 5–7 microbutași și inoculați în containere pe substrat „Biona-311” (fig. 3.14 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. 3.14 C).

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 ioniți 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 e vegetație.

Fig. 3.15 Plante de viță-de-vie în faza de aclimatizare în containere multicelulare în camera de vegetație

Parametrii esențiali în camera e 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 (fig. 3.15).

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 3.19).

Așa cum se poate observa din tabelul 3.19, 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 [134]. 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.

Tabelul 3.19 Lista soiurilor de viță-de-vie și a clonelor multiplicate 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	Fetească regală	cl.INVV10-71	379
11	Fetească 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	Busuiocă de Bohotin	cl.INVV 18-67HR	157
18	Codrinschii	cl.INVV 9-81	121
19	Codrinschii	cl.INVV9-74	65
20	Alb de Onițcani	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

Unul dintre principalele avantaje a metodei de multiplicare *in vitro* constă în posibilitatea obținerii accelerate a unui număr mare de plante prin metoda microbutășirii. Această tehnică nu doar optimizează procesul de multiplicare, dar asigură și păstrarea calității fitosanitare și a uniformității genetice a materialului obținut. Cercetătorii Fuchs M. și Rawahnih Al. au demonstrat, prin utilizarea de markeri moleculari, că micropropagarea viței-de-vie garantează uniformitatea genetică și reduce semnificativ riscul apariției variabilității somaclonale [60]. Evaluarea genetică a viței-de-vie multiplicate în masă prin diverse metode *in vitro* a demonstrat că nu există diferențe genetice între plantele micropropagate și planta-mamă. Prin urmare, metoda *in vitro* reprezintă o tehnologie necesară în procesul de multiplicare a clonelor de viță-de-vie, oferind o soluție eficientă pentru obținerea materialului viticol liber de agenți de etiologie virotică, fitoplasmatică și cancer bacterian, contribuind la asigurarea materialului de înmulțire viticol de calitate superioară.

3.6 Înființarea plantațiilor-mamă de categorii biologice Prebază și Bază

Înființarea plantațiilor-mamă reprezintă o etapă esențială în procesul de producere a materialului săditor viticol sănătos și de calitate superioară, fiind o condiție indispensabilă pentru dezvoltarea durabilă a sectorului viticol al Republicii Moldova. Scopul principal al acestor plantații constă în furnizarea butașilor sănătoși, liberi de infecții virale, fitoplasmatice și bacteriene, care să asigure calitatea, uniformitatea și stabilitatea producției viticole.

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. Înainte de plantare, au fost realizate teste microbiologice ale solului pentru a determina calitatea acestuia și pentru a identifica posibilele probleme legate de prezența nematodei *Xiphinema index* [73].

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. 3.16). 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. 3.16 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 (Anexele 1–3).

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 (Anexele 4–7). Anual, sortimentul plantațiilor-mamă este completat cu noi soiuri de masă și tehnice, care răspund cerințelor actuale ale pieței și tendințelor din domeniul viticulturii și vinificației.

Îngrijirea plantațiilor-mamă de categorii biologice Prebază și Bază s-a realizat în strictă conformitate cu tehnologia viticolă destinată plantațiilor specializate pentru producerea materialului săditor. Pe parcursul perioadei de vegetație s-au efectuat lucrări de afânare a solului și menținere a ogorului negru, praşile mecanice și manuale pentru combaterea buruienilor, precum și completarea golurilor rezultate după plantare. În perioada de repaus vegetativ, s-au realizat tăierile de formare a cordonului bilateral orizontal și scurtarea coardelor anuale, în vederea stimulării creșterii uniforme a lăstarilor și a obținerii de coarde mature, apte pentru multiplicare. În anii următori, s-au aplicat tăieri de fructificare și lucrări de palisare, care au asigurat menținerea formei de conducere, aerisirea coronamentului și expunerea optimă la lumină a frunzelor.

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 vigorii constante a clonelor, asigurând uniformitatea creșterii, maturarea completă a lemnului și formarea unui aparat foliar sănătos și funcțional.

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

În urma testărilor efectuate asupra unui număr semnificativ de probe de material săditor viticol cultivat în Republica Moldova, inclusiv din loturi de selecție și plantații comerciale, s-a constatat o prevalență ridicată a infecțiilor cu virusuri, fitoplasme și agentul cancerului bacterian. Totuși, în pofida stării fitosanitare nefavorabile a plantațiilor de viță-de-vie, există premise reale pentru identificarea și selecția unor plante sănătoase, libere de agenți patogeni.

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. 3.17).

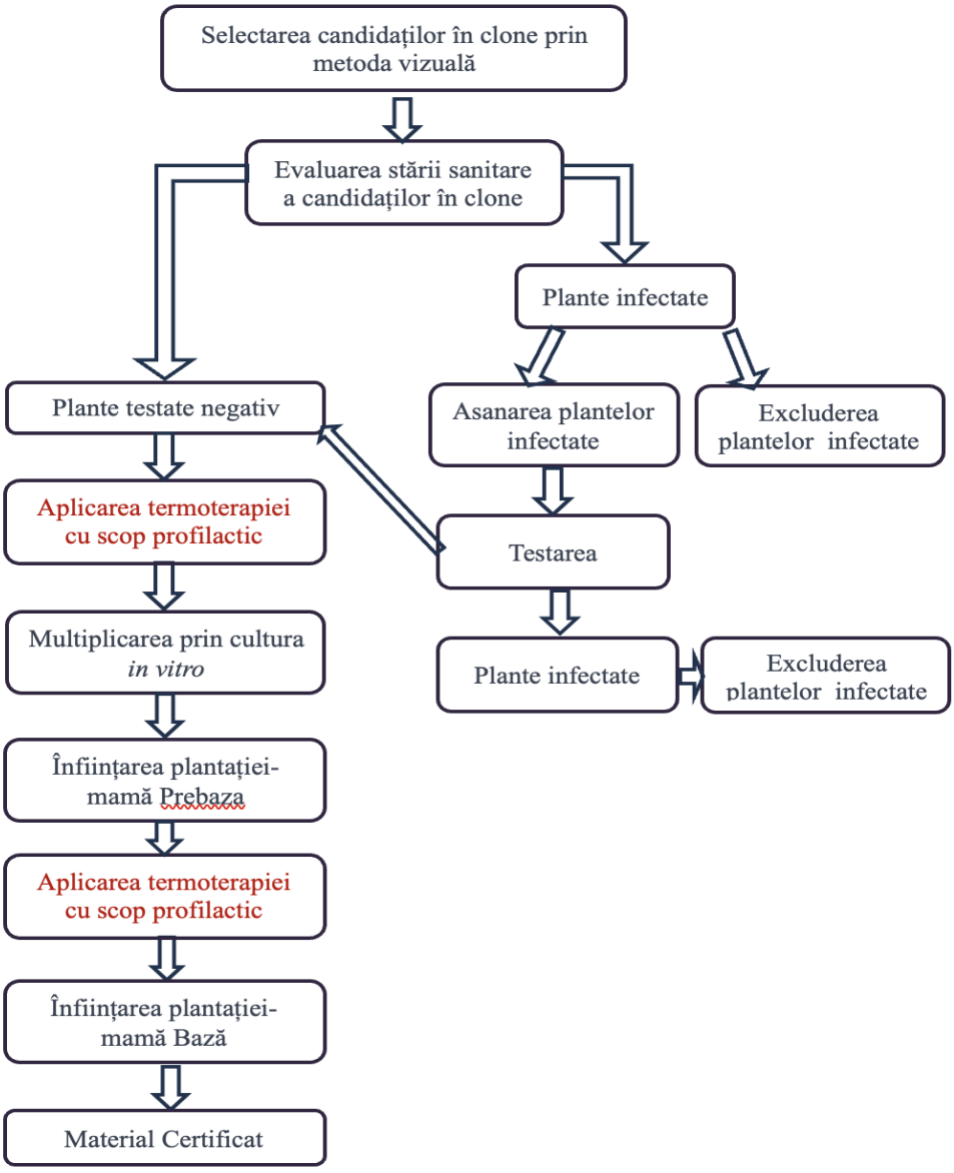

Fig. 3.17 Biotehnologia dezvoltată de obținere a clonelor asanate de viță-de-vie

Această schemă biotehnologică, adaptată cadrului normativ național și european, integrează etapele esențiale de diagnostic, asanare, multiplicare și aclimatizare, asigurând obținerea materialului biologic de categorie Prebază și Bază conform standardelor europene și normelor EPPO. Prin implementarea acestei biotehnologii integrate se creează premise reale pentru dezvoltarea durabilă a sectorului viticol, prin producerea materialului săditor sănătos și trasabil. Schema biotehnologică prezentată evidențiază succesiunea logică a etapelor de selecție, diagnostic, asanare și multiplicare, aplicate în procesul de obținere a clonelor sănătoase de viță-de-vie. Această abordare complexă facilitează implementarea metodelor moderne de biotehnologie în practica viticolă și contribuie la perfecționarea tehnologiei de producere a materialului de înmulțire de categorie biologică superioară. Comparația dintre metoda clasică și biotehnologia propusă în cadrul prezentei lucrări este prezentată în figura 3.18.

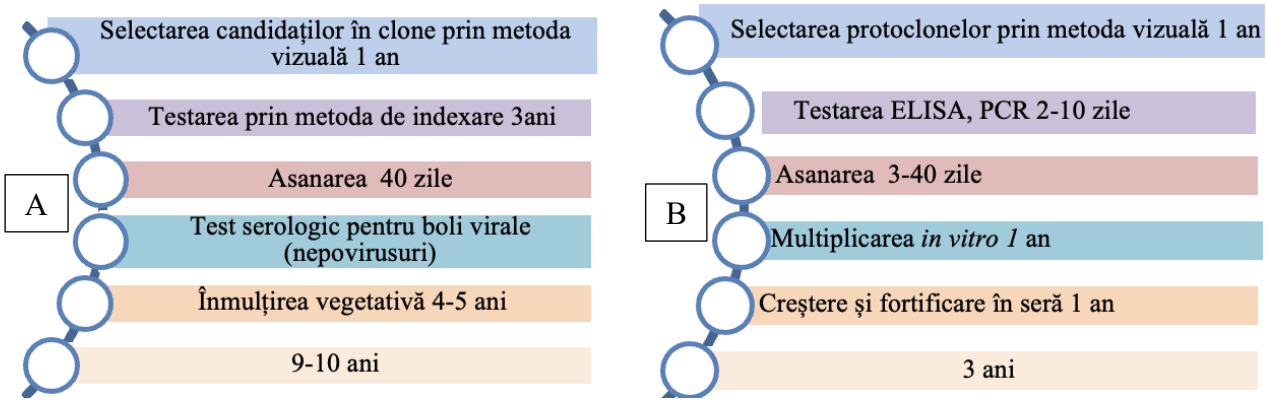

Fig. 3.18 Compararea tehnologiilor de obținere a vițelor vegetante de viță-de-vie destinate înființării plantației-mamă de categoria biologică Prebază: A – metoda aplicată în anii 1980; **B –** biotehnologia modernizată, dezvoltată în cadrul prezentei lucrări

Metoda tradițională, aplicată 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 serologic și molecular, care reduc perioada de testare la 2–10 zile, iar multiplicarea prin cultura *in vitro* și fortificarea plantelor în seră permit finalizarea ciclului complet de obținere a clonelor sănătoase în numai 3 ani. Prin integrarea acestor proceduri moderne, procesul de obținere a materialului biologic sănătos devine nu doar mai rapid, ci și mai fiabil, datorită controlului riguros al etapelor de testare și regenerare.

Comparativ cu schema aplicată în prezent în Italia, elaborată în conformitate cu standardele EPPO (PM 4/8(2)) [50, 102] și reglementările Uniunii Europene [160, 161, 162], tehnologia propusă în Republica Moldova include două etape suplimentare de termoterapie: prima – aplicată înainte de înrădăcinarea plantelor inițiale destinate multiplicării, iar cea de-a doua – înainte de altoire. Această particularitate a fost determinată de răspândirea pe larg a fitoplasmozei de tip *Bois noir* și a cancerului bacterian provocat de *A. vitis* în condițiile Republicii Moldova. Aplicarea termoterapiei la această etapă asigură eliminarea agenților patogeni din materialul infectat, contribuind la obținerea plantelor complet asanate, care pot fi ulterior utilizate pentru multiplicare și înființarea plantațiilor-mamă. Optimizarea procesului tehnologic oferă un avantaj semnificativ pentru instituțiile de cercetare și producție viticolă, contribuind la obținerea rapidă a materialului de înmulțire de categorie biologică superioară.

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.

3.8 Concluzii la capitolul 3

1. Studiile realizate au evidențiat starea fitosanitară a materialului săditor viticol utilizat în Republica Moldova, caracterizată printr-o incidență ridicată a infecțiilor virale și bacteriene. Nivelul infecțiilor virale variază între 0–100%, fiecare al cincilea butaș analizat fiind purtător de unul sau mai mulți agenți patogeni virali. În cazul infecției cu *A. vitis*, aceasta se manifestă în formă latentă, cu o incidență de până la 60%.

2. În ceea ce privește infecțiile virale, Grapevine fleck virus (GFkV) a fost cel mai frecvent identificat la soiurile de selecție nouă cu bob roșu (71,4%). Grapevine leafroll-associated virus 1 (GLRaV-1) a fost întâlnit predominant la soiurile autohtone cu bob alb (30,8%), iar GLRaV-3 – la soiurile europene cu bob roșu (40,9%). Grapevine fanleaf virus (GFLV) a fost detectat în probele de selectie noua 12,9%, iar Grapevine virus A (GVA) a fost identificat doar în soiurile autohtone, cu o incidență de 23%

3. Analiza comparativă a candidaților în clone din cele trei grupuri de soiuri de viță-de-vie – selecție nouă, autohtone și europene – a evidențiat diferențe semnificative privind incidența infecțiilor bacteriene și virale. Soiurile din selecția nouă au fost cel mai frecvent diagnosticate pozitiv cu *A. vitis*, în timp ce soiurile europene au înregistrat cele mai reduse niveluri de infecție, fiind considerate cele mai sănătoase din punct de vedere fitosanitar.

4. Tratamentul termic cu aer fierbinte (38 °C timp de 40 de zile) a demonstrat eficiență în reducerea incidenței virusurilor GFLV și GFkV, iar pentru asanarea de *A. vitis*, temperatura optimă a fost de 50–51 °C. Aceste date confirmă utilitatea tratamentelor termice în procesul de obținere a materialului viticol asanat.

5. Aplicarea metodei observației vizuale a permis selecția a 109 candidați în clone din 25 de soiuri de viță-de-vie. Dintre aceștia, 31 de plante din 23 de soiuri s-au dovedit a fi sănătoase și au fost transferate în calitate de plante inițiale (clone inițiale), reprezentând baza pentru multiplicarea materialului certificat.

6. Multiplicarea *in vitro* a permis obținerea a 7179 de plante regenerate, sănătoase și omogene genetic, utilizate pentru înființarea plantațiilor-mamă de categoria biologică Prebază. Această tehnologie s-a dovedit eficientă pentru producerea rapidă a materialului săditor viticol de calitate superioară.

7. În baza materialului viticol obținut prin metode moderne de selecție, testare și multiplicare, au fost înființate plantații-mamă de categorii biologice Prebază (3,05 ha) și Bază (12 ha), contribuind la formarea unui fond inițial pentru producerea materialului viticol certificat în conformitate cu cerințele legislației naționale.

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

Optimizarea elementelor tehnologice în procesul de obținere a materialului săditor viticol sănătos constituie o direcție prioritară de cercetare și aplicare practică, impusă de cerințele actuale privind sporirea calității, trasabilității și siguranței materialului biologic utilizat la înființarea plantațiilor viticole. În contextul răspândirii infecțiilor bacteriene și virale, precum și al cerințelor europene de certificare fitosanitară, se impune revizuirea și perfecționarea etapelor tehnologice cheie implicate în producerea clonelor asanate de viță-de-vie.

Una dintre problemele identificate este utilizarea metodelor microbiologice clasice pentru diagnosticarea cancerului bacterian, care nu asigură o diferențiere clară între tulpinile patogene și cele nepatogene de *Allorhizobium vitis* și *Agrobacterium tumefaciens*. În acest sens, aplicarea metodei *PCR* oferă o soluție eficientă pentru diagnosticarea rapidă și precisă, contribuind la excluderea plantelor infectate din circuitul de multiplicare [78].

Un alt factor-cheie, care influențează eficiența regenerării *in vitro*, este iluminarea artificială. Spectrul și intensitatea luminii LED pot afecta semnificativ procesele de rizogeneză, morfogeneză și acumularea biomasei [67]. Studiile efectuate au vizat identificarea tipului de iluminare cel mai potrivit pentru a asigura o dezvoltare armonioasă a plantelor de viță-de-vie în condiții controlate de laborator. Un alt factor determinant în succesul multiplicării îl reprezintă compoziția mediilor nutritive. În cadrul cercetărilor au fost testate diferite variante hormonale, iar rezultatele au permis identificarea combinațiilor optime pentru stimularea regenerării și dezvoltării morfologice a plantelor. Pentru etapa de aclimatizare, a fost studiată eficiența substratului de ioniți „Biona-311”, care a favorizat o tranziție treptată la condițiile *ex vitro* și o rată de supraviețuire ridicată, comparativ cu metodele tradiționale.

Prin urmare, capitolul curent sintetizează rezultatele obținute în cadrul optimizării etapelor-cheie ale procesului de producere a materialului săditor asanat de viță-de-vie, cu accent pe implementarea unor soluții aplicabile în practică și aliniate standardelor moderne de calitate.

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

Rezultatele testărilor efectuate în perioada 2018–2023 în cadrul laboratorului de Virusologie și Control Fitosanitar a Culturilor Horticole, pe probe de material săditor viticol prelevate din diverse regiuni ale Republicii Moldova, au evidențiat o răspândire semnificativă a bacteriilor ce provoacă cancerul bacterian (tabelele 3.4–3.6).

Cancerul bacterian, care este o boală cronică a viței-de-vie, este cauzat de bacteriile din genurile *Allorhizobium*, uneori *Agrobacterium* și, mai rar, *Rhizobium* toate încadrate anterior în așa-numitul „complex *Agrobacterium spp*”, utilizat tradițional pentru bacteriile asociate cu bolile tumorale ale plantelor. Această boală prezintă un pericol major, în special în cazul tulpinilor patogene, care pot infecta plantele fără a produce simptome vizibile, complicând identificarea și eliminarea materialului contaminat [78]. Patogenitatea tulpinilor de *Allorhizobium vitis* (anterior cunoscut ca *Agrobacterium vitis*) și *Agrobacterium tumefaciens* este asociată cu prezența plasmidei de tip Ti (*tumor-inducing*), responsabilă de transferul unui segment de ADN (T-ADN) în genomul celulei plantei gazdă în timpul infecției. Acest proces determină formarea tumorilor caracteristice cancerului bacterian. Plasmida pTi codifică și sinteza unor compuși specifici – opinele – care sunt utilizate de bacterii ca sursă de carbon și azot, facilitând astfel supraviețuirea și înmulțirea lor în țesuturile vegetale infectate. În Republica Moldova, identificarea bacteriilor patogene din complexul *Agrobacterium spp* 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 [43]. 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 (PCR), care oferă o sensibilitate și specificitate superioare comparativ cu tehnicile tradiționale [128]. În acest context, implementarea tehnicilor moderne de diagnostic molecular a devenit indispensabilă pentru evaluarea stării fitosanitare a materialului viticol și pentru identificarea formelor latente de infecție.

În procesul de obținere a clonelor asanate, s-a constatat că unii candidați în clone, aparent sănătoși din punct de vedere vizual, pot fi infectați latent. Aceste observații sunt în concordanță cu rezultatele altor cercetători, care au demonstrat că prezența latentă a bacteriilor fitopatogene în materialul săditor viticol poate rămâne nedetectată în absența testărilor de laborator, reprezentând un risc pentru perpetuarea infecțiilor în plantațiile-mamă și în materialul de înmulțire [127]. Lipsa simptomelor vizibile poate rezulta fie din infecții cu tulpini nepatogene, fie din condiții de mediu, care nu favorizează dezvoltarea tumorilor, cum ar fi schimbările climatice recente, care au redus frecvența înghețurilor în Republica Moldova. Cu toate acestea, boala rămâne latentă și poate reîncepe să se manifeste atunci când condițiile sunt favorabile, iar reproducerea vegetativă din plantele infectate duce la răspândirea bolii în plantațiile viticole noi.

Scopul acestui studiu a fost evaluarea și implementarea metodei moleculare de diagnostic al cancerului bacterian la materialul viticol, în vederea identificării rapide și precise a plantelor infectate latent și excluderii acestora din circuitul de multiplicare.

În acest context, au fost selectate 6 soiuri și elite de viță-de-vie din plantațiile experimentale de soiuri ale IP INCAAMV, cu o vârstă de peste 30 de ani, care s-au evidențiat printr-o creștere viguroasă, capacitate de rodire constantă și absența simptomelor vizibile de cancer bacterian. Aceste plante au fost incluse în procesul de selecție fitosanitară și supuse testării pentru depistarea infecțiilor latente cu cancer bacterian. În acest scop, au fost prelevate vițe în vârstă de un an, provenite de la plante aparent sănătoase, fără semne externe de tumori sau deformări ale țesuturilor. Secțiunile prelevate au fost curățate de scoarță, fragmentate în segmente de 3–5 mm și supuse sterilizării de suprafață, pentru a evita contaminarea externă în timpul izolării bacteriilor endofite. După însămânțare, izolatele bacteriene au fost incubate timp de 7 zile la 27 °C, pentru evaluărea prezenței coloniilor caracteristice de *Agrobacterium spp*.

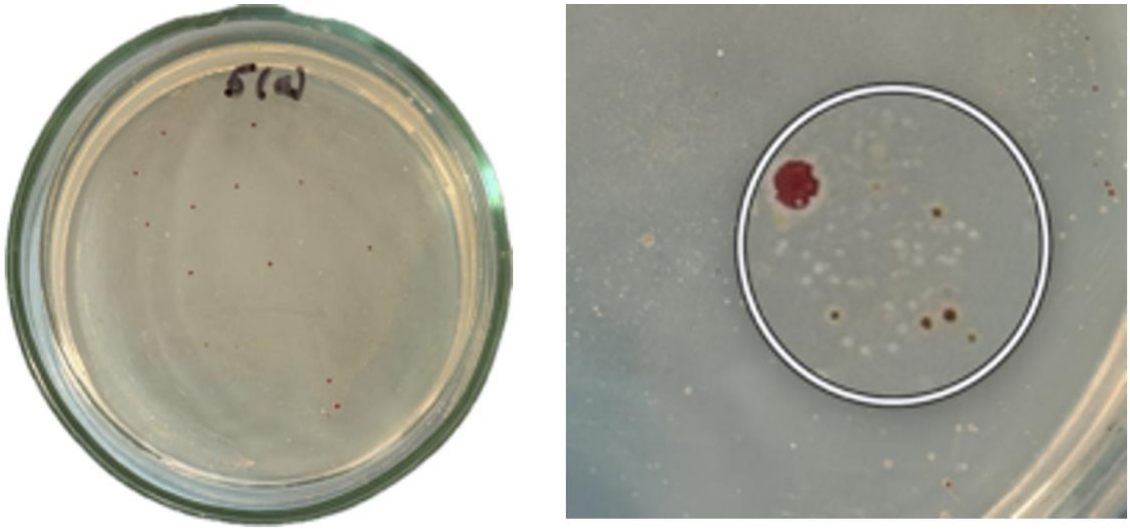

Fig. 4.1 Coloniile de bacterii din complexul *Agrobacterium spp* pe mediul selectiv [132]

După cum se poate observa în figura 4.1, 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 [132]. Rezultatele izolării sunt prezentate în tabelul 4.1.

Tabelul 4.1 Rezultatele determinării prezenței bacteriei *Agrobacterium spp*. prin metoda microbiologică

Nr. crt.	Soi, elită de viță-de-vie	Identificatorul	Rezultatele testării microbiologice
1	Basarabia	36(37)	Pozitiv
2	II_2-13-66	CC-IV-3	Pozitiv
3	IV-32-75	V -26	Pozitiv
4	BU-24-6-4	IV -32	**Negativ**
5	Apiren roz	CC-IV-21	Pozitiv
6	Meleag	II-19-7	Pozitiv

Notă: Pozitiv – prezența bacteriei A. vitis; Negativ – absența bacteriei *A. vitis* în probele analizate.

După cum se poate observa din tabelul 4.1, plantele infectate au fost cele ale soiurilor Basarabia, Apiren roz, Meleag și ale elitelor de viță-de-vie II_2-13-66 și IV-32-75. Varianta testată BU-24-6–4 a prezentat rezultat negativ. Deși nu s-au observat formațiuni tumorale vizibile în momentul prelevării probelor, prezența bacteriilor a fost confirmată microbiologic. Probele testate pozitiv au fost ulterior supuse testării prin metoda PCR.

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. 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 *Agrobacterium vitis* sau *Agrobacterium tumefaciens*, ci și identificarea precisă a tipului de plasmidă Ti prezentă în izolat. Rezultatele testării celor cinci izolate de *Agrobacterium spp*. prin metoda PCR sunt prezentate în figura 4.2.

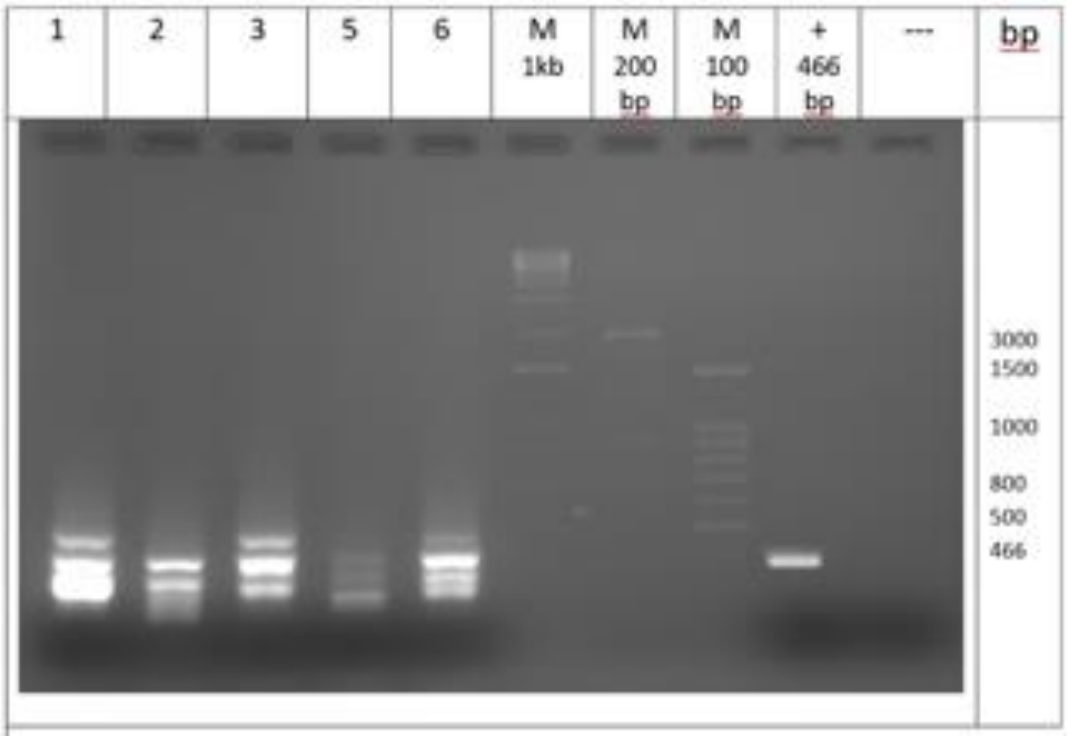

Fig. 4.2 Electroforegrama obținută în urma reacției PCR pentru identificarea tulpinilor de *A. vitis* şi *A. tumefaciens*. M – marker de greutate moleculară (1 kb, 200 pb, 100 pb); • – control pozitiv pentru fragmentul pehA (466 pb)

Electroforegrama din figura 4.2 prezintă rezultatele reacției PCR aplicate pe cinci izolate bacteriene (1, 2, 3, 5 și 6), folosind trei perechi de primeri specifici. Toate izolatele au prezentat o bandă de 466 pb, ceea ce confirmă că aparțin speciei *Agrobacterium vitis*. În probele 1, 5 și 6 au fost detectate și fragmentele de 382 pb și 320 pb, asociate cu genele *virF* și *virD*, indicând prezența plasmidei *pTi* și caracterul patogen al acestor tulpini. Proba 2 a conținut fragmentele *pehA* și *virF*, iar proba 3 – *pehA* și *virD*, ceea ce sugerează existența unor plasmide diferite, dar cu potențial patogen. Controlul pozitiv (+) a confirmat amplificarea genei *pehA*, iar pentru a estima dimensiunea fragmentelor de ADN au fost utilizați markeri moleculari (M).

Aceste rezultate confirmă că toate izolatele testate sunt patogene, deși diferă între ele prin structura plasmidei *pTi*. Astfel, bacteriile provenite din plante aparent sănătoase de viță-de-vie au fost clasificate ca *A. vitis*, purtătoare de plasmide *pTi* cu regiunile codante pentru sinteza de opine, ceea ce în condiții favorabile poate conduce la manifestarea simptomelor cancerului bacterian. Rezultatele diagnosticării sunt prezentate în tabelul 4.2.

Tabelul 4.2 Rezultatele identificării moleculare a izolatelor bacteriene prin metoda PCR

Nr. crt.	*A.vitis* (466 pb.)	*A.tumefaciens*	Napoline, octopine (*pTi* 382 pb)	Vitopine (*pTi* 320 pb)	Patogenitatea
1	+	-	+	+	+
2	+	-	+	-	+
3	+	-	-	+	+
5	+	-	+	+	+
6	+	-	+	+	+

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

Rezultatele testării prin metoda PCR a celor cinci izolate bacteriene evidențiază că toate probele analizate aparțin speciei *Agrobacterium vitis*, confirmată prin prezența genei *pehA* (466 pb). Niciun izolat nu a conținut markeri specifici pentru *Agrobacterium tumefaciens*, ceea ce indică absența acestei specii în materialul studiat. În toate cazurile a fost detectată patogenitatea, demonstrată prin prezența fragmentelor corespunzătoare plasmidei *pTi*. Diversitatea fragmentelor identificate *virF* și *virD* reflectă variabilitatea plasmidelor *pTi* (tip nopaline/octopine și vitopine), ceea ce sugerează existența unor tulpini patogene cu potențial diferit de manifestare a bolii.

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 *Agrobacterium vitis* și *Agrobacterium tumefaciens*, prin detecția directă a plasmidei *pTi*. Prin detectarea genelor asociate virulenței (*pehA, virF, virD*), metoda dată elimină dificultățile de interpretare specifice metodelor tradiționale, care necesită timp îndelungat și pot conduce la erori de diagnostic. Astfel, implementarea PCR în procesul de obținere a clonelor

asanate de viță-de-vie reprezintă o soluție eficientă și sigură pentru producerea unui material săditor viticol de înaltă calitate.

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

Cultura *in vitro* reprezintă o metodă de multiplicare a plantelor desfășurată în condiții de laborator strict controlate și este utilizată în scopuri variate, precum propagarea rapidă și asanarea materialului biologic. Dezvoltarea plantelor în mediu controlat este influențată atât de compoziția substanțelor nutritive din mediul de creștere, cât și de condițiile camerei culturale, cum ar fi temperatura și sursa de lumină. Dintre factorii exogeni, lumina constituie unul dintre principalii determinanți ai proceselor de creștere și morfogeneză, influențând direct fotosinteza, elongarea internodurilor și formarea sistemului radicular.

Rezultatele cercetărilor recente privind influența spectrului luminos asupra dezvoltării plantelor cultivate în condiții controlate au evidențiat rolul esențial al compoziției luminii în reglarea proceselor morfologice, fiziologice și moleculare [147]. În special, utilizarea surselor LED permite o personalizare precisă a intensității și spectrului luminii, ceea ce contribuie la optimizarea procesului de multiplicare [69, 165]. Deși au fost obținute date în diferite specii horticole, cercetările privind vița-de-vie în acest context sunt încă limitate [53, 133].

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. Studiul a fost axat pe analizarea performanței plantelor cultivate sub influența a trei tipuri de corpuri de iluminat cu spectre diferite, în condiții controlate de laborator, care au permis monitorizarea parametrilor de creștere și dezvoltare.

Pentru caracterizarea mediului luminos, au fost efectuate măsurări fotometrice detaliate ale fiecărui corp de iluminat utilizat, care au inclus temperatura de culoare (K), fluxul de radiație fotosintetic activă (PPFD) și integrala zilnică de lumină (DLI). Valorile obținute au fost utilizate pentru corelarea intensității și calității luminii cu dinamica proceselor de fotosinteză și ritmul de creștere al plantelor cultivate în condiții controlate de laborator (tabelul 4.3). Aceste determinări au permis o evaluare complexă a influenței fiecărui spectru asupra dezvoltării plantelor *in vitro*.

Tabelul 4.3 Rezultatele măsurărilor fotometrice a surselor de iluminare utilizate

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

După cum se observă din tabelul 4.3, corpul de iluminat alb-rece a furnizat cea mai înaltă temperatură de culoare măsurată (6000K) și cele mai mari valori pentru PPFD (63 $\mu mol \cdot s^{-1} \cdot m^{-2}$) și DLI (4.05 $mol \cdot m^{-2} \cdot d^{-1}$). În contrast, corpul de iluminat „Fito" a avut cea mai scăzută temperatură (1700K) și, respectiv, cele mai mici valori pentru PPFD (25 $\mu mol \cdot s^{-1} \cdot m^{-2}$) și DLI (1.64 $mol \cdot m^{-2} \cdot d^{-1}$). Iluminarea alb-caldă s-a situat între aceste extreme, cu o temperatură de aproximativ 3000 K, PPFD de 44 $\mu mol \cdot s^{-1} \cdot m^{-2}$ și DLI de 2,84 $mol \cdot m^{-2} \cdot d^{-1}$, reflectând un nivel intermediar de intensitate luminoasă și de eficiență fotosintetică.

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.

Repartizarea echilibrată a acestor componente spectrale determină eficiența proceselor fotosintetice și influențează direct morfogeneza și creșterea plantelor cultivate *in vitro*. În cadrul studiului, spectrele de emisie ale surselor de lumină utilizate au fost determinate prin măsurători fotometrice, în condițiile specifice laboratorului (fig. 4.3). Analiza distribuției radiației fotosintetic active la nivelul suprafeței de cultură a evidențiat o repartiție 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 [55]. Spectrele de emisie obținute pentru cele trei corpuri de iluminat utilizate sunt prezentate în figura 4.3.

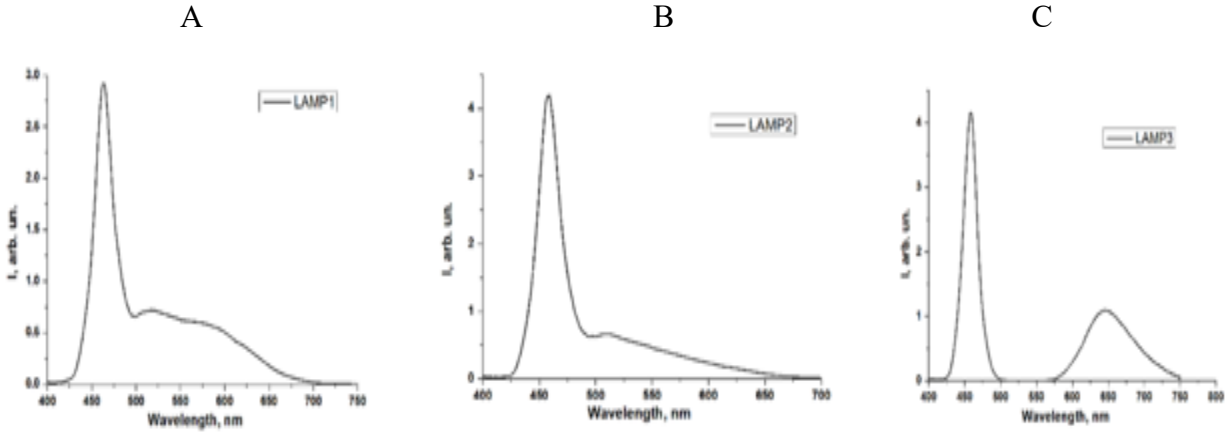

Fig. 4.3 Spectrele de emisie a corpurilor de iluminat utilizate. A – spectrul corespunde corpului de iluminat „alb-cald"; **B** – spectrul corespunde corpului de iluminat „alb-rece"; **C** – spectrul corespunde corpului de iluminat cu nuanță „Fito".

Analiza acestor spectre relevă diferențe semnificative în compoziția spectrală a fiecărei surse de lumină. 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 în apropierea limitei spectrului vizibil (750 nm). Acest tip de spectru, care combină albastru și roșu, este utilizat în sistemele moderne de iluminare pentru culturile *in vitro*, datorită capacității sale de a stimula fotosinteza și procesele morfogenetice ale plantelor [53].

Spectrele de emisie analizate arată diferențe clare între cele trei surse de lumină, fiecare având o distribuție specifică a radiației în domeniul PAR. Aceste informații sunt importante pentru a înțelege mai departe cum poate influența fiecare tip de iluminare dezvoltarea plantelor.

În condiții de cultură *in vitro*, intensitatea și calitatea luminii influențează direct procesele de regenerare și dezvoltare ale plantelor, determinând ritmul general de creștere al acestora [170]. Un parametru esențial pentru caracterizarea mediului luminos este densitatea fluxului de fotoni fotosintetici (PPFD), care indică cantitatea de radiație fotosintetic activă disponibilă pe suprafața de cultură într-un interval de timp determinat. În producția de plante, fiecare specie de plantă necesită ca densitatea optimă a PPFD să fie determinată [12, 111].

Analiza distribuțiilor de suprafață a parametrului PPFD a fost realizată pentru a evalua uniformitatea iluminării și a evidenția diferențele dintre sursele de lumină utilizate în experiment. Spre deosebire de cultura în seră, unde plantele sunt expuse la un spectru luminos mai variabil și la intensități ridicate, cultura in vitro presupune un mediu luminos redus, dar constant. Aceste niveluri scăzute de lumină, combinate cu aportul de carbohidrați din mediul nutritiv, sunt suficiente pentru inițierea morfogenezei și dezvoltarea lăstarilor [59]. Prin urmare, analiza comparativă a spectrelor de emisie permite corelarea compoziției luminii cu procesele de fotosinteză, regenerare și dezvoltare a plantelor în condiții de cultură *in vitro*.

Literatura de specialitate evidențiază că nivelul optim al PPFD pentru majoritatea plantelor erbacee în cultură *in vitro* se situează între 30–40 μmol·m^{-2}·s^{-1}, cu variații în funcție de specie, stadiul fenologic și compoziția mediului de cultură [137]. De asemenea, intensitatea luminii reglează procese morfologice și fiziologice importante, influențând expresia genică, ritmul de creștere, ramificarea și dezvoltarea aparatului vegetativ [164].

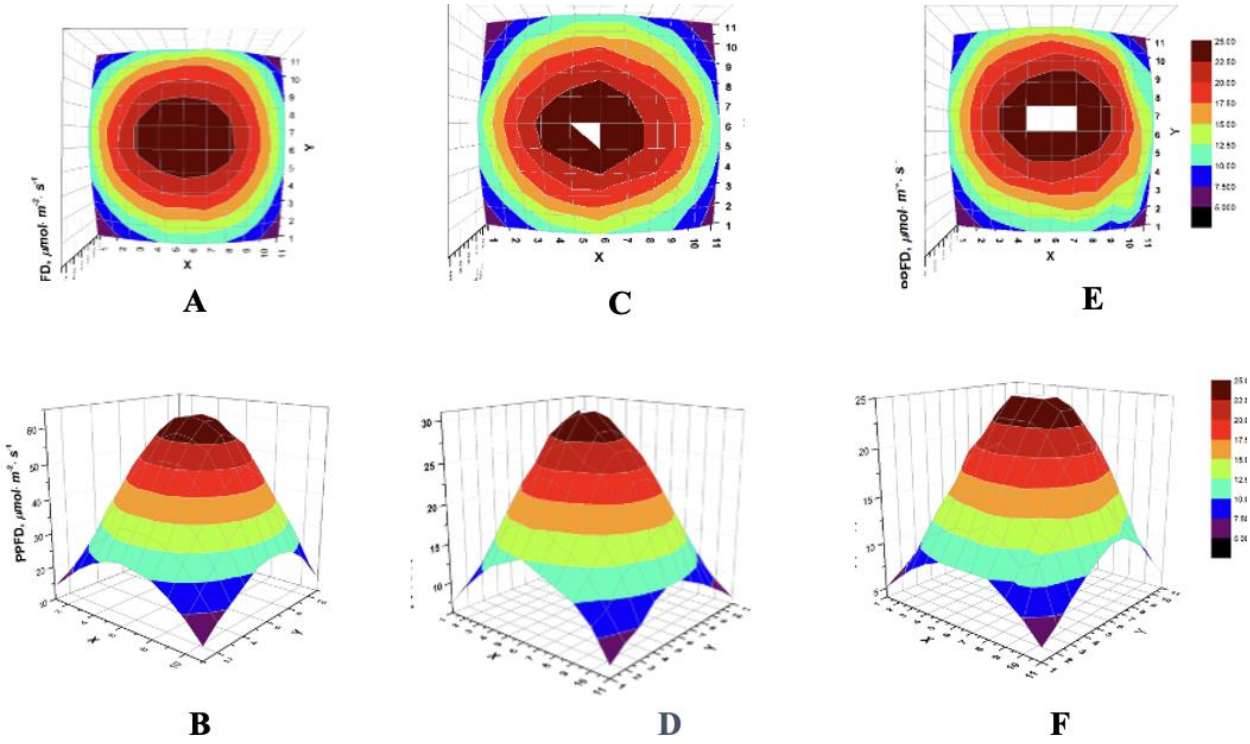

Fig. 4.4 Distribuțiile de suprafață a parametrului PPFD

A, **B** – „alb-rece”; **C**, **D** –„alb-cald”; **E**, **F** – „Fito”.

Comparând valorile PPFD prezentate în pentru cele trei corpuri de iluminat, pe aceeași suprafață de măsurare (1650 mm × 880 mm), se remarcă diferențe semnificative în ceea ce privește cantitatea și distribuția luminii disponibile pentru plante (fig. 4.4). Pentru iluminarea cu sursa „alb-rece” (fig. 4.4 A, B), au fost înregistrate cele mai mari valori ale PPFD, cuprinse între 14 și 63 μmol·s^{-1}·m^{-2}, evidențiind un potențial ridicat de stimulare a proceselor fotosintetice. În același timp, distribuția fluxului de lumină a fost neuniformă, cu o concentrare evidentă în zona centrală și o scădere graduală spre periferie. În cazul sursei „alb-cald” (fig. 4.4 C, D), valorile PPFD au fost mai reduse, atingând un maxim de 30 μmol·s^{-1}·m^{-2}. Distribuția luminii a fost eterogenă, dar cu o zonă centrală de iluminare mai restrânsă. Iluminarea de tip „Fito” a generat cele mai scăzute niveluri ale PPFD, cuprinse între 5,4 și 25 μmol·s^{-1}·m^{-2} (fig. 4.4 E, F). Distribuția fotonilor a fost puternic concentrată în zona centrală, cu scăderi abrupte spre margini.

Analiza distribuției parametrului PPFD pentru cele trei corpuri de iluminat utilizate în studiu a evidențiat diferențe semnificative atât în intensitatea luminoasă oferită, cât și în

uniformitatea acesteia pe suprafața de cultură. Sursa de lumină „alb-rece” a furnizat cele mai ridicate valori ale PPFD (până la 63 $\mu mol \cdot s^{-1} \cdot m^{-2}$) asigurând condiții optime pentru desfășurarea proceselor fotosintetice ale plantelor. Iluminarea „alb-cald” a generat niveluri moderate de PPFD, iar sursa „Fito” a înregistrat cele mai scăzute valori ale PPFD (25 $\mu mol \cdot s^{-1} \cdot m^{-2}$).

Analiza distribuțiilor de suprafață a parametrului DLI. Integrala zilnică a luminii este un parametru esențial în evaluarea cantității totale de radiație fotosintetic activă primită de plante într-un interval de 24 de ore. Numeroase cercetări au arătat că un nivel optim al DLI favorizează procesele fiziologice esențiale ale plantelor, cum ar fi acumularea de biomasa a părților aeriene și subterane [144, 168], formarea frunzelor, îngroșarea tulpinilor [14], precum și diferențierea mugurilor florali [26]. În condiții de iluminare artificială, valoarea DLI este determinată exclusiv de parametrii lămpilor utilizate, fiind influențată de intensitatea luminii și durata fotoperioadei. Pentru fiecare specie și tip de cultură *in vitro*, este necesară determinarea unui interval optim de DLI care să favorizeze procesele de creștere și dezvoltare ale plantelor.

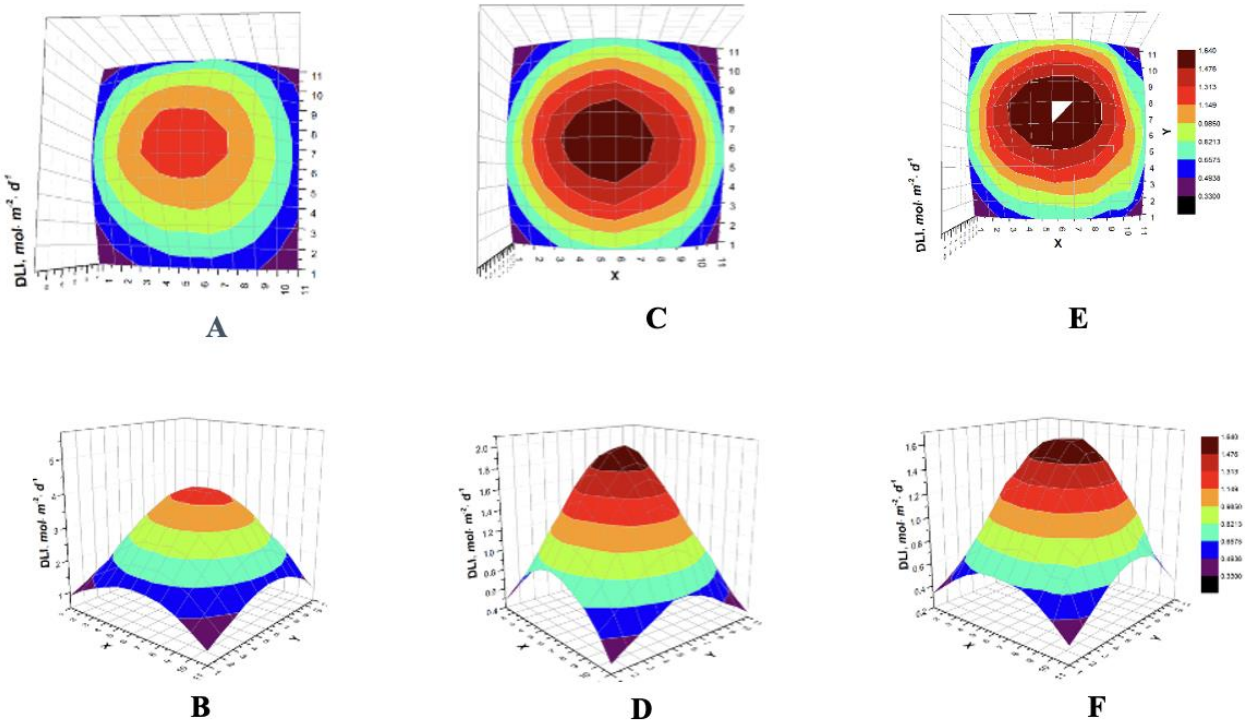

Fig. 4.5 Distribuția de suprafață a parametrului DLI

A, B – „alb-rece”; **C, D** – „alb-cald”; **E, F** – „Fito".

Analizând distribuțiile de suprafață ale parametrului DLI prezentate în figura 4.5, se evidențiază diferențe semnificative între cele trei surse de iluminat testate în cadrul studiului. Iluminarea de tip „alb-rece” a generat cele mai mari valori ale integralei zilnice de lumină, cu un maxim de 5,54 $mol \cdot m^{-2} \cdot zi^{-1}$, ceea ce reflectă o intensitate luminoasă superioară și o acoperire mai uniformă a zonei cultivate. Sursele de tip „alb-cald” au înregistrat un DLI maxim de 2,04

mol·m^{-2}·zi^{-1}, situându-se la un nivel intermediar, în timp ce sursa „Fito” a atins cele mai scăzute valori ale parametrului, cu un maxim de 1,64 mol·m^{-2}·zi^{-1}.

Rezultatele analizei parametrului DLI pentru cele trei surse de iluminat testate au evidențiat diferențe evidente în ceea ce privește cantitatea totală de radiație fotosintetic activă oferită pe parcursul fotoperioadei. Sursa cu spectru „alb-rece” a generat cele mai mari valori ale DLI, urmată de „alb-cald” și „Fito”, cu cel mai redus nivel de iluminare zilnică acumulată.

Impactul spectrului de iluminare asupra rizogenezei și morfogenezei la vitroplantele de viță-de-vie. În cadrul studiului realizat, s-a analizat modul în care diferitele spectre de iluminare afectează formarea rădăcinilor la plantele cultivate de viță-de-vie *in vitro*. Rezultatele obținute confirmă că spectrul de lumină influențează semnificativ atât inițierea procesului de rizogeneză, cât și rata finală de înrădăcinare a plantulelor.

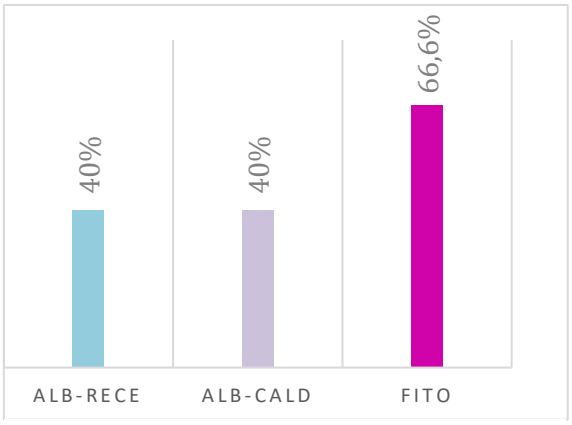

Fig. 4.6 Numărul de explante care au inițiat formarea rădăcinilor după 14 zile de cultură *in vitro*

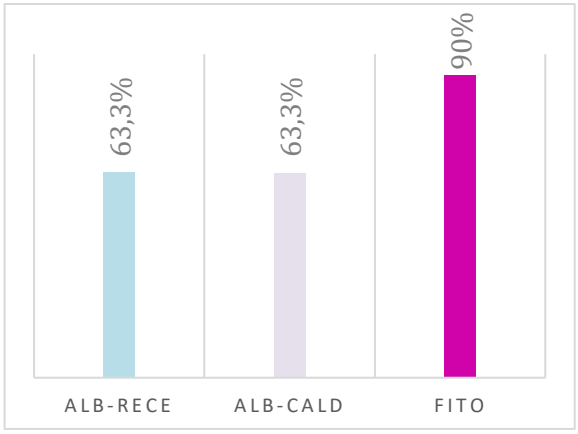

Fig. 4.7 Numărul de plante complet înrădăcinate după 30 de zile de cultură *in vitro*

Rezultatele obținute după 14 zile de cultură au arătat că spectrul de lumină emis de corpul „Fito” a favorizat inițierea procesului de rizogeneză, cu o rată de înrădăcinare de 66,6%. În condițiile de iluminare cu „alb-rece” și „alb-cald”, procesul de diferențiere a sistemului radicular s-a manifestat mai lent, obținându-se un procent de 40% de plante înrădăcinate (fig. 4.6). După 30 de zile de la inoculare, procentul plantelor înrădăcinate a crescut în toate variantele experimentale, însă diferențele între sursele de lumină au rămas evidente. Cea mai înaltă rată de înrădăcinare a fost înregistrată în varianta „Fito” – 90±0.18%, urmată de variantele „alb-rece” și „alb-cald”, fiecare cu 63,3±0.49% (fig. 4.7). Rezultatele obținute confirmă rolul pozitiv al radiației roșii și albastre în stimularea procesului de rizogeneză, în concordanță cu datele din literatura de specialitate [106]. Analiza parametrilor morfologici a aratat că plantele crescute sub acest tip de lumină au avut cele mai reduse performanțe din punct de vedere vegetativ (tabelul 4.4).

Tabelul 4.4 Parametrii morfologici medii pentru plantele de viță-de-vie cultivate 30 zile în condiții *in vitro*

Surse de lumină	Plante înrădăcinate (%)	Calus (%)	Internoduri (nr)	Frunze (nr)	Înălțimea plantei (cm)	Lungimea rădăcinilor (cm)	Suprafața frunzei (cm^2)
„alb rece”	63.3±0.49b	0	6.36±3.1ab	6.04±2.8ab	6.04±3.1b	13.63±9.3a	2±0.87a
„alb cald”	63.3±0.49b	36.6	7.68±2.8b	7.84±3.8b	6.6±2.7b	20.68±13.5b	1.27±0.6b
„Fito"	90±0.18a	0	5.4±1.6a	6.1±2.0a	4.2±1.8a	11.67±7.4a	1.12±0.48a

Notă: Valorile sunt prezentate ca medie ± abaterea standard. Literele a, b indică diferențe semnificative statistic între variante, conform testului post-hoc ($P < 0,05$). Valorile care au litere diferite pe aceeași coloană sunt semnificativ diferite între ele.

Rezultatele sunt în concordanță cu studiile realizate anterior, care menționează că lumina cu spectru îngust, de tip roșu-albastru, stimulează formarea rădăcinilor, dar poate limita dezvoltarea lăstarilor [145]. În cazul nostru, plantele de viță-de-vie cultivate sub lumină „Fito” au prezentat internoduri inegale, un număr mai mic de frunze și dimensiuni reduse ale acestora, în comparație cu cele crescute sub iluminare „alb-rece”.

După 30 de zile de cultură, datele prezentate în tabelul 4.4 arată, că sursele de iluminare au avut efecte diferite asupra înrădăcinării și creșterii plantelor cultivate *in vitro*. Iluminarea „alb-cald” a contribuit la formarea unui număr mare de internoduri (7,68) și cele mai lungi rădăcini (20,68 cm), dar a fost însoțită de formarea de calus în proporție de 36,6% și frunze de dimensiuni mici (1,27 cm^2). Deși creșterea a fost activă, aspectul general al plantelor a fost dezechilibrat, ce sugerează o repartizare neuneformă a resurselor.

Sursa „alb-rece” a favorizat o dezvoltare echilibrată: frunze cu cea mai mare suprafață (2,0 cm^2), lăstari bine formați, fără calus și o rată de înrădăcinare de 63,3%. Aceste rezultate sunt asociate cu valorile cele mai ridicate ale parametrilor de iluminare (6000K, PPFD = 63, DLI = 4,05), care au oferit condiții bune pentru fotosinteză și creștere.

Sursa „Fito” a oferit cele mai bune rezultate pentru înrădăcinare (90%), dar a limitat dezvoltarea părților aeriene: plantele au avut lăstari mai scurți, mai puține frunze și o suprafață foliară mai mică (1,12 cm^2), evidențiind influența luminii asupra morfogenezei.

Analiza statistică a datelor. Datele inițiale obținute în cadrul celor trei repetiții pentru fiecare sursă de lumină sunt prezentate în Anexa 8. Pentru evaluarea semnificației influenței spectrelor de lumină LED asupra parametrilor morfologici și fiziologici analizați, a fost aplicată analiza dispersională univariată ANOVA (Anexa 9). Rezultatele obținute arată că lumina LED a avut o influență slab-moderată asupra procesului de rizogeneză, cu un grad de influență $\eta = 0.28$ (28%), valoare care, conform scalei Chaddock, se încadrează în intervalul 0.1–0.3. Datele statistice complete sunt prezentate în tabelul 4.5.

Tabelul 4.5 Datele statistice obținute prin analiză dispersională univariată

Parametru	p-value	F calculat	F critic	η (gradul de influență)	H_0 Ipoteza nulă
Procesul de rizogeneză	0.028	3.7	3.1	0.28	Respinsă
Suprafața foliară	0.019	4.17	3.15	0.34	Respinsă
Înălțimea plantei	0.004	5.81	3.14	0.39	Respinsă
Lungimea rădăcinilor	0.66	0.17	3.1	0.07	Adevărată

Notă: p-value – probabilitatea de semnificație; F calculat – valoarea obținută prin testul Fisher; F critic – valoarea critică a testului Fisher pentru nivelul de semnificație ales; η – coeficientul de determinare (gradul de influență al factorului asupra caracterului analizat); H_0 – ipoteza nulă (acceptată dacă F calculat < F critic și p > 0,05).

Dintre parametrii analizați, înălțimea plantelor a prezentat cea mai puternică corelație cu tipul de iluminare, cu un grad de influență de 39%. De asemenea, s-a constatat că suprafața frunzelor este afectată într-o măsură moderată de spectrul de lumină, cu $\eta = 0.34$ și $p = 0.019$. Lungimea rădăcinilor nu a fost influențată semnificativ de spectrul de lumină LED utilizat, ipoteza nulă fiind acceptată ($p = 0.66$), ceea ce sugerează că acest parametru este controlat de alți factori fiziologici sau de compoziția mediului de cultură.

Spectrele de emisie ale surselor de iluminat utilizate în cadrul studiului au prezentat caracteristici distincte, cu impact diferit asupra dezvoltării vitroplantelor de viță-de-vie. Corpurile de iluminat cu lumină „alb-rece” și „alb-cald” au generat un spectru larg, cuprins între 460 și 700 nm, acoperind zonele albastră, verde, galbenă, portocalie și roșie, însă cu intensități variabile în domeniul spectral verde-roșu. Spre deosebire de acestea, corpul de iluminat „Fito” a emis predominant în regiunile albastră și roșie, cu un maxim în apropierea $\lambda = 465$ nm și un al doilea maxim în zona roșie ($\lambda = 650$ nm), incluzând și radiație din spectrul infraroșu apropiat (>700 nm), dar cu absența totală a radiației în intervalul 500–575 nm.

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 $\mu mol \cdot s^{-1} \cdot m^{-2}$), 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 [53].

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, tipul de lumină LED influențează diferit rizogeneza și morfogeneza în culturile *in vitro* de viță-de-vie. Se recomandă utilizarea spectrului „Fito" pentru inițierea înrădăcinării, urmată de trecerea la iluminare „alb-rece" pentru susținerea creșterii vegetative și pregătirea plantulelor pentru aclimatizare.

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

Pe lângă compoziția chimică a mediului nutritiv, un rol esențial în succesul culturii in vitro îl are echilibrul fitohormonal, determinat de raportul dintre auxine și citokinine, care controlează procesele morfogenetice – regenerarea lăstarilor, formarea rădăcinilor și inducerea calusului. Stabilirea unui raport optim între regulatorii de creștere constituie o condiție fde bază pentru obținerea unor vitroplante viabile, stabile și cu potențial ridicat de aclimatizare.

Procesul de multiplicare accelerată a plantelor de viță-de-vie se desfășoară, în mod obișnuit, în patru etape distincte: inocularea explantului pe mediu nutritiv în cultura *in vitro*; etapa de micropropagare propriu-zisă, în care se urmărește obținerea unui număr maxim de clone; înrădăcinarea lăstarilor multiplicați *in vitro*; în final, adaptarea plantelor la condițiile *ex vitro*. Fiecare etapă a procesului are un rol decisiv în obținerea unui rezultat bun, iar alegerea corectă a mediului nutritiv reprezintă un factor-cheie pentru reușită.

Încă de la inocularea explanturilor în mediul de cultură *in vitro*, apar dificultăți legate de specificitatea reacțiilor morfologice și organogenetice ale diferitelor soiuri de viță-de-vie la fitohormoni, vitamine, macro- și microelemente, precum și la combinațiile acestora. Fiecare soi cultivat poate răspunde diferit la componentele mediului nutritiv, ceea ce face necesară o selecție individualizată a acestor elemente și a proporțiilor lor pentru a optimiza creșterea și dezvoltarea explanturilor [17]. Această particularitate impune testarea mai multor variante de mediu nutritiv pentru a identifica combinațiile optime care favorizează regenerarea și multiplicarea *in vitro*, asigurând totodată stabilitatea morfologică a plantelor obținute.

O altă provocare majoră este adaptarea plantelor cultivate *in vitro* la condițiile *ex vitro*, care prevede trecerea de la un mediu steril, controlat, la un mediu extern cu variații semnificative. La această fază, un procent semnificativ de plante nu reușește să se adapteze, iar conform datelor din literatura de specialitate, rata de supraviețuire a vitroplantelor poate scădea până la 25% în etapa de aclimatizare [190]. Cauza principală a mortalității ridicate este legată de imperfecțiunile structurale ale plantelor, atât la nivel morfologic, cât și fiziologic [180]. Pentru a mări șansele de succes în multiplicarea și aclimatizarea plantelor de viță-de-vie, este esențial să fie selectat mediu nutritiv, care să ofere echilibrul optim între nutrienți și substanțele de creștere.

4.3.1 Selectarea mediilor nutritive pentru regenerarea explantelor de viță-de-vie

În cultura *in vitro*, succesul procesului de regenerare a plantelor este influențat direct de compoziția mediului nutritiv, care include săruri minerale (macro- și microelemente), zaharoză, vitamine, regulatori de creștere (fitohormoni) și, în unele cazuri, adaosuri organice. Alegerea corectă a combinației acestor componente este esențială pentru inițierea și susținerea proceselor de diferențiere și dezvoltare a țesuturilor vegetale [77].

Printre fitohormoni, citochininele au un rol important în stimularea diviziunii celulare și a creșterii frunzelor, contribuind totodată la încetinirea proceselor de îmbătrânire a țesuturilor. Acestea acționează prin intensificarea biosintezei de acizi nucleici și proteine, dar și prin redirecționarea resurselor nutritive spre zonele de creștere activă, fenomen cunoscut drept „activitate de atracție” [77]. Auxinele, la rândul lor, stimulează alungirea internodurilor, dezvoltarea sistemului radicular și participă la inițierea organelor vegetative [100].

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 [141]. La raporturi egale, celulele tind să se divizeze activ, dar fără a se diferenția clar în organe specifice. Totuși, acest model trebuie aplicat cu acurătețe, întrucât răspunsul fiziologic poate varia semnificativ în funcție de soi, tipul de explant și condițiile experimentale [59].

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 Murashige și Skoog (*MS*) cu concentrația redusă la jumătate (½ *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. Aceste combinații au fost selectate în baza modelului Skoog-Miller.

În calitate de material biologic au fost utilizate părțile apicale ale plantelor inițiale de viță-de-vie din soiul Meleag, libere de boli virale și de cancerul bacterian. Explantele au fost prelevate în faza de creștere activă și cultivate pe medii agarizate, în condiții de asepsie. Pentru fiecare variantă de mediu nutritiv au fost utilizate câte 30 de explante, distribuite în trei repetări biologice. În total, 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, iar rezultatele au fost exprimate sub formă de medii aritmetice ± abaterea standard (tabelul 4.6). Calculele statistice și formulele utilizate pentru determinarea mediilor și abaterilor standard sunt prezentate în Anexa 10.

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 radiculară (g)	Masa uscată foliară (g)
1	100.0±0.0	50.0±3.2	7.62±0.5	8.0±0.4	10.2±0.6	0.0±0.0	0.90±0.08	0.33±0.03
2	100.0±0.0	50.0±2.8	8.20±0.6	7.8±0.3	12.0±0.7	2.2±0.2	0.90±0.09	0.40±0.05
3	100.0±0.0	80.0±4.1	7.00±0.4	5.5±0.2	10.3±0.4	2.7±0.3	0.46±0.04	0.74±0.06
4	100.0±0.0	63.3±3.6	7.20±0.5	8.3±0.3	9.8±0.5	3.5±0.4	0.34±0.03	0.56±0.05

Notă: Valorile sunt exprimate ca medie ± abaterea standard, calculate din 3 repetări.

Analiza datelor din tabelul 4.5, obținute în urma testării celor patru variante de medii nutritive evidențiază, că toate explantele au răspuns pozitiv la suplimentarea mediului cu fitohormoni, formând rădăcini în proporție de 100%, indiferent de concentrația de AIA sau de adaosul de 2iP. Această reacție uniformă, în ceea ce privește înrădăcinarea, confirmă eficiența auxinei în inițierea rizogenezei în condițiile experimentale aplicate, și sugerează o bună capacitate de regenerare a soiului Meleag în condiții controlate. Cu toate acestea, procesele de dezvoltare ulterioară au variat între cele patru variante testate.

În ceea ce privește rata de dezvoltare a plantelor, exprimată procentual, cele mai bune rezultate au fost înregistrate în varianta 3 (IAA 1 mg/l + 2iP 0,3 mg/l), unde 80% dintre explantele înrădăcinate au dezvoltat lăstari. Această variantă a înregistrat și cele mai mari valori pentru numărul de lăstari laterali (2,7±0,3 buc.) și masa uscată foliară (0,74±0,06 g), sugerând că un raport echilibrat între auxină și citochinină favorizează simultan atât formarea organelor vegetative, cât și acumularea de biomasă, contribuind la obținerea unor vitroplante uniform dezvoltate.

Varianta 2, în care a fost utilizată o doză dublă de AIA (2 mg/l) fără adaos de citochinină, a determinat o creștere vegetativă relativ bună (înălțime medie de 8,2±0,6 cm și 12±0,7 frunzulițe), dar doar 50% dintre explante au dezvoltat complet plante. De asemenea, s-a remarcat un număr redus de lăstari laterali (2,2±0,2), ceea ce indică o stimulare parțială a ramificării.

În varianta 4 (2 mg/l IAA + 0,6 mg/l 2iP), deși rata de dezvoltare a fost intermediară (63,3±3,6%), s-a observat o ușoară scădere a masei radiculare (0,34±0,03 g), ceea ce poate fi asociat cu un posibil dezechilibru hormonal cauzat de concentrațiile ridicate de fitohormoni

Varianta 1 (IAA 1 mg/l, fără citochinină) a arătat rezultate moderate, cu 50% plante dezvoltate și parametri vegetativi echilibrați, dar mai scăzuți comparativ cu variantele care au inclus 2iP. Absența lăstarilor laterali indică faptul că citochininele sunt necesare pentru stimularea organogenezei lăstarilor laterali. Aceste rezultate evidențiază importanța raportului dintre auxină și citochinină în reglarea proceselor de regenerare și dezvoltare a viței-de-vie.

Pentru a stabili influența mediilor nutritive studiate asupra caracteristicilor morfologice și fiziologice ale plantelor regenerate, a fost aplicată analiza ANOVA și calculul coeficientului de corelație Pearson, interpretat conform scalei Chaddock. Formulele utilizate pentru calcularea datelor sunt prezentate în Anexa 10. Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul 4.7.

Tabelul 4.7 Corelațiile parametrilor de creștere și semnificația statistică a diferențelor între variantele studiate

Parametrii studiați	Coeficienții de corelație Pearson (*r*)	Interpretare Chaddock	Valoarea p ANOVA	ANOVA Interpretare
Înălțimea medie	-0.11	Corelație slabă	0.85	Nesemnificativ ($p > 0.05$)
Număr mediu internoduri	-0.26	Corelație slabă	0.063	Aproape semnificativ ($p \approx 0.05$)
Număr mediu frunzulițe	-0.1	Corelație slabă	0.72	Nesemnificativ ($p > 0.05$)
Lăstari laterali	0.56	Corelație evidentă	0.012	Semnificativ ($p < 0.05$)
Masa radiculară	0.74	Corelație puternică	0.0	Semnificativ (*F*-infinit)
Masa foliară	0.67	Corelație evidentă	0.00018	Semnificativ ($p < 0.05$)

Notă: Coeficienții de corelație Pearson (*r*) au fost interpretați conform scalei Chaddock. Valorile p obținute în urma analizei univariate ANOVA indică semnificația statistică a diferențelor dintre variantele de mediu nutritiv testate. Diferențele se consideră semnificative la $p < 0.05$.

Analiza datelor prezentate în tabelul 4.7 evidențiază influența semnificativă a compozi- ției mediului nutritiv asupra mai multor parametri morfologici ai vitroplantelor de viță-de-vie. Formarea lăstarilor laterali a fost influențată semnificativ de concentrațiile de fitohormoni, în special de prezența citochininelor. Varianta 4 (2 mg/l IAA + 0,6 mg/l 2iP) a generat cel mai mare număr de lăstari laterali (3,5 buc.), iar varianta 1 (1 mg/l IAA, fără citochinină) nu a prezentat deloc ramificare. Valoarea p obținută pentru acest parametru a fost 0.012, indicând o diferență semnificativă statistic, iar coeficientul de corelație $r = 0.56$ indică la o corelație evidentă, potrivit scalei Chaddock. Rezultatul confirmă că prezența citochininelor este esențială pentru stimularea ramificării, un aspect important pentru multiplicarea vegetativă a materialului săditor.

Pentru biomasa radiculară, cele mai mari valori au fost obținute în varianta 3 (1 mg/l IAA + 0,3 mg/l 2iP), cu o medie de 0,46 g, iar cele mai mici valori au fost înregistrate în variantele suplimentate doar cu auxine (0,09 g). Valoarea p a fost 0.0 (F-infinit), ceea ce indică o diferență extrem de semnificativă. Corelația puternică ($r = 0.74$) confirmă că suplimentarea echilibrată cu auxine și citochinine stimulează eficient dezvoltarea sistemului radicular.

Pentru biomasa foliară, varianta 3 s-a dovedit a fi cea mai eficientă (0,74 g), iar prima variantă a generat cele mai slabe rezultate (0,33 g). Rezultatele obținute indică o diferență

semnificativă ($p = 0.00018$), cu un coeficient de corelație $r = 0.67$ (corelație evidentă). Acest lucru subliniază faptul că dezvoltarea părților aeriene este, de asemenea, influențată pozitiv de suplimentarea combinată cu auxine și citochinine.

Înălțimea plantelor, numărul de internoduri și de frunze nu au fost influențate semnificativ de variantele testate ($p > 0.05$), iar corelațiile observate au fost slabe ($r < 0.3$). Aceste rezultate indică faptul că acești parametri sunt mai puțin sensibili la variațiile de fitohormoni în condițiile experimentale aplicate, reflectând o stabilitate morfologică relativă a soiului studiat.

Analiza comparativă a parametrilor morfologici și fiziologici a evidențiat diferențe semnificative între variantele testate, subliniind importanța compoziției hormonale în direcționarea și calitatea regenerării plantelor cultivate in vitro. Rezultatele obținute arată că selecția corectă a combinațiilor de fitohormoni reprezintă un element important în eficiența etapei de regenerare a explantelor. Rețeta bazată pe 1 mg/l AIA și 0,3 mg/l 2iP s-a dovedit a fi optimă pentru stimularea regenerării și dezvoltării armonioase a vitroplantelor, putând fi aplicată cu succes în tehnologia de obținere a clonelor asanate de viță-de-vie.

Rezultatele studiului nostru sunt susținute și de rezultatele raportate de Aazami M. (2010), care a analizat efectul unor fitohormoni asupra două soiuri de *Vitis vinifera* în cultura *in vitro* [1]. Autorul a constatat că prezența auxinelor și citochininelor în mediul de cultură influențează semnificativ regenerarea și dezvoltarea vitroplantelor, iar eficiența răspunsului depinde de concentrație, combinație și genotip. Aceste constatări confirmă concluziile obținute în cadrul prezentului studiu, conform cărora un raport echilibrat între AIA și 2iP favorizează concomitent dezvoltarea sistemului radicular și a părților aeriene, asigurând o regenerare echilibrată și stabilă a plantelor de viță-de-vie în cultură *in vitro*.

Rezultatele obținute în cadrul studiului nostru se corelează cu cele raportate de Kim și colab., care au testat combinații de fitohormoni pentru regenerarea soiului Shine Muscat [85]. Autorii au arătat că administrarea a 2,0 μM BAP pentru stimularea lăstarilor și 1,0 μM IBA pentru formarea rădăcinilor a dus la o regenerare eficientă și la obținerea unui număr mare de plante sănătoase. Deși hormonii utilizați au fost diferiți (BA și IBA în studiul coreean, IAA și 2iP în studiul nostru), efectul stimulator al combinației auxină–citochinină asupra morfogenezei a fost evident în ambele cazuri. Acest lucru confirmă că raportul dintre aceste substanțe trebuie adaptat în funcție de soi, pentru a obține rezultate bune în micropropagare. În plus, cercetătorii coreeni au verificat stabilitatea genetică a plantelor regenerate în cultură *in vitro* prin utilizarea de markeri moleculari ISSR, fapt ce confirmă fiabilitatea și potențialul acestui protocol pentru integrarea în procesul de multiplicare a clonelor asanate, stabile din punct de vedere genetic [96].

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 auxină/citochinină în funcție de genotip, pentru asigurarea unei regenerări eficiente și uniforme.

4.3.2 Selectarea mediilor nutritive pentru multiplicare și aclimatizare la condiții ex vitro

În procesul de multiplicare a materialului săditor de viță-de-vie, substratul utilizat în etapele de cultură *in vitro* și de aclimatizare *ex vitro* are un impact decisiv asupra succesului regenerării și adaptării plantelor. Tradițional, în etapa de multiplicare, s-au utilizat medii solide pe bază de agar, completate cu fitohormoni, care permit inducerea lăstarilor și, ulterior, înrădăcinarea acestora în medii separate. Mai mulți autori au semnalat că această abordare poate avea anumite limitări, printre care se numără riscul de apariție a hiperhidricității, precum și modificări histologice şi morfologice (alungirea internodurilor, lipsa formării cârceilor). Aceste fenomene duc la diminuarea treptată a potenţialului de multiplicare al explantelor şi limitează aplicarea pe scară largă a tehnicii în procesul de obţinere a clonelor [23, 125].

Tranziția vitroplantelor din condiții *in vitro* către condiții *ex vitro* reprezintă etapa finală, dar totodată una dintre cele mai critice și sensibile faze ale procesului de micropropagare, având un impact esențial asupra succesului întregii tehnologii de obținere a materialului săditor. În această fază, pierderile de material vegetal pot fi considerabile, ajungând frecvent la 80–95% din cauza dificultăților întâmpinate de plantele crescute în condiții sterile, care trebuie să se adapteze rapid unui mediu semnificativ diferit [181]. Plantele formate *in vitro* prezintă o conformație morfologică și fiziologică specifică, neadaptată la parametrii variabili ai mediului extern: umiditate mai scăzută, expunere crescută la lumină naturală și prezența microorganismelor patogene din sol. Aceste condiții contrastează puternic cu cele din spațiile de cultură, unde umiditatea este constant ridicată, iar concentrația de CO_2 este redusă. Aclimatizarea reușită presupune, ca planta să își regleze procesul de transpirație și să dezvolte un sistem radicular capabil să asigure schimbul eficient cu substratul nutritiv. Lipsa acestei tranziții fiziologice determină, compromiterea completă a plantelor după transferul în condiții *ex vitro*.

Substraturile utilizate în etapa de aclimatizare trebuie să îndeplinească atât funcțiile tradiționale (fixarea mecanică a plantelor și asigurarea nutriției), cât și cerințele specifice ale plantelor crescute *in vitro*. În acest sens, substratul trebuie să se caracterizeze prin următoarele proprietăți: capacitate mare de reținere a apei, combinată cu o aerare optimă a zonei radiculare; un nivel ridicat de nutriție minerală, fără riscul de arsuri fiziologice cauzate de fertilizanți asupra

plantelor sensibile aflate în adaptare; sterilitate inițială sau posibilitatea de sterilizare fără a compromite celelalte proprietăți ale substratului. Având în vedere complexitatea funcțiilor pe care trebuie să le îndeplinească, substraturile pentru aclimatizare sunt, de regulă, amestecuri bi- sau tri-component, alcătuite din materiale precum turbă, nisip, perlit, substraturi pe bază de schimbători de ioni, biocompost, îngrășăminte minerale și agenți hidroretentori [186].

Substraturile pe bază de schimbători de ioni conțin toate elementele nutritive esențiale pentru creșterea plantelor, în concentrații ridicate și forme sigure pentru plante (de exemplu, Biona, Triona) [143]. Compoziția acestor substraturi include ionite sintetice (precum KU-2, EDE-10P, AN-2F, FIBAN – un tip de ionit fibros), dar și ionite naturale, cum este clinoptilolitul – un tip de zeolit natural. Acestea sunt saturate cu macroelemente biogene (K^+, Ca^{2+}, Mg^{2+}, NH_4^+, Fe^{3+}, NO_3^-, SO_4^{2-}, $H_2PO_4^-$) și microelemente (Mn^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}, MoO_4^{2-}, $B_4O_7^{2-}$, Co^{2+}, Na^+, Cl^-). Acestea conțin toate elementele esențiale pentru creșterea și dezvoltarea plantelor, fiind disponibile într-o formă accesibilă fiziologic, dar osmotic inactivă, ceea ce previne stresul salin și asigură o nutriție echilibrată și stabilă în timp.

În cadrul procesului de obținerea a clonelor asanate, substratul „Biona-311” a fost utilizat cu succes atât în faza de multiplicare accelerată *in vitro*, cât și în etapa de aclimatizare *ex vitro*. În faza de multiplicare, lăstarii de viță-de-vie au fost transferați pe „Biona-311” imediat după regenerare, fără etapa intermediară de înrădăcinare separată. S-a observat că substratul a permis o creștere rapidă, formarea unor lăstari cu 6–8 internoduri în decurs de 30–35 de zile și o înrădăcinare simultană, fără necesitatea modificării compoziției substratului. Sistemul radicular format pe „Biona-311” a fost mai bine dezvoltat, ramificat și viguros, comparativ cu cel obținut pe medii nutritive ttradiționale solidificate cu agar.

După atingerea capacului containerelor de către lăstari, acesta este îndepărtat treptat, iar plantele continuă dezvoltarea pe același substrat, însă în condiții de tip *ex vitro*. În această fază, frunzele dezvoltate își recapătă pilozitatea caracteristică soiului, indicând tranziția către o morfologie adaptată condițiilor externe. Un aspect important observat în practică este că, în timpul deschiderii treptate a recipientelor, nu au fost înregistrate cazuri de contaminare microbiană, ceea ce demonstrează eficiența substratului și a regimului aplicat. Umiditatea substratului este menținută prin aplicarea periodică a apei distilate sterilizate prin autoclavare, ceea ce asigură condiții stabile și previne stresul hidric în perioada de aclimatizare. Observațiile au indicat o tranziție lină către condițiile *ex vitro*, cu o rată ridicată de supraviețuire a plantelor, lipsa vitrificării și apariția pilozității frunzelor într-un interval mai scurt. Pentru a evalua eficiența practică a substratului „Biona-311” în multiplicarea și aclimatizarea microbutașilor de viță-de-vie, în tabelul 4.8 sunt prezentate datele acumulate în perioada 2018–2020.

Tabelul 4.8 Evaluarea eficienței substratului „Biona-311” în etapele de multiplicare și aclimatizare a viței-de-vie (2018–2020)

Anul cercetării	Soi/Clonă	Microbutași multiplicați (buc.)	Plante aclimatizate (buc.)	Media pierderilor de plante, %
2018	Plavai	368	355	3,5
	Chișmiș moldavschii	376	369	4,2
	Crâmpoșie	425	418	1,6
	Copceac	435	426	2,1
	Apiren roz	410	393	4,1
	Legenda	338	325	3,8
	Moldova	472	450	4,7
	Telti Curuc	415	396	4,6
	BxR Kober 5 BB	176	174	5,9
	RxR 101-14	295	291	3,0
	BxR SO4	249	246	3,1
2019	Busuioacă de Moldova	175	163	6,9
	Busuioacă de Bohotin	165	157	4,8
	Onițcanschii belâi	210	203	3,3
	Maleque	560	550	1,8
	Freedom	365	355	2,7
2020	Chișmiș lucistâi	420	399	5,0
	Sauvignon	365	342	6,3
	Tudor	374	364	2,7
	Telti Curuc	412	400	2,9
	Fetească regală	392	379	3,3
	Negru de Căușeni	212	207	2,4
	Fetească albă	220	214	2,7
	Merlot	110	103	6,4
Total		7967	7679	3,82%

Datele prezentate în tabelul 4.8, reflectă rezultatele obținute în cadrul procesului de multiplicare și aclimatizare a microbutașilor de viță-de-vie în perioada 2018–2020, utilizând substratul de ioniți „Biona-311”. Au fost înregistrați 7967 de microbutași multiplicați și 7679 de plante de viță-de-vie crescute și aclimatizate, ceea ce corespunde unei pierderi de 3,82%.

Analizând rezultatele pe soiuri și ani se constată, că pierderile înregistrate în timpul aclimatizării sunt reduse și relativ constante, cu valori cuprinse între 1,6% și 6,9%, ceea ce reflectă o stabilitate a procesului tehnologic. Datele obținute se situează mult sub valorile raportate în literatura de specialitate. Conform recomandărilor metodice elaborate de Djigadlo și colab., pierderile înregistrate la tranziția din condiții *in vitro* către *ex vitro* pot atinge 80–95% din materialul săditor, în special în cazul speciilor pomicole și viticole [181]. De asemenea, o lucrare recentă realizată de cercetători din Polonia a evidențiat vulnerabilitatea crescută a vitroplantelor față de stresul exogen apărut în urma tranziției la condițiile *ex vitro*, cauzat în principal de schimbările bruște ale parametrilor microclimatici. Autorii confirmă că, potrivit datelor experemintale, rata redusă de supraviețuire reprezintă o problemă comună în practica

biotehnologică aplicată plantelor perene [76]. Prin comparație, datele noastre demonstrează că utilizarea substratului de ioniți „Biona-311” în combinație cu o tehnică graduală de deschidere a recipientelor și irigare cu apă distilată sterilizată, a contribuit semnificativ la reducerea pierderilor în timpul aclimatizării.

Rezultatele obținute în cadrul studiului de multiplicare și aclimatizare a microbutașilor de viță-de-vie pe substratul „Biona-311” evidențiază faptul, că substratul dat reprezintă o opțiune eficientă și stabilă pentru utilizare în procesul de obținere a clonelor asanate. Rata înaltă de supraviețuire după tranziția la condițiile *ex vitro*, dezvoltarea viguroasă a sistemului radicular și lipsa fenomenelor de vitrificare confirmă capacitatea substratului de a favoriza adaptarea fiziologică treptată a plantelor, reducând pierderile și sporind calitatea materialului săditor obținut. Astfel, „Biona-311” poate fi recomandată ca soluție tehnologică optimă pentru integrarea în schemele de micropropagare aplicate în viticultură.

4.4 Concluzii la capitolul 4

1. Aplicarea metodei PCR în testarea materialului săditor viticol s-a dovedit eficientă pentru identificarea tulpinilor patogene de *A. vitis* și *A. tumefaciens*, ceea ce a permis diferențierea precisă între bacteriile fitopatogene și cele saprofite. În cazurile în care izolatele din complexul *Agrobacterium spp*. sunt identificate pozitiv prin metoda microbiologică, se recomandă testarea suplimentară prin PCR pentru confirmarea caracterului patogen. Această abordare contribuie la excluderea din procesul de multiplicare a plantelor infectate.

2. Studiul influenței spectrelor LED în cultura *in vitro* a demonstrat că spectrul „Fito” este optim pentru inducerea rădăcinilor, iar iluminarea „alb-rece” susține dezvoltarea vegetativă. Rezultatele justifică aplicarea unui regim de iluminare diferențiat, adaptat fazei fiziologice a plantelor regenerate, contribuind la optimizarea condițiilor de cultură.

3. Studiile privind compoziția mediului nutritiv pentru regenerarea explanturilor au arătat că varianta cu 1 mg/l AIA și 0,3 mg/l 2iP oferă cele mai bune rezultate în ceea ce privește dezvoltarea coordonată a aparatului radicular și a lăstarilor. Importanța raportului auxină–citochinină a fost confirmată, evidențiind necesitatea ajustării acestuia în funcție de soi.

4. Substratul pe bază de ioniți „Biona-311” s-a dovedit eficient atât în multiplicarea lăstarilor, cât și în etapa de aclimatizare, contribuind la formarea unui sistem radicular bine dezvoltat, absența vitrificării și o rată de supraviețuire de peste 94%, fapt ce confirmă stabilitatea fiziologică a plantelor și susține recomandarea acestui substrat pentru utilizarea în producerea pe scară largă a clonelor asanate de viță-de-vie.

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 [41] (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, care prezintă însușiri agrobiologice valoroase, 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 [41] (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 [39] (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 [43] (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≤1700 K) a stimulat eficient formarea sistemului radicular, spectrul alb-rece (6000 K) a susținut dezvoltarea frunzelor și

internodurilor, iar lumina alb-cald (T≤1700 K) a oferit un echilibru optim între creșterea părților aeriene și subterane [42, 44] (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 [20] (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 [40] (subcapitolele 3.3–3.6).

RECOMANDĂRI PRACTICE

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.

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 °C timp de 45 de minute.

De asemenea, 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.

BIBLIOGRAFIE

1. AAZAMI, M.A. „Effect of some growth regulators on *in vitro* culture of two *Vitis vinifera L*. Cultivars." *Romanian Biotechnological Letters*, 2010, vol. 15, pp. 1–4.
2. AGARWAL, A. și GUPTA, S.D. „Impact of light-emitting diodes (LEDs) and its potential on growth and development in controlled environment plant production system." *Current Biotechnology*, 2016, vol 5, 28–43. DOI: 10.2174/2211550104666151006001126
3. AGEPI. „Soiul de plante – intrare v 2012 0018: Tudor (Vitis vinifera L.)". Disponibil: https://db.agepi.md/soideplante/Details.aspx?id=v%202012%200018 (accesat: 2025).
4. AGEPI. „Soiul de struguri Apiren roz." [online]. Chișinău, 2012. Disponibil: https://db.agepi.md/soideplante/Details.aspx?id=v%202012%200018 (accesat: 2025).
5. AGEPI. „Soiul de struguri Basarabia." [online]. Chișinău, 2017. Disponibil: https://www.db.agepi.md/soideplante/Details.aspx?id=v%202017%200023 (accesat: 2025).
6. AGRITEST. Fișă tehnică – „Kit ELISA pentru detectarea virusului răsucirii frunzelor la vița-de-vie GLRaV-3, cod GLRaV3-K05" [online]. Italia, 2022. Disponibil: https://www.agritest.it/wp-content/uploads/2022/05/GLRaV3-K05.pdf
7. Agrobiznes.md. „Soiul de struguri Chișmiș Lucistîi – descriere și particularități." [online]. Chișinău, 2021. Disponibil: https://agrobiznes.md/soiul-de-struguri-chismis-lucistai-descriere-si-particularitati.html (accesat: 2025).
8. Agroexpert.md. „Moldova va propune lumii vin dintr-un nou soi local de struguri – Legenda." [online]. Chișinău, 2019. Disponibil: https://agroexpert.md/rom/novosti/moldova-predlozhit-miru-vino-iz-novogo-mestnogo-sorta-vinograda (accesat: 2025).
9. ALVARENGA, I.C.A., PACHECO, F.V., SILVA, S.T., BERTOLUCCI, S.K.V., PINTO,, J.E.B.P. *In vitro* culture of *Achillea millefolium L.*: „Quality and intensity of light on growth and production of volatiles." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2015, vol. 122, pp. 299–308. ISSN 0167-6857.
10. ANDRET-LINK, P., LAPORTE, C., VALAT, L., RITZENTHALER, C., DEMANGEAT, G., VIGNE, E. ș.a. „Grapevine fanleaf virus: Still a major threat to the grapevine industry." *Journal of Plant Pathology*, 2004, vol. 86, pp. 183–195. ISSN 1125-4653.
11. ANDRET-LINK, P., SCHMITT-KEICHINGER, C., DEMANGEAT, G., KOMAR, V., FUCHS, M. „The specific transmission of Grapevine fanleaf virus by its nematode vector *Xiphinema index* is solely determined by the viral coat protein." *Virology,* 2004, vol. 320, pp. 12–22. ISSN 0042-6822.

12. BANERJEE, A., ROYCHOUDHURY, A. „Plant responses to light stress: oxidative damages, photoprotection, and role of phytohormones" In: *Plant Hormones under Challenging Environmental Factors*. Springer, Dordrecht, 2016, pp. 181–214. ISBN 978-94-017-7757-2.

13. BASSO, M.F., FAJARDO, T.V.M., SANTOS, H.P., GUERRA, AYUB, C.C., AYUB, R.A., NICKEL, O. „Fisiologia foliar e qualidade enológica da uva em videiras infectadas por vírus." *Tropical Plant Pathology*, 2010, vol. 35, nr. 6, p. 351–359. ISSN 1982-5676.

14. BAUMBAUER, D. A., SCHMIDT, C. B., & BURGESS, M. H. „Leaf lettuce yield is more sensitive to low daily light integral than kale and spinach." *HortScience*, 2019, vol. 54 nr. 12, pp. 2159–2162. https://doi.org/10.21273/HORTSCI.14288-19

15. BAZZI, C., STEFANI, E., GOZZI, R., BURR, T.J., MOORE, C.L., ANACLERIO, F. „Hot-water treatment of dormant grape cuttings: Its effects on *Agrobacterium tumefaciens* and on grafting and growth of vine." *Vitis*, 1991, vol. 30, pp. 177–187. ISSN 0042-7500.

16. BĂDĂRĂU, S. Fitopatologia (generală și agricolă). Chișinău: Print-Caro, 2012, 595 p. ISBN 978-9975-56-046-7.

17. BEZA K., FEYISSA T., BEDADA, G. „*In vitro* micropropagation of grape vine (*Vitis vinifera L.*) from nodal culture." *African Journal of Biotechnology*, 2017, vol. 16 nr. 43, pp. 2083–2091. DOI: 10.5897/AJB2016.15803.

18. BISHOP, A.L., BURR, T.J., MITTAK, V.L., KATZ, B.H. „A monoclonal antibody specific to A. tumefaciens biovar 3 and its utilization for indexing grapevine propagation material." *Phytopathology*, 1989, vol. 79, pp. 995–998.

19. BISZTRAY, G.D., CIVEROLO, E.L., DULA, T., KÖLBER, M., LÁZÁR, J., MUGNAI, L., SZEGED, E., SAVKA, M.A. „Grapevine pathogens spreading with propagating plant stock: Detection and methods for elimination." In: *Grapevines: Varieties, Cultivation and Management*. Nova Science Publishers, New York, 2012, pp. 1–86.

20. BONDARCIUC, V., SULTANOVA, O., **DUBCEAC, M**. „Micropropagarea in vitro – etapă crucială în crearea plantațiilor-mamă de viță-de-vie." În: Pomicultura, Viticultura și Vinificația, nr. 2(92), decembrie 2024, pp. 24–31. DOI: 10.53082/1857-3142.24.92.05.

21. BOTA, J., et al. „Grapevine fleck virus (GFKV) elimination in a selected clone of Vitis vinifera L. cv. Manto Negro and its effects on photosynthesis." *OENO* One, 2014, vol. 48, pp. 11

22. BOUAMAMA- GZARA, B.; SELMI, I.; CHEBIL, S.; MELKI, I.; MLIKI, A.; GHORBEL, A.; CARRA, A.; CARIMI, F.; MAHFOUDHI, N. „Elimination of Grapevine leafroll associated virus-3, Grapevine rupestris stem pitting associated virus and Grapevine virus A from a Tunisian Cultivar by somatic embryogenesis and characterization of the somaclones using ampelographic descriptors." *Plant Pathology Journal,* 2017, vol. 33, pp. 561–571.

23. BOUQUET, A., & TORREGROSA, L. „Micropropagation of the Grapevine (*Vitis spp*.).” In: *Micropropagation of woody trees and fruits*. Dordecht: Springer, 2003, pp. 421-436 https://doi.org/10.1007/978-94-010-0125-0_11

24. BURR, T.J.; BAZZI, C.; SÜLE, S.; OTTEN, L. „Crown gall of grape: Biology of *A. vitis* and the development of disease control strategies.” *Plant Disease*,1998, 82, pp. 1288–1297.

25. BUSUIOACĂ DE BOHOTIN. „Busuioacă de Bohotin – varietate de struguri aromată, cu buchet intens floral, note de busuioc.” În: Wikipedia [online]. (accesat: 2025). Disponibil: https://en.wikipedia.org/wiki/Busuioac%C4%83_de_Bohotin

26. ČARIJA, M., RADIĆ, T., ČERNI, S., ŽANIĆ, K., JEMRIĆ, T., VONČINA, D. „Prevalence of virus infections and GLRaV-3 genetic diversity in selected clones of Croatian indigenous cultivar Plavac Mali.” *Pathogens*, 11(2), 176. https://doi.org/10.3390/pathogens11020176.

27. CAUDWELL A., LARRUE J., BOUDON-PADIEU, E., McLEAN, G.D. „Flavescence Dorée elimination from dormant wood of grapevines by hot-water treatment.” *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 1997, vol. 3, nr. 1, pp. 21-25.

28. 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.” Am. J. Enol. Vitic. 2020, 71, 231–241. DOI: 10.5344/ajev.2020.19047. ISSN: 0002-9254.

29. CHEVALIER, S., GREIF, C., CLAUZEL, J. M., WALTER, B., FRITSCH, C. „Use of an immunocapture polymerase chain reaction procedure for the detection of GVA in Kober stem grooving-infected grapevines.” *Journal of Phytopathology*, 1995, vol. 143, pp. 369–373.

30. CHIRECEANU, C. *Fitoplasmize la vita de vie.* București: s. n., 2016. 104 p.

31. CHIRECEANU, C., DINU, S., MIHU, G., PODRUMAR, T., DOBROMIR, D. CANCERUL BACTERIAN LA VIȚA DE VIE. În: Proiectul ADER 4.1.2. București: Editura Oscar Print, 2018. ISBN 978-973-668-479-1.

32. CLARK, M. F., ADAMS, A. N. „Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses.” *Journal of General Virology*, 1977, vol. 34, nr.3, pp. 475–483. DOI:10.1099/0022-1317-34-3-475

33. CRETAZZO E., PADILLA C., CARAMBULA C., HITA I., SALMERON E., CIFRE, J. „Comparison of the effects of different virus infections on performance of three Majorcan grapevine cultivars in field conditions.” *Annals of Applied Biology*, 2010, vol. 156, pp. 1–12. ISSN: 0003-4746

34. CUHARSCHI, M., CEBANU, V., TARAN, N., GAINA, B., DEGTEARI, V. „Noi soiuri de struguri pentru producerea vinurilor albe de calitate.” În: Akademos, nr. 3, 2019, pp. 45–51. ISSN 1857-0461.

35. CUHARSCHI, M., CEBANU, V., TARAN, N., OLARI, T., CRAVEȚ, N., ANTOCI, A., DEGTEARI, V. „Soiuri de struguri de selecție nouă – Legenda și Floricica. Istoria creării, agrobiologia, agrotehnica, protecția și tehnologia producerii vinului.” În: Pomicultura, Viticultura și Vinificația, nr. 3–4 (81–82), 2019, pp. 25–26. ISSN 1857-427X.

36. CUHARSCHI, M., UNGUREANU, S., BOTNARENCO, A., ANTOCI, A., TARAN, N., GAINA, B., CRAVEȚ, N., GLAVAN, P. „Productivitatea clonelor europene de viță-de-vie.” În: Viticultura și Vinificația în Moldova, nr. 5, 2006, pp. 8–10. ISSN 1857-0835.

37. DESSAUX, Y., and FAURE, D. Niche construction and exploitation by *Agrobacterium*: „How to survive and face competition in soil and plant habitats.” În: SUBRAMONIAM, A. (ed.). *Agrobacterium Biology. Current Topics in Microbiology and Immunology*. Springer, 2018, pp. 55–86. ISBN 978-3-319-97551-1. DOI: 10.1007/82_2018_111.

Disponibil: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:32019R2072

38. 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.” În: Communications Biology, 4(1), 2021, Articol 637. DOI: 10.1038/s42003-021-02164-4. PMID: 34050254.

39. **DUBCEAC, M.** „Metode de asanare a protoclonelor de viță-de-vie în procesul de selecție fitosanitară.” Știința Agricolă / Agricultural Science, nr. 2 (2023), pp. 74–80. DOI: 10.55505/sa.2023.2.09.

40. **DUBCEAC, M.** „Perfecționarea tehnologiei de obținere a clonelor fitosanitare de viță de vie.” În: *Lucrările celei de-a 74-a Conferinţe Ştiinţifice a Studenţilor, Masteranzilor și Doctoranzilor*, Chișinău: GAUM, 2021, p. 52.

41. **DUBCEAC, M**., „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, Greece, September 2023, pp. 167-169

42. **DUBCEAC, M**., BONDARCIUC, V. „Evaluarea influenței fitohormonilor IAA și 2iP asupra dezvoltării viței-de-vie (Vitis vinifera) în cultura in vitro.” Pomicultura, Viticultura și Vinificația, nr. 2 (92), 2024, pp. 14-19. DOI: 10.53082/1857-3142.24.92.03.

43. **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

44. **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. DOI: 10.51258/RJH.2023.03. ISSN 2668-8881.

45. **DUBCEAC, M**., SULTANOVA, O.; BONDARCIUC, V. „Propagation of phytosanitary clones by *in vitro* culture.” In: *Biologization of the Intensification Processes in Horticulture and Viticulture*: : Proceedings of the International Scientific Conference, nr. 34, September 21-23. 2021, Krasnodar, Russia. Krasnodar: VNIIViV, 2021, pp. 1–6.

46. DUMAS, M., MITCHELL, R., FEICHTINGER E., BRADSHAW, T., DOUHAN, G. „Gathered from the vine: A survey of seven grapevine viruses within New England vineyards.” *Plant Disease*, 2023, vol.107, nr. 3, pp.644–650. https://doi.org/10.1094/PDIS-05-22-1059-RE.

47. DUTTA GUPTA, S. *Light Emitting Diodes for Agriculture-Smart Lighting*. Singapore: Springer, 2017. 267 p. ISBN 978-981-10-5806-3. DOI: 10.1007/978-981-10-5807-0.

48. EASTWELL, K.C., Willis, G. L., CAVILEER, D.T. „A rapid and sensitive method to detect Agrobacterium vitis in grapevine cuttings using the polymerase chain reaction.” *Plant Disease*, 1995, vol. 79, no. 8, pp. 822–827. DOI: 10.1094/PD-79-0822. ISSN 0191-2917.

49. ELENA G., DI BELLA, V., ARMENGOL, J., LUQUE, J. „Viability of Brotyosphaeriacea species pathogenic to grapevine after hot water treatment.” *Phytopathologia. Mediterranea*, vol. 54 no. 2, pp. 325-334. DOI: 10.14601/Phytopathol_Mediterr-15764. ISSN 0031-9465.

50. EPPO PM 4/8(2). „Scheme for the production of healthy plants for planting – Pathogen-tested material of grapevine varieties and rootstocks.” EPPO Bulletin, 2008, vol. 38, no. 3, pp. 422–429. DOI: 10.1111/j.1365-2338.2008.01254.x. ISSN 0250-8052.

51. EPPO. *Grapevine flavescence dorée phytoplasma. EPPO datasheets on pests recommended for regulation*. Paris: EPPO, 2024. Disponibil: https://gd.eppo.int (accesat: 2025).

52. 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, L 319, pp. 1–279.

53. FALLAH, F., KAHRIZI, D. „Effect of Light Spectrum and Intensity on Growth of Grape (*Vitis vinifera*) under in vitro conditions.” *Journal of Applied Biotechnology Reports*, 2016, vol. 3, no. 4, pp. 495–499. DOI:10.21273/HORTSCI.49.7.949. ISSN 2322-1152.

54. FANJUL, M. J. Deliverable 2.3: „Ten local technical workshops on winegrowers practices." Instituto Galego de Calidade Alimentaria – INGACAL. Proiectul WINETWORK, 10 decembrie 2016. Disponibil: www.winetwork.eu. (accesat: 2025).
55. FAUST, J. E., HOLCOMBE, V., RAJAPAKSE, N. C., LAYNE, D. R. „The effect of daily light integral on bedding plant growth and flowering." În: HortScience, vol. 40, nr. 3, 2005, pp. 645–649. ISSN 0018-5345. DOI: 10.21273/HORTSCI.40.3.645.
56. FORTUSINI, A., SCATTINI, G., PRATI, S., CINQUANTA S., BELLI, G. „Transmission of Grapevine leafroll virus 1 (GLRaV-1) and Grapevine virus A (GVA) by scale insects." In: Extended Abstracts 12th Meeting of ICVG, 1997, Lisbon, Portugal, pp. 121–122.
57. 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), 25–29 September 2023, Thessaloniki, Greece. Abstracts, pp. 18–26.
58. GALLO, R., DULAU, L., LACOMBE, T. Cépages et vignobles de France: atlas et histoire des 200 variétés du vignoble français. Paris: Éd. Féret, 2018, 672 p. ISBN 978-2-902416-69-7.
59. GEORGE, E.F., DAVIES, W. „Effects of the physical environment." In: GEORGE, E.F. (ed.). Plant Propagation by Tissue Culture, vol. 3. Dordrecht: Springer, 2008, pp. 423–464. ISBN 978-1-4020-5004-6.
60. GOLINO, D. A., FUCHS, M., SIM, S., FARRAR, K., MARTELLI, G. P. „Improvement of grapevine planting stock through sanitary selection and pathogen elimination." In: MENG, B., MARTELLI, G. P., GOLINO, D. A., FUCHS, M. (eds.). Grapevine viruses: Molecular biology, diagnostics and management. Springer, 2017, pp. 561-579. ISBN 978-3-319-57705-0.
61. GRAMAJE, D., ARMENGOL, J., SALAZARD., LÓPEZ-CORTÉS, I., GARCÍA-JIMÉNEZ, J. „Effect of hot-water treatments above 50 °C on grapevine viability and survival of Petri disease pathogens." *Crop Protection*, 2009, vol. 28, no. 3, pp. 280-285. DOI: 10.1016/j.cropro.2008.11.009. ISSN 0261-2194.
62. GRAMMATIKAKI, G., AVGELIS, A. „Does in vitro micropropagation reveal new possibilities for grapevine leafroll indexing." In: Extended Abstracts of the 13th Meeting of ICVG, 2000, Adelaide, Australia, pp. 12.
63. Grape-sort.vineyard.su. „Кишмиш Лучистый (Chișmiș Lucistîi)." [online]. Moscova, 2022. Disponibil: https://grape-sort.vineyard.su/seedless/item/kishmish-luchistyj (accesat: 2025).
64. GREIF C., GARAU, R., BOSCIA, D., PROTA, V. A., FIORI, M., BASS, P., et al. „The relationship of Grapevine leafroll-associated closterovirus 2 with a graft-incompatibility condition of grapevines."*Phytopathologia Mediterranea*, 1995, vol. 34, pp.167–173. ISSN 0031-9465.

65. GRIBAUDO, I., GAMBINO, G., CUOZZO, D., MANNINI, F. „Attempts to eliminate Grapevine rupestris stem pitting-associated virus from grapevine clones.” Journal of Plant Pathology, 2006, vol. 88, pp. 293–299. ISSN 1125-4653.
66. GRIBAUDO, I., MANNINI, F., LISA, A., CUOZZO, D. „Phenotypical modifications of micropropagated grapevines.” In: Acta Horticulturae, 2000, vol. 530, pp. 231-236. DOI: 10.17660/ActaHortic.2000.530.29. ISSN 0567-7572.
67. GRIGOREV, N. A., KHRUSTALEVA, L. I., IVANOV, A. V. „Effects of LED light quality on in vitro growth and development of grapevine (Vitis vinifera L.) plants.” Russian Journal of Plant Physiology, 2021, vol. 68, pp. 837–844. DOI: 10.1134/S1021443721050057.
68. GUVERNUL REPUBLICII MOLDOVA. Hotărârea nr. 24 din 11 ianuarie 1995 „Pentru aprobarea Regulamentului cu privire la conținutul documentației cadastrului funciar general.” În: Monitorul Oficial al Republicii Moldova, nr. 14, 1995, art. 62.
69. HANUS-FAJERSKA, E., WOJCIECHOWSKA, R. „Impact of Light-Emitting Diodes (LEDs) on propagation of orchids in tissue culture”. In: GUPTA, S.D. (ed.). Light Emitting Diodes for Agriculture. Singapore: Springer, 2017, pp.305–320. ISBN 978-981-10-5806-3.
70. HAUSTOV, E. „Bolile viței de vie de etiologie fitoplasmatică.” În: Rezumat al cercetărilor fitosanitare în Republica Moldova. Chișinău: ANACEC, 2023, pp. 12–17.
71. HAUSTOV, E., BONDARCIUC, V. „Hyalesthes obsoletus is an active vector of Wood blackening in the Republic of Moldova”. In: International Scientific Conference „Biologization of the Intensification Processes in Horticulture and Viticulture”, nr. 34, 21–23 septembrie 2021, Krasnodar, Rusia. Bioconferences, 2021, vol. 34, pp. 1–6.
72. HOMMAY, G. et al. „Transmission of grapevine leafroll-associated virus-1 (ampelovirus) and grapevine virus A (vitivirus) by the cottony grape scale Pulvinaria vitis (Hemiptera; Coccidae).” *Viruses*, 2021, vol. 13, Article 2081. DOI: 10.3390/v13112081. ISSN 1999-4915.
73. Hotărârea Guvernului nr. 418 din 9 iulie 2009 privind producerea, certificarea, controlul și comercializarea materialului de înmulțire și săditor viticol. În: Monitorul Oficial al Republicii Moldova, nr. 108–109, din 17 iulie 2009. Chișinău, 2009. Disponibil: https://www.legis.md/cautare/getResults?doc_id=144218&lang=ro# (accesat 2025)
74. HU, G., DONG, Y., ZHANG, Z., FAN, X., REN, F. „Efficiency of chemotherapy combined with thermotherapy for eliminating grapevine leafroll-associated virus 3 (GLRaV-3).” Scientia Horticulturae, 2020, vol. 271, Aticle 109462. DOI: 10.1016/j.scienta.2020.109462.
75. HU, G.J., DONG, Y.F., ZHANG, Z.P., FAN, X.D., FANG, R.E.N. „Elimination of grapevine fleck virus and grapevine rupestris stem pitting-associated virus from Vitis vinifera 87-1 by

ribavirin combined with thermotherapy.” Journal of Integrative Agriculture, 2021, vol. 20, no. 10, pp. 2463–2470. DOI: 10.1016/S2095-3119(20)63309-6. ISSN 2095-3119.

76. JAGIEŁŁO-KUBIEC, K., KUBIEC, P. „Adaptation process of plant regenerants after in vitro in ex vitro conditions and ways to improve it.” *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2024, vol. 157, Article 112. DOI: 10.1007/s11240-024-02923-1. ISSN 0167-6857.

77. JIMÉNEZ, V. „Regulation of in vitro somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones.” *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 2001, vol. 13, no. 2, pp. 196–223. DOI: 10.1590/S0103-31312001000200008

78. JOHNSON K.L., ZHENG D., KAEWNUMS., REID, C.L., BURR T. „Development of a magnetic capture hybridization real-time PCR assay for detection of tumorigenic Agrobacterium vitis in grapevines.” *Phytopathology,* 2013, vol. 103, no. 6, pp. 633–640. ISSN: 0031-949X. DOI: 10.1094/PHYTO-10-12-0267-R.

79. JOHNSON KL, Cronin H, Reid CL, Burr TJ. „Distribution of Agrobacterium vitis in Grapevines and Its Relevance to Pathogen Elimination.” *Plant Disease*, 2016, vol. 100, no. 4, pp 791-796. DOI: 10.1094/PDIS-08-15-0931-RE. ISSN: 0191-2917

80. KARA, Z., FAKHAR, M.S.M. „Effect of hot water treatment on the elimination of Agrobacterium vitis in grafted grapevine cuttings.” *Turkish Journal Agriculture Food Science and Technology,*2025,vol.12,supl.1,pp..2180-2195. DOI: 10.24925/turjaf.v12is1.2180-2195.7110

81. KAWAGUCHI, A. „Risk assessment of inferior growth and death of grapevines due to crown gall.” European Journal of Plant Pathology, 2022, vol. 162. ISSN (print): 0929-1873

82. KAWAGUCHI, A., KIRINO N, INOUE K. „Biological Control for Grapevine Crown Gall Evaluated by a Network Meta-Analysis.” *Plants*, 2023; vol. 12, no. 3, pp. 572. DOI: 10.3390/plants12030572. E-ISSN: 2223-7747

83. KAWAGUCHI, A., Sawada, H., Inoue, K., and Nasu, H. „Multiplex PCR for the identification of Agrobacteriumbiovar 3 strains, J. Genet.” Plant Pathol., 2005, vol. 71,no. 1, pp. 54–59. ISSN: 0918-2787, 1618-0860 (electronic)

84. KIM, M.Y., CHO, K.H., CHUN, J.A., PARK, S.J., Kim, S.H., Lee, H.C. „Elimination of grapevine fleck virus from infected grapevines ‘Kyoho’ through meristem-tip culture of dormant buds.” *Journal of Plant Biotechnol*, 2017, vol. 44, pp. 401–408. DOI: 10.5010/JPB.2017.44.4.401. ISSN: 1226-9239

85. KIM, S.H, ZEBRO, M., JANG, D. C, SIM, J. E., PARK, H-K, KIM, K-Y, BAE, H-M, TILAHUN, S., PARK, S.M. „Optimization of plant growth regulators for in vitro mass propagation of a disease-Free ‘Shine Muscat’ grapevine cultivar.” Current Issues in Molecular Biology, 2023; vol. 45, no. 10, pp. 7721-7733. DOI: 10.3390/cimb45100487.

86. KIM, Y., KIM, Y.J., PAEK, K.H. „Temperature-specific vsiRNA confers RNAi-mediated viral resistance at elevated temperature in Capsicum annuum." Journal of Experimental Botany, 2021, vol. 72, pp. 1432–1448. DOI: 10.1093/jxb/eraa527. ISSN: 0022-0957
87. KOMAR, V., VIGNE, E., DEMANGEAT, G., FUCHS, M. „Beneficial effect of selective virus elimination on the performance of Vitis vinifera cv. Chardonnay." *American Journal of Enology* and Viticulture, 2007, vol. 58, pp. 202-210. DOI: 10.1111/j.1744-7348.2007.00121.x
88. KOMÍNEK, P., KOMÍNKOVÁ, M., JANDOVÁ, B. „Effect of repeated Ribavirin treatment on grapevine viruses" *Acta Virologica,* 2016, vol.60,pp.400–403.DOI: 10.4149/av_2016_04_400
89. KOVACS, L.G., HANAMI, H., FORTENBERRY, M., KAPS, M.L. „Latent infection by leafroll agent GLRaV-3 is linked to lower fruit quality in French–American hybrid grapevines Vidal blanc and St. Vincent." *American Journal of Enology and Viticulture*, 2001, vol. 52, pp. 254-259. DOI: 10.5344/ajev.52.3.254
90. KŘIŽAN, B., ONDRUŠIKOVÁ, E., HOLLEINOVÁ, V., MORAVCOVÁ, K. BLÁHOVÁ, „L. Elimination of Grapevine fanleaf virus in Grapevine by in vivo and in vitro thermotherapy." Horticultural Science, 2009, vol. 36, pp. 105–108. ISSN: 1336-4622
91. KUZMANOVIĆ, N., BIONDI, E., OVERMANN, J. et al. „Genomic analysis provides novel insights into diversification and taxonomy of All. vitis (i.e. Agrobacterium vitis)." BMC Genomics, 2022, vol. 23, article 462. DOI: 10.1186/s12864-022-08920-3
92. KUZMANOVIĆ, N., PULAWSKA, J., HAO, L., BURR, T.J. „The ecology of Agrobacterium vitis and management of crown gall disease in vineyards." In: Gelvin S (ed.). Agrobacterium Biology. Current Topics in Microbiology and Immunology, Cham: Springer, 2018, vol 418. pp. 15-53. ISBN: 978-3-030-00403-2, DOI: 10.1007/82_2018_111
93. LA NOTTE, P., BUZKAN, N., CHOUEIRI, E., MINAFRA, A., MARTELLI, G.P., „Acquisition and transmission of grapevine virus A by the melybug Pseudococcus longispinus. J." Plant Pathology, 1997, vol. 79, pp.9–85. ISSN: 1125-4653
94. LACROIX, B., CITOVSKY, V. „Pathways of DNA transfer to plants from Agrobacterium tumefaciens and related bacterial species." Annual Review of Phytopathology, 2019, vol. 57, pp.231-251. ISSN: 0066-4286, DOI: 10.1146/annurev-phyto-080518-035822
95. LARIGNON, P., FONTAINE, F., FARINE, S., CLÉMENT, C. „Esca et Black Dead Arm: deux acteursmajeurs des maladies du bois chez la Vigne." Comptes Rendus Biologies, 2009, vol. 332, pp. 765–783. ISSN: 1631-0691
96. LEE, H.B., LEE, J.H., AN, S.K., PARK, J.H., KIM, K.S. „Growth characteristics and flowering initiation of Phalaenopsis Queen Beer 'Mantefon' as affected by the daily light integral." *Horticulture, Environment and Biotechnology*, 2019, vol 60, pp. 637–645.

97. Legea nr. 420-XVI din 22 decembrie 2006 privind activitatea de reglementare tehnică. Monitorul Oficial al Republicii Moldova, 2007, nr. 36-38.
98. Legea nr. 57-XVI din 10 martie 2006 viei şi vinului. Monitorul Oficial al Republicii Moldova, 2006, nr. 75-78.
99. LIMA, M. F., ROSA, C., GOLINO, D. A., ROWHANI, A. „Detection of Rupestris stem pitting associated virus in seedlings of virus-infected maternal grapevine plants." În: *Extended abstracts 15th meeting of ICVG*, Stellenbosch, 2006, pp. 244–245.
100.LIU, J., ZHANG, X.J., ZHANG, F.G.P., HONG, N., WANG, G.P., WANG, A.; WANG, L. „Identification and characterization of microRNAs from in vitro-grown pear shoots infected with Apple stem grooving virus in response to high temperature using small RNA sequencing." BMC Genomics, 2015, vol. 16, article 945. DOI: 10.1186/s12864-015-2136-1.
101.LIU, M., ZHAO, Y., FAN, P., KONG, J., Wang Y, Xu X, Xu M, WANG, L., Li, S., LIANG Z., DUAN, W., DAI, Z. „Grapevine plantlets respond to different monochromatic lights by tuning photosynthesis and carbon allocation." Horticulture Research, 2023, vol. 10, no. 9, uhad160. DOI: 10.1093/hr/uhad160. PMID: 37719274; PMCID: PMC10500148.
102.MALIOGKA, V.I., MARTELLI, G.P., FUCHS, M., KATIS, N.I. „Control of viruses infecting grapevine." In: LOEBENSTEIN, G., KATIS, N.I. (eds.) Advances in Virus Research. Control of Plant Virus Diseases: Vegetatively-Propagated Crops., Burlington: Academic Press, 2015, vol. 91, pp. 175–227. ISBN 978-0-12-802762-2.
103. MANNINI, F. „Clonal selection in grapevine: interactions between genetic and sanitary strategies to improve propagation material." Acta Horticulturae, 2000, vol. 528, pp. 703–712. ISSN 0567-7572.
104.MANNINI, F., MARZACHI, C. „Termoterapia in acqua contro i fitoplasmi della vite." Informatore Agrario, 2007, vol. 63, pp. 62–65. ISSN 0020-0689.
105.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, article 82. DOI: 10.3389/fmicb.2013.00082. ISSN 1664-302X.
106.MARINO, L.A., RUFFA, P., MOZZANINI, E., PATO-NO, D.L., SERENO, A., PAVESE, V. „LEDs in Plant Tissue Culture: Boosting Micropropagation." În: Journal of Plant Growth Regulation, 2025. DOI: 10.1007/s00344-025-11812-6.
107.MARTELLI, G. P., SAVINO, V. Fanleaf degeneration. In: R. C. Pearson & A. Goheen (Eds.), *Compendium of grape diseases*. St. Paul, MN: APS Press, 1990, pp. 48–49. ISBN 978-0-89054-157-3.

108.MARTELLI, G.P., WALTERB., PINCK, L. Grapevine fanleaf virus. AAB Descriptions of Plant Viruses, 2003, no. 385. ISSN 0567-6908.
109. MARTELLI,, G. P., BOUDON-PADIEU, E. „Directory of infectious diseases of grapevines." In: G. P. Martelli & E. Boudon-Padieu (Eds.), Options Méditerranéennes, Serie B: Études et Recherches, Bari, Italy: CIHEAM-IAMB, 2006, vol. 55, pp. 9–194. ISSN 1016-1224.
110.MCGREAL, B. et al. „Retention and transmission of grapevine leafroll-associated virus 3 by Pseudococcus calceolariae." Frontiers in Plant Science, 2021, vol. 12, article 663948 DOI:10.3389/fmicb.2021.663948.
111. MILER, N., KULUS, D., WOŹNY, A., RYMARZ, D., HAJZER, M., et al. „Application of wide-spectrum light-emitting diodes in micropropagation of popular ornamental plant species: a study on plant quality and cost reduction." In: *Vitro Cellular & Developmental Biology* – Plant, 2019, vol. 55, pp. 99–108.
112.Ministerul Agriculturii și Dezvoltării Rurale (MADR). Ghid de bune practici privind măsurile de prevenire și combatere a bolilor și dăunătorilor la vița-de-vie – proiect ADER 2.2. București: MADR, 2020
113. MONTGOMERY, D. C. *Design and Analysis of Experiments* (9th ed.). Hoboken: John Wiley & Sons, 2017. ISBN 9781119113478.
114. MOUSAVI, S. A., ÖSTERMAN, J., WAHLBERG, N., NESME, X., LAVIRE, C., VIAL, L., PAULIN, L., de LAJUDIE, P., & LINDSTRÖM, K. „Phylogeny of the Rhizobium–Allorhizobium–Agrobacterium clade supports the delineation of Neorhizobium gen. nov." In: Systematic and Applied Microbiology, Vol. 37, No. 3, 2014, pp. 208-215. DOI: 10.1016/j.syapm.2013.12.007.
115. MOUSAVI, S.A., WILLEMS, A., NESME, X., DE LAJUDIE, P., LINDSTRÖM, K. „Revised phylogeny of Rhizobiaceae: Proposal of the delineation of Pararhizobium gen. nov., and 13 new species combinations." Systematic and Applied Microbiology, 2015, vol. 38, pp. 84–90. ISSN 0723-2020. DOI: 10.1016/j.syapm.2014.10.004.
116. MOYER, M.M., GROVE, G. „Crown Gall." In: Field Guide for Inregrated Pest Management in Pacific Northwest Vineyards. Moyer MM and O'Neal SD (eds.). Pacific Northwest Extension Publication # PNW644, 2014.
117. MOZAFARI, A. GHORAISHI, O., GHADERI, N., JAVADI, T. „Micropropagation of grape cultivars (*Vitis vinifera L.)* on different basal media supplemented with aenzyl adenine." Agriculturae Conspectus Scientificus, 2017, vol. 81, no.1, p.4. 1331-7768.

118. NAIDU, R.A., MAREE, H.J., BURGER, J.T. „Grapevine leafroll disease and associated viruses: a unique pathosystem.” Annual Review of Phytopathology, 2015, vol. 53, pp. 613–634. DOI: 10.1146/annurev-phyto-080614-120019. ISSN 0066-4286.
119. National Clean Plant Network. Clean Plant Process. Disponibil la: https://www.nationalcleanplantnetwork.org/clean-plant-process [accesat: 15 iunie 2025].
120. O'HEARN, J.S., WALSH, D. B. „Grapevine leafroll-associated virus 3 vectored by Pseudococcus maritimus at low population levels.” *Journal of Entomological Science*, 202, vol. 56, pp.106-110. ISSN 0749-8004. DOI: 10.18474/JES20-28.
121. PALLANT, J. SPSS *Survival Manual: A Step by Step Guide to Data Analysis Using IBM SPSS* (7th ed.). London: Open University Press, 2020. ISBN 9780335249497.
122. PANATTONI, A., TRIOLO, E. „Susceptibility of grapevine viruses to thermotherapy on in vitro collection of Kober 5BB.” Sc. Horticulture, 2010, vol. 125, pp. 63–67. ISSN 0304-4238. DOI: 10.1016/j.scienta.2010.03.008.
123. PAULUS, F., HUSS, B., BONNARD, G., RIDE, M., SZEGEDI, E., TEMPE, J., PETIT, A., OTTEN, L. „Molecular sistematics of biotype III Ti plasmids of Agrobacterium tumefaciens.” Molecular Plant-Microbe Interactions, 1989, vol. 2, pp. 64-74. ISSN 0894-0282.
124. PetiolePro. Leaf area meter – Petiole Pro. Disponibil: https://www.petiolepro.com/leaf-area-meter-petiole-pro (accesat: 2025)
125. POLIVANOVA, O. B., BEDAREV, V. A. „Hyperhydricity in plant tissue culture.” Plants, 2022, vol.11, no. 23, article 3313. ISSN 2223-7747. DOI: 10.3390/plants11233313.
126. POP, I.. *Virusurile plantelor horticole și combaterea lor*. București: Ceres, 1989. 174 p. ISBN 973-40-0087-2.
127. PUŁAWSKA, J. „Crown gall of grapevine: biology of Agrobacterium vitis and biotechnological possibilities of genetic engineering of grapevine.” Postępy Mikrobiologii, 2010, vol. 49, no. 2, 163–172. ISSN 0079-4252.
128. PUŁAWSKA, J., SOBICZEWSKI, P. „Development of a semi-nested PCR based method for sensitive detection of tumorigenic Agrobacterium in soil.” Journal of Applied Microbiology, 2005, vol. 98, no. 3, pp. 710–721. ISSN 1364-5072. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2004.02507.x.
129. Qualiplante. User Manual – PCR Detection Kit *Agrobacterium vitis*. Version 04, 01.11.2020.
130. REYNARD, J.S., MURISIER, F. Les porte-greffes de vigne: comportement agronomique, compatibilité et adaptation aux conditions pédoclimatiques. Changins: Agroscope, 2012, 85 p. ISBN 978-2-9700697-7-8.

131. ROWHANI, A., LA NOTTE, P., UYEMOTO, J.K., DAUBERT, S.D., SAVINO, V. „Biological Assays." In: Grapevine Viruses: Molecular Biology, Diagnostics and Management; Springer: Heidelberg, 2017; pp. 395–408. ISBN 978-3-319-57706-7.
132. ROY, M.A., SASSER, M. „A medium selective for Agrobacterium tumefaciens biotype 3." Phytopathology, 1983, vol. 73, nr. 6, p. 810. ISSN 0031-949X. DOI: 10.1094/Phyto-73-810.
133. SADIGOVA, A, GARAGOZOV, T., SULEYMANOVA, A. „Influence of spectral composition and light intensity on morphogenesis of grape plants during in vitro Micropropagation." Trends in Modern Biology and Biotechnology, 2021, vol. 5, pp. 104–108. ISSN 2706-8812.
134. SAN PEDRO, T., PEIRÓ, R., VILLANOVA, J., OLMOS, A., GISBERT, C. „In vitro propagation of Vitis vinifera L. cv. 'Monastrell'." Electronic Journal of Biotechnology, 2017, vol. 27, pp. 80–83. ISSN 0717-3458. DOI: 10.1016/j.ejbt.2017.02.004.
135. SHAN, F., SEATON, K. „Semi-sterilized tissue culture for rapid propagation of grapevines (Vitis vinifera L.) using immature cuttings." HortScience, 2014, vol. 49(7), pp. 949–954. DOI: 10.21273/HORTSCI.49.7.949.
136. SHU, Q., NAIR, V. „Inosine monophosphate dehydrogenase (IMPDH) as a target in drug discovery." Medicinal Research Reviews, 2008, vol. 28, no. 2, pp.219-32. ISSN 0198-6325. DOI: 10.1002/med.20106.
137. SILVA, M.M.A., DE OLIVEIRA, A.L.B., OLIVEIRA-FILHO, R.A., GOUVEIA-NETO, A.S., CAMARA, T.J.R., WILLADINO, L.G. „Effect of blue/red LED light combination on growth and morphogenesis of Saccharum officinarum plantlets in vitro." Prog. Biomed. Opt. Imaging - Proc. SPIE, 2014, vol 8947. ISSN 1605-7422. DOI: 10.1117/12.2044067.
138. SILVESTRONI, O. „Prime esperienze sulla micropropagazione della vite europea." *Vignevini*, 1981, vol. 8, no. 10, pp. 31-37.
139. SKIADA, F. G., GRIGORIADOU, K., MALIOGKA, V. I., KATIS, N. I., ELEFTHERIOU, E. P. „Elimination of Grapevine leafroll-associated virus 1 and Grapevine rupestris stem pitting-associated virus from grapevine cv. Agiorgitiko, and a micropropagation protocol for mass production of virus-free plantlets." Journal of Plant Pathology, 2009, vol. 91, 177–184.
140. SKIADA, F.G., MALIOGKA, V.I., KATIS, N.I., ELEFTHERIOU, E.P. „Elimination of Grapevine rupestris stem pitting-associated virus (GRSPaV) from two Vitis vinifera cultivars by in vitro chemotherapy." *European Journal of Plant Pathology*, 2013, vol. 135, pp. 407–414.
141. SKOOG, F., MILLER, C. O. „Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured in vitro." Symposia of the Society for Exper. Biol., 1957, vol. 11, pp. 118–131.

142. Soiuri de struguri pentru vin. Ghid complet cu recomandări. În: WineDeals.ro. 19 august 2022 (accesat: 2025).Disponibil:https://winedeals.ro/blog/post/soiuri-de-struguri-pentru-vin.html
143. SOLDATOV, V. S. Iskusstvennye pochvy dlia rastenii [Artificial soils for plants]. Minsk: Nauka i Tekhnika, 1985. 61 p.
144. SOLIS-TOAPANTAE., GÓMEZ, C. „Growth and photosynthetic capacity of basil grown for indoor gardening under constant or increasing daily light integrals." *HortTechnology*, 2019, vol. 29, no. 6, pp. 880–888. DOI: 10.21273/HORTTECH04442-19. ISSN 1063-0198.
145. SOLTANI, S., AROUIEE, H, SALEHI, R., NEMATI, S. H., MOOSAVI-NEZHAD, M.; GRUDA, N.S., ALINIAEIFARD, S. „Morphological, phytochemical, and photosynthetic performance of grafted tomato seedlings in response to different LED Light Qualities under Protected Cultivation." *Horticulturae*, 2023, vol. 9, no. 4, article 471. ISSN 2311-7524.
146. SOLTEKIN, I., ALTINDISLI, A. „Effects of hot water treatments on dormant grapevine propagation materials used for grafted vine production." In: *BIO Web of Conferences*, 2017, vol. 9, p. 01003. DOI: 10.1051/bioconf/20170901003. 40th World Congress of Vine and Wine.
147. SOMMER, S.G, CASTRO-ALVES, V, HYÖTYLÄINEN, T, STRID, Å, ROSENQVIST, E. „The light spectrum differentially influences morphology, physiology and metabolism of Chrysanthemum × morifolium without affecting biomass accumulation." Physiol Plant, 2023, vol. 175, no. 6, e 14080. ISSN 0031-9317. DOI: 10.1111/ppl.14080.
148. SZEGEDI, E., BOTTKA, S., MIKULAS, J., OTTEN, L., SULE, S. „Characterization of *A. tumefaciens* strains isolated from grapevine." Vitis, 2005, vol. 44, , pp. 49–54. ISSN 0042-7500.
149. TARAN, N. (coord.). Soiuri de struguri de selecție nouă și autohtone în vinificație. Monografie. Chișinău: Ministerul Agriculturii și Industriei Alimentare; Agenția Națională pentru Cercetare și Dezvoltare, 2022. ISBN 978-9975-164-89-4.
150. TARQUINI, G., DALL'ARA, M., ERMACORA, P., RATTI, C. „Traditional approaches and emerging biotechnologies in grapevine virology." Viruses, 2023, vol. 15, no. 4, article 826. ISSN 1999-4915. DOI: 10.3390/v15040826.
151. TechDrinks.info. „Moldovenii au creat un nou soi tehnic de struguri – Meleag." [online]. Chișinău, 2020. Disponibil: https://techdrinks.info/moldavskye-selektsyonery-vyvely-novyj-tehnycheskyj-sort-vynograda-melyag (accesat: 2025).
152. Telti-Kuruk Grape (Coada vulpii). În: Slow Food Foundation – Ark of Taste. Torino, 2024 . Disponibil: https://www.fondazioneslowfood.com/en/ark-of-taste-slow-food/telti-kuruk-grape/
153. TERAY, Y. „Anjinashika disease: a combined effect of grapevine leafroll and grapevine fleck viruses on sugar content in the Japanese grape cultivar Koshu." In: Proceedings of the 10th Meeting of ICVG, Volos (Greece), 1990, pp. 67-70.

154. TRUEL, P., CARBONNEAU, A. Les porte-greffes de la vigne cultivée. Montpellier: INRA, 1985, 175 p. ISBN 2-7380-0097-2.
155. TSAI, C.W., ROWHANI, A., GOLINO, D.A., DAANE, K.M., ALMEIDA, R.P. „Mealybug transmission of grapevine leafroll viruses: an analysis of virus–vector specificity.” In: Phytopathology 2010, vol. 100, pp. 830–834.
156. TSAI, C.W., DAUGHERTY, M. P., ALMEIDA, R. P. P. Seasonal dynamics and virus translocation of Grapevine leafroll-associated virus 3 in grapevine cultivars. Plant Pathology, 2012, vol. 61, pp. 977–985.
157. TURCSAN, M., DEMIAN, E., VARGA, T., JAKSA-CZOTTER, N., SZEGEDI, E., OLAH, R., VARALLYAY, E. „HTS-based monitoring of the efficiency of somatic embryogenesis and meristem cultures used for virus elimination in grapevine.” In: *Plants*, 2020, vol. 9, article 1782. DOI: 10.3390/plants9121782.
158. Uniunea Europeană. 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. În: Official Journal of the European Union, L 319, 10 decembrie 2019.
159. Uniunea Europeană. Council Directive 68/193/EEC of 9 April 1968 on the marketing of material for the vegetative propagation of the vine. În: Official Journal of the European Communities, L 93, 17 aprilie 1968, p. 15–23.
160. Uniunea Europeană. Directive 2008/90/EC of the Council of 29 September 2008 on the marketing of fruit plant propagating material and fruit plants intended for fruit production. În: Official Journal of the European Union, L 267, 8 octombrie 2008, p. 8–22.
161. Uniunea Europeană. Regulation (EU) 2016/2031 of the European Parliament and of the Council of 26 October 2016 on protective measures against pests of plants. În: Official Journal of the European Union, L 317, 23 noiembrie 2016, p. 4–104.
162. Uniunea Europeană. Regulation (EU) 2017/625 of the European Parliament and of the Council of 15 March 2017 on official controls and other official activities. În: Official Journal of the European Union, L 95, 7 aprilie 2017, p. 1–142.
163. VALERO, M., IBANEZ, A., MORTES, A. „Effects of high vineyard temperatures on the Grapevine leafroll associated virus elimination from Vitis vinifera L. cv. Napoleon tissue cultures.” In: *Scientia Horticulturae*, vol. 97, pp. 289–296. ISSN: 0304-4238
164. VELEZ-RAMIREZA.I., DÜNNER-PLANELLA, G., VREUGDENHIL, D., MILLENAAR, F.F., VAN IEPEREN, W. „On the induction of injury in tomato under continuous

light: Circadian asynchrony as the main triggering factor.” Functional Plant Biology, 2017, vol. 44, pp. 597–611. ISSN 1445-4408. DOI: 10.1071/FP16345.

165. VIRŠILĖ, A., OLLE, M., DUCHOVSKIS, P. LED „Lighting in Horticulture.” In: *Light emitiing diodes for agriculture – smart lighting*, 1st ed.; Ed.; Spri.: Singapore, 2017, pp. 113–147. SBN: 978-981-10-5806-6, 978-981-10-5807-3 (e-book). DOI: 10.1007/978-981-10-5807-3

166. VONČINA, D., RADIĆ, T., ŽANIĆ, K., ČARIJA, M., JEMRIĆ, T, S. „Virus and virus-like pathogens in the grapevine virus collection of Croatian autochthonous cultivars.” In: *Plants*, 2022, vol. 11, no. 11, article 1485. https://doi.org/10.3390/plants11111485.

167. WAITE, H., MORTON, L. „Hot water treatment, trunk diseases and other critical factors in the production of high-quality grapevine planting material.” In: Phytopathologia Mediterranea, 2007, vol. 46, pp. 5-17.

168. WALTERS, K.J, CURRY, C.J. „Effects of nutrient solution concentration and daily light integral on growth and nutrient concentration of several basil species in hydroponic production.” In: *HortScience,* 2018, vol. 53, no. 6, pp. 1319–1325. DOI: 10.21273/HORTSCI13340-18

169. YU, D. H.,. MEREDITH, C. P. „The influence of explant origin of tissue browning and shoot production in shoot tip cultures of grapevine.” In: *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 1986,vol. 111, pp. 972-975

170. YUAN, Y., LIU, S., XIE, Y., NIE, J., YANG, X. HUANG, R. „The Effects of Light Duration and Intensity with Supplemental Light-Emitting Diode Lights on Grape Photosynthesis, Yield, and Fruit Quality.” In: *Agronomy*, 2025, vol. 15, no. 3, article 518. https://doi.org/10.3390/agronomy15030518

171. ZINKA, N. An. Ins. Cerc. Prot. Pl. 5, 151, 1969.

172. ZORLONI, A., PRATI, S., BIANCO, P. A., BELLI, G. „Transmission of Grapevine virus A and Grapevine leafroll-associated virus 3 by Heliococcus bohemicus.” In: *Journal of Plant Pathology*. 2006, vol. 88, pp. 325–328.

173. АМПЕЛОГРАФИЯ СССР. Отечественные сорта винограда. Москва: Легкая и пищевая промышленность, 1984, 504 с. ISBN 5-00123-456-7.

174. БЕЛОШАПКИНА, О.О. Биологические и технологические основы оздоровления посадочного материала земляники от вирусов. – М.: Изд-во МСХА, 2005, 162 с.

175. БОНДАРЧУК, В.В., МАРИНЕСКУ, В.Г.. Получение безвирусных клонов винограда путем отбора. „Вирусные, микоплазменные и бактериальные болезни плодовых культур и винограда в Молдавии” Кишинев, 1980, с. 78–93.

176. ВЕРДЕРЕВСКАЯ, Т.Д., МАРИНЕСКУ, В.Г. „Вирусные и микроплазменные заболевания плодовых культур и винограда” Кишинёв: Штиинца, 1985.– 311 с.

177. ВЕРДЕРЕВСКИЙ, Д.Д. „Короткоузлие винограда в Молдавии.” În: «Виноделие и виноградарство в Молдавии, 1946, № 5–6, стр. 65–70.
178. ВЕРДЕРЕВСКИЙ, Д.Д., ЛУКИНА, К.Н. Короткоузлие на виноградниках Молдавии. «Виноделие и виноградарство СССР». 1948, 5, 29–31.
179. ГЕОРГИЕВА, П.Л., СТОЯНОВ, Д.В. „Тестирование вирусов виноградной лозы на зеленых черенках виноградных индикаторах. Производство безвирусного посадочного материада плодовых культур и винограда”. Кишинев, 1975, стр. 20–23.
180. ГОРИНГ, Х. „Преодоление витрификации и улучшение акклиматизации растений при микроклональном размножении”. Ростов-на-Дону, 1993. 64 с.
181. ДЖИГАДЛО, Е.Н., ДЖИГАДЛО, М.И., ГОЛЫШКИНА, Л.В. „Методические рекомендации по использованию биотехнологических методов в работе с плодовыми, ягодными и декоративными культурами” Орёл: ВНИИСПК, 2005. — 51 с.
182. **ДУБЧАК, М**., ХАУСТОВ, Е.; СУЛТАНОВА, О.; БОНДАРЧУК, В. „Горячая водная терапия в фитосанитарной селекции винограда.” Журнал. Русский виноград. Сборник научных трудов, Том 13. Новочеркасск. 2020. стр. 16-24. ISSN 2412-9836. DOI: 10.32904/2412-9836-2020-13-16-24 3.
183. ІВАНОВА-ХАНІНА, Л.В. Клональне мікророзмноження і отримання оздоровленого садивного матеріалу винограду у культурі in vitro: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. с. г. наук: спец. 06.01.14 «Насінництво» / Л.В. Ханіна. Сімферополь, 2010. 20 с.
184. ЛЕМАНОВА, Н., БЕРБЕР, П. În: Садоводство, виноградарство и виноделие Молдавии, 1976, № 12.
185. ЛЕМАНОВА, Н.Б. „Разработка биологических методов борьбы с бактериальным раком винограда.” În: Проблемы и перспективы развития виногро-винодельческого подкомплекса Республики Молдова. Кишинев, 1992, стр. 20–22.
186. ЛУКАС, М., АГИЛАС, П. „Беспочвенное выращивание растений в мешках с перлитом в Альмерии, Испания.” În: Производство и применение агроперлита. Опыт, технологии, перспективы: материалы международной научно-практической конференции, г. Киев, 26–28 мая 2008 г. / Нац. бот. сад им. Н.Н. Гришко НАН Украины, ГП «УкрНИИСтройматериалов и изделий». – Киев, 2008. – С. 43–56.
187. ЛУКЬЯНОВА, Е.А. Вирусные болезни ягодных растений в ЦЧР. – Мичуринск: МГПИ, 2007, 115 с.
188. МАРИНЕСКУ, В.Г. „Индексация Вирусных заболеваний винограда методом зеленых прививок в теплице.” În: *Вирусные, микоплазменные и бактериальные болезни плодовых культур и винограда в Молдавии*. Кишинев, 1980, стр. 72–77.

189. МАРИНЕСКУ, В.Г. „Состав и распространение вирусных болезней винограда в Молдавии.” În: *Пути повышения урожайности плодовых культур и винограда*. Кишинев, 1972, ч. П. а, 103–110.

190. МЕДВЕДЄВА, Т.В. „Проблеми акліматизації культивованих in vitro рослин / Т.В. Медведєва.” În: *Фізіологія і біохімія культурних рослин*. 2008. Т.40, Ne 4. С, 299-308.

191. РЕБРОВ, А.Н. Адаптация растений винограда in vitro к условиям нестерильной среды: автореф. дисс. На соискание ученой степени канд. биол. наук: спец. 06.01.07 «Плодоводство, виноградарство» / А.Н. Ребров. Новочеркасск, 2007, 27 с.

192. СУЛТАНОВА, О.Д, ЛЕМАНОВА, Н.Б. „Бактериальные заболевания винограда и изучение их распространения в Молдавии.” În: *Защита винограда и плодовых культур от вредителей и болезней.* Кишинев, 1983, стр. 84–87.

193. Хаустов, Е.; **ДУБЧАК, М.;** Бондарчук, В. „Почернение древесины - фитоплазменное заболевание винограда в Республике Молдова. Журнал.” În: *Русский виноград*. Сборник научных трудов, Том 12. Новочеркасск. 2020. стр. 33-40. ISSN 2412-9836 DOI: 10.32904/2412-9836-2020-12-33-40 4.

194. ЦУРКАН, И.Г., БОНДАРЧУК, В.В. Водная терапия черенков винограда пораженных мраморнастью листьев. «Вирусные, микоплазменные и бактериальные болезни плодовых культур и винограда в Молдавии». Кишинев, 1983, стр. 82–87.

195. ЧЕРЕВАТА, Т.М. Розробка і оптимізація прийомів клонального мікророзмноження для виробництва садивного матеріалу винограду: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. с. - г. наук: спец. 06.01.08 „Виноградарство" / Т.М. Черевата. - Одеса, 2006, 22 с.

196. ЭНЦИКЛОПЕДИЯ ВИНОГРАДАРСТВА. Кишинев: Главная редакция Молдавской Советской Энциклопедии, Том 2, 504 с. ISBN 5-335-00412-0.

ANEXE

Anexa 1

Act de înființare a plantației-mamă de categoria biologică Prebaza an. 2019

APROB:
Director adjunct știința dr. hab., prof univ.
Taran Nicolae
06 iulie an.2020

ACT
privind infiinţarea plantaţiei-mamă de categorie biologică "PREBAZA"
din 06 iulie an.2020

Noi, subsemnaţii, membrii a comisiei Laboratorului de Virusologie şi Control Fitosanitar IŞPHTA, Bondarciuc Victor, Dubceac Marcela, Haustov Evghenii, Constantinova Irina şi Nazari Ion am întocmit acest act pentru a confirma faptul că în perioada 15-19 iunie 2020, în plantaţia mamă de categorie biologică "PREBAZA", au fost plantaţe clone 10 soiuri a viţei de vie cu viţe vegetante pe rădăcini proprii crescute în sera laboratorului. Materialul săditor a fost obţinut în anii 2019-2020 prin metoda de butaşire microclonală *in vitro* a clonelor iniţiale libere de viruşi şi cancer bacterian, în următorul sortiment şi cantitate:

Soiuri tehnice	**(buc.)**	**Soiuride masă**	**(buc.)**
Feteasca albă cl.INVV10-21	172	Tudor cl.INVV56-36	112
Feteasca regală cl.INVV10-71	162	Cişmiş lucistîi cl.INVV5-81	220
Merlot cl.INVV14-41	150	**Soiuri de portaltoi**	
Negru de Căuşeni cl.INVV21-11	165	RxR 101-14 cl.INVV11-32	330
Sauvignon cl.INVV 10-91	210	BxR SO4 cl.INVV6- 42	450
Telti Curuc cl.INVV11-55	396	BxR Cober 5BB cl.INVV3-21	430

În total au fost plantate 2797 buc. (1,20ha) viţelor vegetante de viţa de vie.

Semnăturile:

Şef laborator, dr. şt. agr. Bondarciuc Victor
Colaborator ştiinţific Haustov Evghenii
Colaborator ştiinţific Dubceac Marcela
Colaborator ştiinţific Constantinova Irina
Agronom Nazari Ion

Anexa 2

Act de înființare a plantației-mamă de categoria biologică Prebaza an. 2020

APROB:
Director adjunct știința dr. hab., prof univ.
Taran Nicolae
02 iulie an.2019

ACT

privind infiinţarea plantaţiei-mamă de categorie biologică "PREBAZA"
din 02 iulie an.2019

Noi, subsemnaţii, membrii a comisiei Laboratorului de Virusologie şi Control Fitosanitar IŞPHTA, Bondarciuc Victor, Sultanova Oliga, Dubceac Marcela, Haustov Evghenii, Constantinova Irina şi Nazari Ion am întocmit acest act pentru a confirma că în perioada 11-15 iunie 2019, în plantaţia mamă de categorie biologică "PREBAZA", au fost plantaţe 7 soiuri a viţei de vie cu vite vegetante pe rădăcini proprii crescute în sera laboratorului. Materialul săditor a fost obţinut în anii 2017-2018 şi multiplicat prin metoda de butaşire microclonală *in vitro* a clonelor iniţiale libere de viruşi şi cancerul bacterian, în următorul sortiment şi cantitate:

Soiuri tehnice	**(buc.)**	**Soiuri de masă**	**(buc.)**
Copceac cl.INVV18-15	426	Moldova cl.INVV13-12	450
Legenda cl.INVV31-36	325	Cişmiş moldavschii INVV5-81	369
Pinot noir cl.INVV12-44	418	Apiren roz cl.INVV40-42	393
Plăvae cl.INVV 21-22	355		
Subtotal	1524	Subtotal	1212
Total		2736 (1,17ha)	

Semnăturile:

Şef laborator, dr. şt. agr. _____ Bondarciuc Victor

Colab.şt.coord. dr. şt. biolr. _____ Sultanova Oliga

Colaborator ştiinţific _____ Dubceac Marcela

Colaborator ştiinţific _____ Constantinova Irina

Agronom _____ Nazari Ion

Anexa 3

Act de înființare a plantației-mamă de categoria biologică Prebaza an. 2021

APROB:
Director adjunct știința dr. hab., prof univ.
_____Taran Nicolae
09 iulie an.2021

ACT
privind infiinţarea plantaţiei-mamă de categorie biologică "PREBAZA"
din 09 iulie an.2021

Noi, subsemnaţii, membrii a comisiei Laboratorului de Virusologie şi Control Fitosanitar IŞPHTA, Bondarciuc Victor, Sultanova Oliga, Dubceac Marcela, Haustov Evghenii, Constantinova Irina şi Nazari Ion am întocmit acest act pentru a confirma faptul că în perioada 10-18 iunie 2021, în plantaţia mamă de categorie biologică "PREBAZA", au fost plantate clone 7 soiuri a viţei de vie cu viţe vegetante pe rădăcini proprii crescute în sera laboratorului. Materialul săditor a fost obţinut în anii 2019-2020 prin metoda de butaşire microclonală *in vitro* a clonelor iniţiale fără viruşi şi cancer bacterian, în următorul sortiment şi cantitate:

Soiuri tehnice	**(buc.)**	**Soiuri de masă**	**(buc.)**
Onițcanscii belîi cl.IVV9-14	140	Velica cl. INVV2-32	121
Busuiocă de Moldova cl.INVV19-57HR	120	Muscat Iona cl. INVV3-55	124
Busuiocă de Bohotin cl.INVV18-67HR	118	**Soiuri de portaltoi**	
Luminița cl.INVV3-40	74	Maleque cl.31MD	550
Subtotal	452	Subtotal	795
Total		1247buc. (0,54ha)	

Semnăturile:

Şef laborator, dr. şt. agr. _____Bondarciuc Victor

Colab.şt.coord. dr. şt. biolr. _____Sultanova Oliga

Colaborator ştiinţific _____Haustov Evghenii

Colaborator ştiinţific _____Dubceac Marcela

Injiner superior _____Constantinova Irina

Agronom _____Nazari Ion

Anexa 4

Act de înființare a plantației-mamă de categoria biologică Baza an. 2019

APROB:
Director adjunct știința dr. hab., prof univ.
Taran Nicolae
02 iulie an.2019

ACT
privind infiinţarea plantaţiei-mamă de categorie biologică "BAZA"
din 02 iulie an.2019

Noi, subsemnaţii, membrii ai comisiei Laboratorului de Virusologie şi Control Fitosanitar IŞPHTA, Bondarciuc Victor, Sultanova Oliga, Dubceac Marcela, Haustov Evghenii, Constantinova Irina şi Nazari Ion am întocmit acest act pentru a confirma că în perioada 24-28 iunie 2019, în plantaţia mamă de categorie biologică "BAZA", au fost plantaţi butaşii a 7 soiuri de viţă de vie folosind butaşi altoiţi vegetanţi, crescuţi în sera laboratorului. Materialul pentru altoire a fost pregătit din plantaţia-mamă de categorie biologică "PREBAZA" a IŞPHTA. Înainte de altoire, coardele altoi şi portaltoi au fost tratate termic cu apă la temperatura de 50°C ± 1°C timp de 45 de minute. După stratificare, butaşii au fost plantaţi în casete cu substrat nutritiv şi plasate în sera laboratorului. Butaşii pentru plantare au fost crescuţi în seră în casete cu substrat din turbă, în următorul sortiment şi cantitate:

Soiuri tehnice	Cantitatea (ha)	Soiuri de masă	Cantitatea (ha)
Viorica cl.INVV8-116	0,18	Osennii ciornii cl.INVV 2-16	0,06
Riton cl. INVV 9-18	0,12	Surucenschii belîi cl.INVV12-36	0,03
		Codreanca cl.INVV2-4	0,03
		Guzun cl.INVV 30-32	0,03
		Ialovenschii ustoicivîi	0,03

Semnăturile:

Şef laborator, dr. şt. agr. Bondarciuc Victor

Colab.şt.coord. dr. şt. biolr. Sultanova Oliga

Colaborator ştiinţific Haustov Evghenii

Colaborator ştiinţific Dubceac Marcela

Injiner superior Constantinova Irina

Agronom Nazari Ion

Anexa 5

Act de înființare a plantației-mamă de categoria biologică Baza an. 2021

APROB:
Director adjunct știință dr. hab., prof univ.
Taran Nicolae
30 iunie an. 2021

ACT
privind înființarea plantației-mamă de categorie biologică "BAZA"
din 30 iunie an.2021

Noi, subsemnații, membrii ai comisiei Laboratorului de Virusologie și Control Fitosanitar IȘPHTA, Bondarciuc Victor, Sultanova Oliga, Dubceac Marcela, Haustov Evghenii, Constantinova Irina și Nazari Ion am întocmit acest act pentru a confirma că în perioada 14-25 iunie 2021, în plantația mamă de categorie biologică "BAZA", au fost plantați butașii a 15 soiuri de viță de vie folosind butași altoiți vegetanți, crescuți în sera laboratorului. Materialul pentru altoire a fost pregătit din plantația-mamă de categorie biologică "PREBAZA" a IȘPHTA. Înainte de altoire, coardele altoi și portaltoi au fost tratate termic cu apă la temperatura de 50°C ± 1°C timp de 45 de minute. După stratificare, butașii au fost plantați în casete cu substrat nutritiv și plasate în sera laboratorului. Butașii pentru plantare au fost crescuți în seră în casete cu substrat din turbă, în următorul sortiment și cantitate:

Soiuri tehnice	Cantitatea (ha)	Soiuri de masă	Cantitatea (ha)
Viorica cl.INVV8-16	0,30	Moldova cl.INVV16-71	0,30
Riton cl.INVV9-18	0,20	Moldova cl.INVV13-12	0,25
Floricica cl.INVV21-31	0,20	Chișmiș lucistîi cl.INVV5-81	0,24
Legenda cl.INVV21-36	0,10	Apiren roz cl.INVV40-42	0,07
Feteasca neagra cl.INVV18-2	0,20	Fumoasa albă cl.INVV3-41	0,03
Copceac cl.INVV18-2	0,15	Leana cl.INVV5-28	0,03
Plăivaie cl.INVV21-22	0,12	Tip Vierul cl.INVV52-22	0,03
Pinot noir cl.INVV12-44	0,09		

Șef laborator, dr. șt. agr. _____ Bondarciuc Victor

Colab.șt.coord. dr. șt. biolr. _____ Sultanova Oliga

Colaborator științific _____ Dubceac Marcela

Colaborator științific _____ Haustov Evghenii

Injiner superior _____ Constantinova Irina

Agronom _____ Nazari Ion

Anexa 6

Act de înființare a plantației-mamă de categoria biologică Baza an. 2023

APROB:
Director General interimar al IȘPHTA
_____V. Adajuc
04 septembrie an.2023

ACT
privind infiinţarea plantaţiei-mamă de categorie biologică "BAZA"
din 4 septembrie an.2023

Noi, subsemnaţii, membrii ai comisiei Laboratorului de Virusologie şi Control Fitosanitar IŞPHTA, Bondarciuc Victor, Sultanova Oliga, Dubceac Marcela, Haustov Evghenii, Constantinova Irina şi Nazari Ion am întocmit acest act pentru a confirma că în perioada 7-30 august 2023, în plantaţia mamă de categorie biologică "BAZA", au fost plantaţi butaşii a 15 soiuri de viţă de vie folosind butaşi altoiţi vegetanţi, crescuţi în sera laboratorului. Materialul pentru altoire a fost pregătit din plantaţia-mamă de categorie biologică "PREBAZA" a IŞPHTA. Înainte de altoire, coardele altoi şi portaltoi au fost tratate termic cu apă la temperatura de 50°C ± 1°C timp de 45 de minute. După stratificare, butaşii au fost plantaţi în casete cu substrat nutritiv şi plasate în sera laboratorului. Butaşii pentru plantare au fost crescuţi în seră în casete cu substrat din turbă, în următorul sortiment şi cantitate:

Soiuri tehnice	Cantitatea (buc)	Soiuri de masă	Cantitatea (buc)
Fetească alba cl.INVV13-111	610	Chişmiş lucistîi cl.INVV5-81	710
Feteasca regală cl.INVV10-71	720	Apiren roz cl.INVV40-42	200
Negru de Căuşeni cl.INVV21-1	630	Moldova cl.INVV16-71	250
Copceac cl.INVV18-15	520		
Plăvaie cl.INVV21-22	715		
Floricica cl.INVV 21-31	900		
Legenda cl.INVV21-36	360		
Telti curuc cl.INVV11-55	600		
Pinot noir cl.INVV12-44	300		
Sauvignon cl.INVV10-91	998		
Merlot cl. INVV 14-41	1100		

Semnăturile:

Şef laborator, dr. şt. agr. _____ Bondarciuc Victor

Colaborator ştiinţific _____ Dubceac Marcela

Colaborator ştiinţific _____ Haustov Evghenii

Injiner superior _____ Constantinova Irina

Agronom _____ Nazari Ion

Anexa 7

Act de înființare a plantației-mamă de categoria biologică Baza an. 2024

APROB:
Director interimar al IȘPHTA
Victoria Adajuc
04 septembrie an.2024

ACT
privind infiinţarea plantaţiei-mamă de categorie biologică "BAZA"
din 4 septembrie an.2024

Noi, subsemnaţii, membrii ai comisiei Laboratorului de Virusologie şi Control Fitosanitar IŞPHTA, Bondarciuc Victor, Haustov Evghenii, Dubceac Marcela şi Constantinova Irina am întocmit acest act pentru a confirma că în perioada 12 august - 04 septembrie 2024, în plantaţia mamă de categorie biologică "BAZA", au fost plantaţi butaşii a 12 soiuri de viţă de vie folosind butaşi altoiţi vegetanţi, crescuţi în sera laboratorului. Materialul pentru altoire a fost pregătit din plantaţia-mamă de categorie biologică "PREBAZA" a IŞPHTA. Înainte de altoire, coardele altoi şi portaltoi au fost tratate termic cu apă la temperatura de 50°C ± 1°C timp de 45 de minute. După stratificare, butaşii au fost plantaţi în casete cu substrat nutritiv şi plasate în sera laboratorului. Butaşii pentru plantare au fost crescuţi în seră în casete cu substrat din turbă, în următorul sortiment şi cantitate:

Soiuri tehnice	**Cantitatea (buc./ ha)**	**Soiuri de masă**	**Cantitatea (buc)**
Luminiţa cl.INVV3-40	315/ 0,14	Moldova cl.INVV16-71	275/0,12
Busuioca de Moldova	107/0,05	Chişmiş moldavschii cl.INVV5-81	56/0,03
Copceac cl.INVV18-15	253/0,11	Avatar	141/0,06
Legenda cl.INVV21-36	355/0,16	Muscat Iona	249/0,11
Sauvignon cl.INVV10-91	146/0,07	Nev York	74/0,04
Telti curuc cl.INVV11-55	59/0,03	Tomcord	58/0,03
Subtotal	1235/0,56	Subtotal	853/0,39
Total	2088 / 0,95		

Semnăturile:

Cercetător şt.coord. dr. şt. agr. _____ Bondarciuc Victor

Cercetător şt.coord. dr. şt. agr. _____ Haustov Evghenii

Cercetător ştiinţific _____ Dubceac Marcela

Inginer superior _____ Constantinova Irina

Anexa 8

Datele experimentale și formulele de calcul utilizate pentru evaluarea influenței spectrelor de lumină asupra dezvoltării viței-de-vie în cultură *in vitro*

Obiect: plante de viță-de-vie din soiul Fetească regală.

Condiții experimentale: mediu nutritiv MS ½, temperatura 24 ± 2 °C, fotoperiod 16/8 ore.

Scop: evaluarea influenței surselor de lumină „alb-cald", „alb-rece" și „Fito" asupra dezvoltării plantelor in vitro. Număr de repetiții: 3.

Formulele utilizate în prelucrarea datelor experimentale: Media aritmetică ($\bar{x}$): $\bar{x} = \Sigma x_i / n$;

Tabelul 8.1 Rezultatele obținute în condițiile iluminării cu lumină „alb-caldă"

Parametru	Repetiția 1	Repetiția 2	Repetiția 3	Medie pe repetiții
Plante înrădăcinate (%)	63.3	73.3	53.3	63.3
Calus (%)	36.6	40.0	33.3	36.7
Internoduri (nr)	7.6	7.4	7.7	7.6
Frunze (nr)	7.8	7.4	7.4	7.5
Înălțimea plantei (cm)	6.6	5.9	6.6	6.4
Lungimea rădăcinilor (cm)	20.7	18.1	19.4	19.4
Suprafața totală a frunzelor (cm²)	10.7	9.7	9.8	10.1
Suprafața medie a frunzei (cm²)	1.3	1.2	1.3	1.3

Tabelul 8.2 Rezultatele obținute în condițiile iluminării cu lumină „alb-rece"

Parametru	Repetiția 1	Repetiția 2	Repetiția 3	Medie pe repetiții
Plante înrădăcinate (%)	63.3	70.0	64.3	65.8
Calus (%)	0.0	0.0	0.0	0.0
Internoduri (nr)	6.4	6.9	6.2	6.5
Frunze (nr)	6.2	6.9	6.2	6.5
Înălțimea plantei (cm)	6.0	6.8	5.8	6.2
Lungimea rădăcinilor (cm)	13.6	14.4	13.0	13.7
Suprafața totală a frunzelor (cm²)	12.9	12.9	12.5	12.8
Suprafața medie a frunzei (cm²)	2.0	1.9	1.9	1.9

Tabelul 8.7 Rezultatele obținute în condițiile iluminării cu lumină „Fito"

Parametru	Repetiția 1	Repetiția 2	Repetiția 3	Medie pe repetiții
Plante înrădăcinate (%)	63.3	70.0	64.3	65.8
Calus (%)	0.0	0.0	0.0	0.0
Internoduri (nr)	6.4	6.9	6.2	6.5
Frunze (nr)	6.2	6.9	6.2	6.5
Înălțimea plantei (cm)	6.0	6.8	5.8	6.2
Lungimea rădăcinilor (cm)	13.6	14.4	13.0	13.7
Suprafața totală a frunzelor (cm²)	12.9	12.9	12.5	12.8
Suprafața medie a frunzei (cm²)	2.0	1.9	1.9	1.9

Note: – 0 indică absența fenomenului (ex. lipsa calusului sau neînrădăcinare); – 1 indică prezența fenomenului; Valorile sintetizate (medii ± s) sunt prezentate în capitolul 4, tabelul 4.4.

Anexa 9

Formulele utilizate pentru analiza statistică ANOVA

Analiza statistică a fost realizată prin metoda ANOVA unifactorială, utilizată pentru a determina dacă există diferențe semnificative între valorile medii obținute sub influența diferitelor surse de lumină. Calculele statistice pentru parametrii prezentați în tabelele 4.4–4.5 s-au efectuat conform formulelor de mai jos:

1. **Media aritmetică**
   $\bar{x} = \Sigma x_i / n$; unde: $\bar{x}$ – valoarea medie; x_i – valorile individuale; n – numărul de observații.
2. **Suma pătratelor totale** (SST – Total Sum of Squares)
   $SST = \Sigma_{i=1}^{k} \Sigma_{j=1}^{ni} (x_{ij} - \bar{x})^2$; unde: k – numărul de grupuri (surse de lumină); n_i – numărul de observații în fiecare grup; $\bar{x}$ – media generală a tuturor observațiilor.
3. **Suma pătratelor între grupe** (SSB – Sum of Squares Between groups)
   $SSB = \Sigma_{i=1}^{k} n_i (\bar{x}_i - \bar{x})^2$; unde: $\bar{x}_i$ – media fiecărui grup.
4. **Suma pătratelor în interiorul grupelor** (SSW – Sum of Squares Within groups)
   SSW = SST – SSB
5. **Media pătratelor** (MSB – Mean Square Between groups (media pătratelor între grupe); MSW – Mean Square Within groups (media pătratelor în interiorul grupelor).)
   MSB = SSB / (k−1) ; MSW = SSW / (N−k); unde: N – numărul total de observații; k – numărul de grupuri.
6. **Statistica F** (criteriul Fisher):
   F = MSB / MSW;
   Valoarea **F calculată** se compară cu **F critic** din tabelele Fisher la un nivel de semnificație $\alpha = 0,05$.
7. **Gradul de influență** (η):
   η = SSB / SST; Reprezintă proporția variației totale explicate de factorul analizat.
   Intensitatea influenței factorului se apreciază conform scalei Chaddock:
   0 – 0,1 foarte slabă; 0,1 – 0,3 slabă; 0,3 – 0,5 moderată; 0,5 – 0,7 considerabilă; 0,7 – 0,9 puternică; 0,9 – 1,0 foarte puternică
8. **Reguli de interpretare**:
   - Dacă F calculat > F critic și $p < 0,05 \Rightarrow$ ipoteza nulă (H_0) este respinsă, factorul are influență semnificativă statistic.
   - Dacă F calculat ≤ F critic ⇒ipoteza nulă este acceptată, factorul nu are influență semnificativă statistic.

Anexa 10

Date experimentale și formule de calcul utilizate la evaluarea influenței fitohormonilor asupra dezvoltării *in vitro* a viței-de-vie

Obiect: plante de viță-de-vie din soiul Meleag, cultivate in vitro pe diferite variante de mediu.

Scop: evaluarea influenței fitohormonilor asupra procesului de înrădăcinare, dezvoltare șicreștere a plantelor în cultură *in vitro*.

Număr de repetiții: 3.

Datele obținute includ valorile individuale pentru fiecare variantă de mediu nutritiv, înregistrate în trei repetiții experimentale. Pentru fiecare plantă s-au evaluat următorii parametri:

- înrădăcinare (da/nu);
- dezvoltare (da/nu);
- înălțimea lăstarului (cm);
- numărul de internoduri;
- numărul de frunzulițe;
- numărul de lăstari laterali;
- masa uscată radiculară (g);
- masa uscată foliară (g).

Formulele utilizate pentru prelucrarea datelor experimentale:

1. Media aritmetică ($\bar{x}$):

$\bar{x} = \Sigma x_i / n$;

unde: $\bar{x}$ – valoarea medie; x_i – valorile individuale; n – numărul total de observații.

2. Abaterea standard (s):

$s = \sqrt{[\Sigma(x_i - \bar{x})^2 / (n - 1)]}$;

Reprezintă măsura variației valorilor față de media aritmetică.

3. Coeficientul de corelație Pearson (r):

$r = \Sigma[(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})] / \sqrt{[\Sigma(x_i - \bar{x})^2 \cdot \Sigma(y_i - \bar{y})^2]}$

unde:

x_i, y_i – valorile analizate pentru doi parametri;

$\bar{x}$, $\bar{y}$ – mediile fiecărui parametru;

r – măsoară intensitatea și direcția relației dintre cei doi parametri.

4. **Analiza variației** (ANOVA):

Pentru compararea variantelor de mediu s-a aplicat testul ANOVA unifactorial, conform formulelor prezentate în Anexa 9.

Tabelul 10.1 Datele experimentale (brute) pentru varianta 1 de mediu nutritiv

Parametru	Repetiția 1	Repetiția 2	Repetiția 3
Plante înrădăcinate (%)	100.0	100.0	100.0
Plante dezvoltate (%)	46.8	50.0	53.2
Înălțime medie (cm)	7.12	7.62	8.12
Internoduri (nr)	7.6	8.0	8.4
Frunzulițe (nr)	9.6	10.2	10.8
Lăstari laterali (nr)	0.0	0.0	0.0
Masa uscată radiculară (g)	0.82	0.9	0.98
Masa uscată foliară (g)	0.3	0.33	0.36

Tabelul 20.2 Datele experimentale (brute) pentru varianta 2 de mediu nutritiv

Parametru	Repetiția 1	Repetiția 2	Repetiția 3
Plante înrădăcinate (%)	100.0	100.0	100.0
Plante dezvoltate (%)	47.2	52.8	50.0
Înălțime medie (cm)	7.6	8.2	8.8
Internoduri (nr)	7.5	8.1	7.8
Frunzulițe (nr)	11.3	12.0	12.7
Lăstari laterali (nr)	2.0	2.4	2.2
Masa uscată radiculară (g)	0.81	0.99	0.9
Masa uscată foliară (g)	0.35	0.45	0.4

Tabelul 30.3 Datele experimentale (brute) pentru varianta 3 de mediu nutritiv

Parametru	Repetiția 1	Repetiția 2	Repetiția 3
Plante înrădăcinate (%)	100.0	100.0	100.0
Plante dezvoltate (%)	80.0	84.1	75.9
Înălțime medie (cm)	7.0	7.4	6.6
Internoduri (nr)	5.3	5.5	5.7
Frunzulițe (nr)	10.3	10.7	9.9
Lăstari laterali (nr)	2.4	3.0	2.7
Masa uscată radiculară (g)	0.42	0.5	0.46
Masa uscată foliară (g)	0.74	0.8	0.68

Tabelul 40.4 Datele experimentale (brute) pentru varianta 4 de mediu nutritiv

Parametru	Repetiția 1	Repetiția 2	Repetiția 3
Plante înrădăcinate (%)	100.0	100.0	100.0
Plante dezvoltate (%)	63.3	59.7	66.9
Înălțime medie (cm)	7.2	6.7	7.7
Internoduri (nr)	8.3	8.0	8.6
Frunzulițe (nr)	9.8	9.3	10.3
Lăstari laterali (nr)	3.5	3.1	3.9
Masa uscată radiculară (g)	0.34	0.31	0.37
Masa uscată foliară (g)	0.56	0.51	0.61

Notă: Valorile înscrise pentru cele trei repetiții reprezintă mediile aritmetice ale parametrilor determinați experimental**,** utilizate la calcularea mediilor generale și a abaterilor standard prezentate în Capitolul 4, Tabelul 4.6

DECLARAȚIA PRIVIND ASUMAREA RĂSPUNDERII

Subsemnata, declar pe răspundere personală că materialele prezentate în teza de doctorat sunt rezultatul propriilor cercetări și realizări științifice. Conștientizez că, în caz contrar, urmează să suport consecințele în conformitate cu legislația în vigoare.

Numele, prenumele Dubceac Marcela

Semnătura _____

Data _____

20th ICVG congress | 25-29 September 2023 Thessaloniki | GREECE

Certificate of Attendance

Marcela Dubceac

has participated in the

20th congress of the International Council for the Study of Virus and Virus-Like Diseases of the Grapevine (ICVG)

which took place at Porto Palace Hotel in Thessaloniki, Greece between 25-29 September 2023.

Thessaloniki, 29 September 2023

Varvara Maliogka,

On behalf of the Organizing Committee

ICVG

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия»

СЕРТИФИКАТ

участника

МЕЖДУНАРОДНОГО НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОГО ФОРУМА
«БИОЛОГИЗАЦИЯ ПРОЦЕССОВ ИНТЕНСИФИКАЦИИ В САДОВОДСТВЕ И ВИНОГРАДАРСТВЕ»

Дубчак Марчела

приняла участие в Международной научно-практической конференции
«Биологизация процессов интенсификации в садоводстве и виноградарстве»

22 сентября 2021 года

Директор ФГБНУ СКФНЦСВВ
академик РАН **Е.А. Егоров**

г. Краснодар

State of Israel / Ministry of Agriculture
Agricultural Research Organization

Dr. Munir Mawassi
Head,
Institute of Plant Protection
State of Isreal/Ministry of
Agriculture & Rual Development
Agricultural Research
Organization, Volcani Institute
Rishon LeZion 7505101-Israel.
mawassi@agri.gov.il

ד"ר מוניר מוואסי
מנהל המכון להגנת הצומח
מדינת ישראל/משרד
החקלאות ופיתוח הכפר
מינהל המחקר החקלאי
מכון וולקני
נייד: 050-6220376
Tel: 03-9683844

June 16, 2022

Re: CERTIFICATE OF ATTENDANCE for Marcela Dubceac Passport Number AB1737091

I undersigned Dr. Munir Mawassi the head of the Plant Protection Institute at the ARO-Volcani center, Israel, here certified that Ms. Marcela Dubceac (Moldova) researcher at *Practical Scientific Institute of Horticulture and Food Technology / Virology and Phitosanitary Control Laboratory* carried out an educational stage in my laboratory at the Plant Pathology Department focused on extraction and identification of various viruses and viroids infecting grapevine and citrus plants from the 20th of May to the 18th of June 2022.

During this period of attendance, Marcela was trained to conduct the following methods:

1. Total RNA extraction from virus-infected grapevine and citrus plants as well as from viroid-infected plants using kits and C-TAB relied protocols.
2. cDNA with Maxima RT.
3. PCR amplification to identify various viruses such as:
    - Grapevine leafroll-associated viruses 3
    - Grapevine leafroll-associated viruses 2
    - Grapevine Virus A
    - Citrus exocortis viroid CEVd
    - Pospiviroids
4. PCR cleanup from the GEL.
5. Ligation to pGEM-T plasmid.
6. Transformation of plasmids into E. coli DH5α.
7. Plasmid extraction *via* miniprep kits.
8. Sequence analysis and primer sequence designing *via* bioedit program.

CURICULUM VITAE

europass

Marcela Dubceac

Cetățenie: moldoveană **Data nașterii:** 17/10/1982 **Gen:** Feminin

Număr de telefon: (+373) 61131688 **E-mail:** dubceacm@gmail.com

Acasă: str. Avicenna 30, ap. 27, 2025 Chișinău (Moldova)

EXPERIENȚA PROFESIONALĂ

Laboratorul de Virusologie și Control Fitosanitar Culturilor Horticole, IP INCCAAMV (IȘPHTA) – Chisinau , Moldova

Localitatea: Chisinau | **Țara:** Moldova

Cercetător agronom

[06/06/2018 – În curs]

• Participarea activă la evaluările în teren privind starea fitosanitară a viței-de-vie, prin inspecții vizuale, prelevarea de probe și completarea fișelor de observație.
• Monitorizarea periodică a plantațiilor-mamă de categorie biologică Prebază și Bază, în scopul menținerii statutului de sănătate conform reglementărilor naționale și europene.
• Implicarea în selecția fitosanitară a materialului săditor viticol destinat înmulțirii clonale.
• Efectuarea testărilor fitosanitare prin metode serologice (ELISA) și moleculare (PCR) pentru identificarea agenților patogeni: virusuri, fitoplasme și bacterii.
• Stabilirea culturilor *in vitro* și aplicarea procedurilor de asanare (termoterapie, chimioterapie) pentru obținerea de plante sănătoase.
• Optimizarea condițiilor de regenerare și multiplicare a vitroplantulelor, adaptate soiurilor autohtone și cerințelor tehnologice locale.
• Contribuția la elaborarea documentației necesare pentru acreditarea laboratorului conform ISO/IEC 17025.
• Colaborarea cu producători agricoli, pepiniere și autorități locale pentru implementarea tehnologiilor moderne de certificare a materialului viticol.

EDUCAȚIE ȘI FORMARE PROFESIONALĂ

Licență în științe ale naturii

Universitatea de Stat din Moldova [31/08/2015 – 11/06/2018]

Adresă: 60 Alexei Mateevici Street, MD-2009 Chisinau (Moldova) | **Site de internet:** https://usm.md | **Tipul de credite:** ECTS | **Număr de credite:** 180

– Utilizarea terminologiei de mediu;
– Sinteza cunoștințelor din disciplinele ecologice;
– Observarea și perceperea caracteristicilor, proceselor și fenomenelor mediului;
– Aplicarea unor aspecte ale altor științe (chimie, matematică, biologie/economie);
– Planificarea și realizarea lucrărilor practice de laborator și de teren în ecologie;
– Evaluarea problemelor de mediu și propunerea soluțiilor corespunzătoare;
Tema tezei: Gestionarea deșeurilor în municipiul Chișinău. Elaborarea unui punct de colectare pentru acceptarea deșeurilor necasnice de la populație.

Studii de master în Științe Biologice Aplicate

Universitatea de Stat din Moldova [08/09/2018 – 25/01/2020]

Adresă: 60 Alexei Mateevici Street, MD-2009 Chisinau (Moldova) | **Site de internet:** https://usm.md | **Domeniul (domeniile) de studiu:** Științe naturale, matematică și statistică: • Științe biologice și științe conexe neclasificate în altă parte • Biologie

– Particularitățile celulelor și țesuturilor vegetale izolate in vitro;

– Aplicarea tehnologiilor in vitro pentru multiplicarea clonală a viței-de-vie;
– Siguranța alimentară și siguranța mediului;
– Aplicarea biotehnologiilor pentru conservarea biodiversității mediului și dezvoltare durabilă;
Tema tezei: Obținerea clonelor fitosanitare de viță-de-vie din soiuri autohtone și de selecție.

PhD

UASM [31/10/2019 – 30/10/2022]

Adresă: 42 Mircești Street, Chisinau (Moldova) | **Site de internet:** https://www.uasm.md/en/contacte | **Lucrarea de diplomă:** Biotechnologies for obtaining healthy grapevine clones

Modul de psihologie și pedagogie

Universitatea de Stat din Moldova [30/09/2019 – 14/05/2020]

Adresă: 60 Alexei Mateevici Street, MD-2009 Chisinau (Moldova) | **Site de internet:** https://www.uasm.md/en/contacte | **Tipul de credite:** ECTS | **Număr de credite:** 60

Curs de formare profesională – Consilier agricol

Centrul de Consultanță în Agricultură și Rural (CCAR) [16/11/2024 – 20/12/2024]

Domeniul (domeniile) de studiu: Stiințe agricole | **Număr de credite:** 90 ore

- Rolul sistemului AKIS în agricultură, etica și imparțialitatea în consilierea fermierilor, tehnici de comunicare eficientă în teritoriu;
- Politica Agricolă Comună (PAC): structură, funcționare, instrumente de implementare și cadrul normativ național;
- Managementul durabil al terenurilor și fermelor, cu accent pe bune practici agricole și utilizarea resurselor în mod rațional;
- Inovații și tehnologii digitale aplicabile în agricultură, precum și integrarea acestora în procesul decizional la nivel de fermă;
- Prevenirea și gestionarea riscurilor în agricultură: riscuri climatice și naturale, riscuri legate de subvenții, noțiuni generale despre asigurările agricole;
- Managementul durabil al nutrienților: sistemele de fertilizare, optimizarea regimului nutritiv al solurilor, influența lucrărilor solului asupra productivității și eroziunii;
- Condiții de muncă și securitate în agricultură: legislație, riscuri profesionale, măsuri de protecție și prevenire.

COMPETENȚE LINGVISTICE

Limbă(i) maternă(e): rusă | română

Altă limbă (Alte limbi):

engleză

COMPREHENSIUNE ORALĂ B1 **CITIT** B1 **SCRIS** B1

EXPRIMARE SCRISĂ B1 **CONVERSAȚIE** A2

Niveluri: A1 și A2 Utilizator de bază B1 și B2 Utilizator independent C1 și C2 Utilizator experimentat

COMPETENȚE

Microsoft Excel / google / youtube / gmail / zoom

COMPETENȚE TEHNICE

Competențe tehnice

- Diagnostic fitosanitar al viței-de-vie prin metode serologice (ELISA) și microbiologice, în scopul identificării virusurilor și bacteriei A. vitis.

- Prelevarea de probe și evaluarea vizuală a stării fitosanitare a plantațiilor-mamă (Prebază și Bază), cu întocmirea fișelor de observație.

- Aplicarea biotehnologiilor moderne pentru obținerea de material viticol sănătos: cultură *in vitro.*

- Pregătirea și adaptarea mediilor nutritive (Murashige & Skoog, WPM etc.) pentru regenerarea și multiplicarea rapidă a plantelor de viță-de-vie.

- Organizarea, monitorizarea și întreținerea plantelor în faza de aclimatizare în seră și în câmp, cu focus pe trasabilitatea materialului biologic.

- Elaborarea și implementarea documentației pentru acreditarea unui laborator de diagnostic fitosanitar conform ISO/IEC 17025 (proceduri, echipamente, trasabilitate metrologică).

- Coordonarea activităților în echipă și instruirea personalului tânăr în domeniul metodelor de laborator.

EDUCAȚIE ȘI FORMARE PROFESIONALĂ

[20/05/2022 – 18/06/2022]

Educație și formare profesională

Participare la Congresul Internațional pentru Studiul Virusurilor și Bolilor de Tip Virusoid ale Viței-de-vie (ICVG)

International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine – 20th ICVG Conference

Salonic, Grecia

03.09.2023 – 08.09.2023

Activități și competențe dobândite:

- Prezentarea lucrării: Establishment of the Nuclear Stock (Pre-base) of the V. vinifera Genus through Phytosanitary Selection in Moldova

- Schimb de experiență și bune practici cu cercetători internaționali în domeniul diagnosticării virusurilor viței-de-vie

- Participare la sesiuni dedicate metodelor moderne de detectare, combatere și gestionare a bolilor virale la vița-de-vie

Stagiu științific – Diagnosticul molecular prin PCR

Institute of Plant Protection, Ministry of Agriculture and Rural Development, Israel

Rishon LeZion, Israel

20.05.2022 – 18.06.2022

Competențe dobândite: Extracția ARN total din viță-de-vie și citrice infectate cu virusuri, utilizând kituri și protocoale bazate pe C-TAB; Sinteza de cADN cu Maxima RT; Reacții PCR pentru identificarea următorilor agenți patogeni: GLRaV-2, GLRaV-3, Grapevine virus A, Citrus exocortis viroid (CEVd), Pospiviroides; Purificarea produselor PCR din geluri; Ligarea în plasmidul pGEM-T, transformarea în E. coli DH5α; Izolarea plasmidelor prin Miniprep; Analiza secvențelor și proiectarea de primeri cu ajutorul software-ului BioEdit.

COMPETENȚE ORGANIZATORICE

Competențe organizatorice

- Experiență în organizarea activităților de laborator și de teren privind starea fitosanitară a viței-de-vie.

- Coordonarea testărilor pentru depistarea virusurilor și bacteriilor

- Planificarea și aplicarea metodelor moderne de înmulțire și tratare a materialului săditor prin cultură in vitro și tratamente termice/chimice.

- Participare la elaborarea procedurilor pentru acreditarea activității de laborator, în conformitate cu cerințele ISO/IEC 17025.

- Capacitate de coordonare a echipelor mici și de desfășurare a mai multor procese în paralel, în laborator și pe teren.

COMPETENȚE PERSONALE

Competențe personale

- Sociabilitate, capacitate de integrare rapidă în colectiv și colaborare eficientă în echipă.

- Abordare creativă și flexibilă în realizarea sarcinilor profesionale.

- Abilități organizatorice în coordonarea activităților și proiectelor.

- Motivație pentru realizare profesională și perfecționare continuă.

- Responsabilitate, inițiativă și perseverență în atingerea obiectivelor stabilite

Lista lucrărilor științifice la tema tezei

ale d-nei Dubceac Marcela,

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

2. Articole în reviste științifice

2.2. în reviste din alte baze de date acceptate de către ANACEC:

1. **DUBCEAC, Marcela**, LOSMANSCHII, 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, UTM, 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 în DOAJ. UDC: 634.8:631.526.321:581.143.6.

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

1. **DUBCEAC, Marcela**, HAUSTOV, Evghenii, BONDARCIUC, Victor. Implementarea metodei PCR pentru identificarea tulpinilor patogene *Allorhizobium v*itis ce provoacă cancerul bacterian al viței-de-vie. *Știința Agricolă* / *Agricultural Science*, 2024, vol. I, pp. 47–54. DOI: 10.55505/sa.2024.1.05. Disponibil la: DOI: https://doi.org/10.55505/sa.2024.1.05 Revistă științifică de **categoria B**, indexată în DOAJ.

2. **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. DOI: https://doi.org/10.53082/1857-3142.24.92.03. Revistă științifică națională, **categoria C**, indexată AGRIS

3. 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. DOI: https://doi.org/10.53082/1857-3142.24.92.05. Revistă științifică națională, **categoria C**, indexată AGRIS

4. **DUBCEAC, Marcela**, BONDARCIUC, Victor, SULTANOVA, Olga, HAUSTOV, Evghenii. Crearea plantației-mamă de categoria biologică Prebază din genul *V. vinifera* prin selecția fitosanitară. *Pomicultura, Viticultura și Vinificația*, nr. 1(89), 2023. ISSN 1857-3142. DOI: https://doi.org/10.53082/1857-3142.23.89.06 . Revistă științifică națională, **categoria C**, indexată AGRIS

5. **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

3.1. în lucrările manifestărilor științifice incluse în bazele de date Web of Science și SCOPUS:

1. **DUBCEAC, Marcela**, SULTANOVA, Olga, BONDARCIUC, Victor. Propagation of phytosanitary clones by in vitro culture. În: *Biologization of the Intensification Processes in Horticulture and Viticulture*.

International Scientific Conference, 21–23 septembrie 2021, Krasnodar, Rusia, pp. 1–6. DOI: https://doi.org/10.1051/bioconf/20213403003

3.3. în lucrările manifestărilor științifice organizate în Republica Moldova:

1. **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. CZU: 634.8:631.52:632.913

2. **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. CZU: 634.8:581.143.6

5. Alte lucrări și realizări specifice domeniului

1. 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

2. 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

3. **DUBCEAC, Marcela.** Establishment of the nuclear stock (pre-base) of the *V. vinifera* genus through phytosanitary selection in the Republic of Moldova. În*: 20th Congress of the International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of Grapevine* (*ICVG*), Thessaloniki, Grecia, 2023, pp. 167–169. Disponibil la: https://icvg.org/data/ICVG20Abstracts.pdf