

---

TEZA DE DOCTORAT

# **Cercetări privind comportarea passifloraceelor în climat controlat sub influența unor factori tehnologici convenționali și neconvenționali**

---

Doctorand **Paula Boboc (căs. Oros)**

---

Conducător de doctorat **Prof. univ. dr. Maria Cantor**

---



CLUJ-NAPOCA, 2022

## INTRODUCERE

Producția de flori reprezintă un potențial imens pentru România, deocamdată neexploatat, de care ar putea beneficia atât profesioniștii, cât și iubitorii de flori.

Introducerea unor noi specii și soiuri în culturile floricole din România reprezintă o necesitate în zilele noastre, cu atât mai mult cu cât există posibilitatea monitorizării factorilor ecologici în climat controlat. Tendințele actuale ale pieței de flori din România presupun diversificarea sortimentului cu specii exotice. *Passiflora* este o plantă extrem de apreciată pe plan global, atât pentru valoarea decorativă cât și pentru multiplele proprietăți medicinale pe care le are (BOBOC și CANTOR, 2017). Prin urmare, intervine nevoia de a produce plante viguroase cu o bună capacitate de adaptare și rezistență la condițiile climatice.

Producerea materialului săditor la *P. quadrangularis* prin metode convenționale s-a dovedit a fi problematică datorită procentului redus de germinare a semințelor. Totodată, prezența microorganismelor cauzatoare de boli reduc semnificativ eficiența înmulțirii prin butași (OŹAROWSKI și THIEM, 2013).

În ceea ce privesc posibilitățile de multiplicare *in vitro*, contaminarea materialului vegetal folosit pentru inițierea culturilor rămâne cea mai mare problemă. La cultura *in vitro* a passifloraceelor au fost asociate și probleme precum recalitranta, sensibilitatea la acumularea de etilenă și brunificarea explantelor datorată prezenței fenolilor din țesuturi iar această teză de doctorat urmărește să aducă soluții de remediere a acestor dificultăți.

## SCOPUL ȘI OBIECTIVELE CERCETĂRILOR

Scopul cercetărilor întreprinse în cadrul prezentei teze de doctorat este acela de a contribui la optimizarea tehnologiilor de înmulțire la *Passiflora* și de a determina posibilitățile de înmulțire vegetativă prin metode convenționale (butășire) și neconvenționale (*in vitro*), precum și elementele de tehnologie de cultură (fertilizarea) la două specii de *Passiflora*, *P. caerulea* respectiv, *P. quadrangularis*. Experiențele realizate au fost organizate sub forma a trei serii experimentale, la baza cercetărilor regăsindu-se următoarele obiective principale și specifice:

I. Determinarea gradului de popularitate a genului *Passiflora* în Cluj-Napoca.

- Pre-orientarea informării producătorilor locali de plante ornamentale.

II. Stabilirea unui protocol optim de multiplicare vegetativă prin butași la *P. caerulea* și *P. quadrangularis*.

III. Stabilirea unui regim de fertilizare optim pentru cultura în sistem controlat la *P. caerulea* și *P. quadrangularis*.

IV. Testarea și identificarea celui mai potrivit sistem de cultură *in vitro* destinat înmulțirii în masă la *P. caerulea* și *P. quadrangularis*.

- Elaborarea unui protocol de regenerare prin organogeneză directă la *P. quadrangularis* care vizează rezolvarea a două dintre problemele fundamentale ale speciei: contaminarea și recalitranta;

- Stabilirea influenței fitohormonilor specifici fiecărei etape de micropropagare;

- Elaborarea unui protocol de regenerare la *P. quadrangularis* *via calus*;

- Stabilirea influenței fotoperioadei și a unor compușilor adiționali în cazul sistemelor de cultură diferite;

- Aclimatizarea eficientă, producerea de material săditor de calitate, liber de boli.
- V. Determinarea unor compuși biochimici și bioactivi la *Passiflora* în scopul confirmării calității materialului biologic obținut atât prin butășire cât și *in vitro*.

### STRUCTURA TEZEI DE DOCTORAT

Teza de doctorat este organizată în 10 capitole cuprinse în două părți. Prima parte cuprinde stadiul actual al cunoașterii privind cultura convențională și neconvențională la *Passiflora* și aspecte generale despre sistematica, morfologia și ecologia speciilor. A doua parte cuprinde materialul și metodele de lucru, rezultatele obținute, discuțiile în legătură cu acestea iar în încheiere concluziile și recomandările. La final se regăsesc bibliografia, anexele și rezumatele în limba română și în limba engleză. Pentru realizarea obiectivelor scontate au fost consultate 284 surse din literatura de specialitate. Rezultatele științifice obținute în perioada de cercetare s-au materializat prin publicarea a trei articole *ISI* (un articol *ISI* (*FI*-2.331; *Q1*) și două articole *ISI Proceedings*), opt articole BDI și prin participarea la șase Conferințe Internaționale (a se vedea CV-ul). Teza conține un număr de 27 tabele și 41 figuri, fiind structurată sub forma a trei serii experimentale.

### CONTRIBUȚII PERSONALE

În scopul realizării obiectivelor propuse și obținerii unor rezultate științifice relevante studiile s-au desfășurat folosind material biologic de la două specii: *P. caerulea* și *P. quadrangularis*. Pentru desfășurarea experiențelor s-au utilizat numeroase materiale chimice, echipamente și alte tipuri de materiale. În cadrul acestor experiențe s-au analizat parametri biometrici, au fost efectuate studii histologice și observații de structură și creștere.

#### Studiul privind gradul de popularitate a genului *Passiflora*

Studiul privind gradul de popularitate a plantelor din genul *Passiflora* la nivelul populației din Cluj-Napoca a fost realizat pe baza unui scurt chestionar format din nouă întrebări ce a fost aplicat unui eșantion de 273 persoane alese aleator.

#### Seria experimentală I – Studii privind cultura convențională la *Passiflora* Studii privind posibilitățile de înmulțire vegetativă prin butași

Materialul biologic folosit pentru realizarea experienței a fost reprezentat de butași de aproximativ 15 cm lungime, respectiv 2-3 noduri de la *P. caerulea* și *P. quadrangularis*. Au fost utilizați trei biostimulatori de înrădăcinare: Incit-8, Radistim-2 și Acidul indolil-butiric (AIB) 1000 ppm și au fost testate patru substraturi de înrădăcinare: vermiculit (V), turbă + vermiculit în amestec de 1:1 (T+V), turbă + perlit în amestec de 1:1 (T+P), turbă + nisip în amestec de 1:1 (T+N). Prin combinarea celor trei factori experimentali a rezultat o experiență randomizată cu 32 variante experimentale. A fost determinată rata de înrădăcinare și parametri biometrici.

#### Studii privind influența regimului de fertilizare asupra caracterelor morfo-decorative

Materialul vegetal care face obiectul studiului regimului de fertilizare pentru cultura în sistem controlat a constat în plante tinere de un an, obținute în cadrul

experienței anterioare. Au fost testați doi fertilizanți: Cropmax® și Nutricomplex® 20-20-20 + microelemente aplicați în trei doze: 0.05%, 0.1% și 0.2%. Fiecare specie a fost analizată individual, astfel au rezultat două experiențe bifactoriale randomizate complet, cu nouă variante experimentale. Au fost realizate observații privind indicii morfologici, rata de creștere relativă (RGR) și parametri calitativi.

### **Seria experimentală II – Studii privind posibilitățile de înmulțire prin metode neconvenționale (*in vitro*) la *Passiflora***

Materialul biologic provine de la speciile *P. caerulea* și *P. quadrangularis*, plante în vârstă de un an, aflate în stadiul de creștere vegetativă. Plantele destinate experimentelor au fost crescute în Sera Didactică și Experimentală a disciplinei de Plante Ornamentale. Materialul vegetal folosit pentru inițierea culturilor *in vitro* prin organogeneză directă a fost reprezentat de segmente nodale. În ceea ce privește calusogeneza și embrigeneza somatică, materialul biologic folosit pentru inițierea culturilor de calus la *P. quadrangularis* a fost reprezentat de patru tipuri de explant: segmente internodale și fragmente de frunze, receptacul și sepale.

Această serie experimentală este organizată sub forma a trei studii realizate pe etapele micropropagării:

- un studiu privind multiplicarea prin organogeneză directă la *P. caerulea* ce conține trei experiențe secundare;
- un studiu privind multiplicarea prin organogeneză directă la *P. quadrangularis* ce conține nouă experiențe secundare;
- un studiu privind multiplicarea prin organogeneză indirectă și embrigeneză somatică la *P. quadrangularis* ce conține patru experiențe secundare.

#### **Multiplicarea prin organogeneză directă**

Asepsizarea explantelor la *P. caerulea* s-a realizat folosind un pretratament cu EtOH 70% timp de un minut, urmat de un tratament cu NaClO 15% timp de 20 min.

Pentru asepsizarea explantelor de *P. quadrangularis* provenite din segmente nodale au fost testate 15 tratamente. În total, 450 explante nodale au fost inițiate în scopul identificării tratamentelor optime de dezinfectie.

În etapa de inițiere s-au folosit aceleași tipuri de medii de cultură la ambele specii, mediul de cultură MS a fost suplimentat cu 6-benzylaminopurina (BAP) singur (0.5-3 mg/l) sau în combinație cu KIN (1 sau 2 mg/l) rezultând o experiență monofactorială cu 13 variante experimentale. La *P. quadrangularis* această experiență din etapa de inițiere a fost urmată de studiul influenței poziției explantului și a mediului de cultură asupra lăstării axilare fiind realizată printr-o experiență bifactorială de tipul 2 x 3, în trei repetiții. Apoi, mediul de cultură a fost suplimentat cu compușii adiționali AgNO<sub>3</sub> și Pluronic F-68 (PF-68) cu scopul de a diminua efectele fenolilor levigați și brunificarea subită a explantelor rezultând o experiență bifactorială de tipul 3 x 6 realizată în trei repetiții, fiecare repetiție a constat în 10 probe. Un număr de 1020 explante au fost inițiate în vederea stabilizării culturii *in vitro* la această specie, comparativ cu *P. caerulea* unde au fost inițiate 390 explante.

Atât la *P. caerulea*, cât și la *P. quadrangularis*, etapa de subcultivare (multiplicare) a fost realizată după aceeași schemă experimentală. Lăstării regenerați *in vitro* au fost subcultivați la fiecare patru săptămâni folosind trei tipuri de mediu de

cultură indicate în literatura de specialitate.

Microlăstarii obținuți după a șasea subkultură au reprezentat materialul biologic utilizat pentru studiul capacității de înrădăcinare *in vitro*. Prin această etapă au trecut doar microlăstarii de *P. quadrangularis*, deoarece la *P. caerulea* rizogeneza a avut loc în timpul subculturilor succesive. A fost realizat un studiu monofactorial cu trei variante experimentale realizat în trei repetiții, fiecare repetiție a constat în 10 probe.

După înrădăcinarea *in vitro*, plantulele au fost transferate în ghivece conținând un amestec de turbă și perlit 1:1 sau turbă și vermiculit 1:1 în vederea aclimatizării. Pentru ambele specii, etapa de aclimatizare a fost studiată sub forma unei experiențe monofactoriale, unde factorul experimental a fost reprezentat de substratul amestec, cu cele două graduări. După o perioadă de patru luni de la aclimatizare a fost determinată rata de supraviețuire a plantelor.

### **Multiplicarea prin organogeneză indirectă și embriogeneză somatică**

Studiul influenței tipului de explant și a fitohormonilor asupra calusogenezei a fost realizat printr-o experiență bifactorială de tipul 11 x 4. Pentru a facilita organizarea experienței, combinația auxină + citochinină din mediul de cultură a fost denumită ca tratament. Fiecare tratament s-a aplicat pentru cinci explante și a fost realizat în trei repetiții astfel, în total au fost inițiate 660 explante.

Studiul influenței fitohormonilor și a fotoperioadei asupra multiplicării calusului implică o experiență bifactorială de tipul 3 x 2, din interacțiunea celor doi factori rezultând șase variante experimentale.

Studiul influenței fitohormonilor și a sistemului de cultură asupra multiplicării calusului presupune o experiență bifactorială de tipul 3 x 2, din interacțiunea celor doi factori rezultând șase variante experimentale. Pentru fiecare variantă experimentală s-a inoculat calus în 10 flacoane de cultură, cercetarea fiind realizată în trei repetiții.

Studiul influenței fotoperioadei și a compușilor adiționali asupra proliferării culturilor embriogene implică o experiență bifactorială de tipul 7 x 2, din interacțiunea celor doi factori rezultând 14 variante experimentale. Mediul de cultură a fost suplimentat cu: PF-68 (0.2% și 0.4%), AgNO<sub>3</sub> (1 mg/l și 2 mg/l) și apă de cocos (5 % și 10 %) precum și varianta fără compus adițional.

### **Seria experimentală III – Studiul privind determinarea unor compuși biochimici și bioactivi la *Passiflora***

Frunze și tulpini provenite de la plantele mamă și de la plante aclimatizate, precum și calus friabil de *P. caerulea* și *P. quadrangularis*, au fost analizate în vederea determinării conținutului de lipide și proteine totale, polifenoli și flavonoide totale, respectiv capacitatea antioxidantă. Datele experimentale au fost prelevate sub forma unei experiențe monofactoriale, unde materialul biologic cu cele cinci graduări a reprezentat factorul experimental. Determinările celor 10 probe s-au realizat în câte 3 repetiții, pentru fiecare variantă experimentală.

## **REZULTATE ȘI DISCUȚII**

### **Rezultate privind gradul de popularitate a passifloraceelor**

În ceea ce privește gradul de popularitate a genului *Passiflora*, un procent de 63.5% din totalul respondenților afirmă că floarea din imaginea prezentată (*P.*

*caerulea*) le este cunoscută iar 98.4% dintre aceștia au știut să o denumească.

### **Seria experimentală I – Rezultate privind cultura convențională la *Passiflora* Influența biostimulatorilor și a substraturilor de înrădăcinare asupra în rădăcinării butașilor**

Butașii de *P. caerulea* au obținut un procent mediu de înrădăcinare de 79.78%, iar cei de *P. quadrangularis* de 74.57%. *P. caerulea* a înregistrat cel mai ridicat procent de înrădăcinare, de 96.7%, pe substratul de amestec turbă + vermiculit iar *P. quadrangularis* 93.3% în vermiculit și în amestecul de turbă și perlit. Lungimea rădăcinilor variază între 3.73 și 8.59 cm la *P. caerulea* și între 4.79 și 8.63 cm la *P. quadrangularis*. Rezultatele parametrilor biometrici au evidențiat că tratamentul cu biostimulatorul AIB 1000 ppm este cel mai potrivit pentru înrădăcinarea butașilor la ambele specii studiate.

### **Influența regimului de fertilizare asupra caracterelor morfo-decorative**

Interpretarea statistică a rezultatelor cu ajutorul testului Duncan MRT a pus în valoare importanța fertilizării folosind Cropmax. Acest fertilizant organic a condus la valori superioare ale parametrilor morfo-decorativi la două din dozele aplicate (0.2 respectiv 0.1%), urmat de fertilizantul Nutricomplex (0.2%) care a obținut valori asigurate statistic pentru majoritatea caracterelor analizate. În decursul perioadei de vegetație s-au constatat ritmuri de creștere diferite, astfel au fost stabilite patru intervale de timp pentru care s-a calculat evoluția ratei de creștere relativă (*relative growth rate*) (RGR). RGR a obținut valori maxime în intervalul 4 iunie - 5 august iar fertilizantul Cropmax a dus la cele mai ridicate RGR în intervalele de timp analizate, la ambele specii. La analiza bifactorială a RGR pe anii experimentali 2019 și 2020 a reieșit că în anul 2019, RGR a fost mai mare la ambele specii.

### **Seria experimentală II – Rezultate privind posibilitățile de înmulțire prin metode neconvenționale *in vitro* la *Passiflora* Multiplicarea prin organogeneză directă la *P. caerulea***

Lăstărirea axilară la *P. caerulea* a debutat în medie după trei zile de la inițiere. Cele mai bune rezultate privind rata de regenerare (88.22%) și parametri biometrici (un număr de 2.42 lăstari per explant, cu o lungime medie de 2.10 cm) au fost înregistrate pe mediul de cultură MS suplimentat cu 2 mg/l BAP + 1 mg/l KIN. La subcultura a șasea, rizogeneză a fost indusă la peste 80% din plantule, fapt ce a condus la aclimatizare fără etapa de înrădăcinare. Pe substratul de turbă+vermiculit, 74.56% din plante au supraviețuit.

### **Multiplicarea prin organogeneză directă la *P. quadrangularis***

Scopul acestui experiment a fost realizarea primului protocol complet de regenerare *in vitro* la *P. quadrangularis*, specie recalcitrantă. Dintr-un total de 15 tratamente testate pentru aseptizarea explantelor, cel mai eficient a fost pretratamentul EtOH (70%, 1 min) + NaClO (50%, 10 min) urmate de tratamentul realizat cu amestecul Rifampicină (15 μg/ml) + Benomyl (2 g/l). Prin această metodă de dezinfectie 61.67% au supraviețuit. Cele mai bune rezultate privind rata de regenerare și numărul de lăstari/ explant au fost înregistrate pe mediul de cultură MS

suplimentat cu 2 mg/l BAP (33.33%) și respectiv, cel cu 2 mg/l BAP + 1 mg/l KIN (24.44%). În scopul diminuării efectelor fenolilor levigați și brunificării subite a explantelor, mediile de cultură cu cele mai mari rate de regenerare au fost suplimentate cu AgNO<sub>3</sub> și PF-68. Acum, rata de regenerare a fost crescută până la 84.44% pentru tratamentul cu PF-68 0.2% pe mediul MS suplimentat cu 2 mg/l BAP. Proprietățile AgNO<sub>3</sub> precum solubilitatea în apă, disponibilitatea facilă, specificitatea și stabilitatea, îl găsesc eficient pentru regenerarea *in vitro* ducând la o rată de lăstărire de 71.11%. Dintr-un lăstar s-a obținut un maxim de 7.17 lăstari pe mediul MS suplimentat cu 2 mg/l BAP și 1 mg/l TDZ în subcultura a șasea. Din cele trei variante de mediu testate la înrădăcinare, suplimentarea mediului ½ MS cu 1 mg/l ANA a condus la rizogeneză pentru 61.11% din lăstari. La aclimatizare au fost testate două substraturi iar pe substratul de turbă + perlit 1:1, 73.33% din plantele au supraviețuit.

### **Multiplicarea prin organogeneză indirectă și embriogeneză somatică la *P. quadrangularis***

Din interacțiunea tipului de explant și a fitohormonilor reiese că explantele de internodii au calusat în proporție de 100% pe mediul de cultură ce conține 2 mg/l 2,4-D și 0.5 mg/l BAP. Pe acest mediu de cultură și fragmentele foliare au înregistrat cea mai mare rată de calusare (98.33%). Pentru explantele florale, mediile de cultură suplimentate cu PIC și KIN s-au dovedit a fi cele mai prolifiche. Formarea calusului embriogen este influențată atât de compoziția mediului de cultură, cât și de perioada de iluminare sau de sistemul de cultură. Absența luminii asociată cu fitohormonii din mediu au avut ca efect mai mult decât dublarea procentului de calus embriogen, valorile fiind asigurate statistic. Obținerea în medie a 32.67 embrioni somatici indică potențialul pe care îl exprimă multiplicarea prin embriogeneză somatică în comparație cu organogeneza directă. Proliferarea calusului a fost testată și în funcție de sistemul de creștere, mediu lichid s-a dovedit a fi superior atât în ceea ce privește masa celulelor, cât și conținutul de materie uscată, ceea ce se explică prin accesul mai bun a nutrienților și al apei. Cu cât crește timpul de la transfer și numărul de subculturi, se înregistrează o culoare specifică maronie ca rezultat al acumulării de fenoli. La suplimentarea mediilor de cultură cu compuși adiționali: AgNO<sub>3</sub>, PF-68 și apă de cocos, se dovedește că apa de cocos a condus la valori medii superioare în ceea ce privește procentul de calus embriogenic (79.17% respectiv 81.83%) și greutatea uscată (0.31 g și 0.34 g) raportat la fotoperioadă/ întuneric. După proliferarea calusului embriogenic, acesta a fost transferat pe un mediu de bază MS semisolid suplimentat cu 0.5 mg/l GA<sub>3</sub> în scopul maturării embrionilor somatici. Elongarea embrionilor somatici s-a observat după aproximativ 30 de zile de cultură iar după patru subculturi, plantele au fost transferate pe mediu de cultură MS cu 2 mg/l BAP pentru dezvoltare. În urma acesui transfer, în decurs de două luni are loc regenerarea plantulelor. Ulterior, acestea intră în sistemul clasic de multiplicare prin microbutășire.

### **Seria experimentală III – Rezultate privind determinarea unor compuși biochimici și bioactivi la *Passiflora***

Compuși biochimici (lipidele și proteinele) ca indicatori ai calității biologice a materialului multiplicat sunt sintetizați la ambele specii, atât la plantele mamă cultivate convențional, cât și la plantele aclimatizate. În țesuturile organizate,

conținutul lipidelor totale predomină în țesutul foliar. În cazul plantelor aclimatizate, conținutul de proteine totale este mai ridicat în tulpini la ambele specii iar în cultura de calus este scăzut datorită faptului că celulele nu sunt specializate funcțional. Prezența polifenolilor susține metoda de multiplicare neconvențională ca potențială modalitate de producție în masă a compușilor fitoterapeutici. Conținutul total de flavonoide este predominant în frunze la planta mamă și la planta aclimatizată. Uniformitatea celulelor de calus a dus la cel mai mare procent RSA privind activitatea antioxidantă a speciilor.

## CONCLUZII

### **Concluzii privind gradul de popularitate a genului *Passiflora***

Rezultatele studiului scot în evidență faptul că plantele din genul *Passiflora* se fac remarcate și stârnesc curiozitatea în rândul oamenilor, datorită florilor deosebite și posibilităților multiple de utilizare și decor pe care respondenții în mare măsură le cunosc.

### **Seria experimentală I – Concluzii privind cultura convențională la *Passiflora* Concluzii privind înmulțirea vegetativă prin butași**

Butașii tratați cu soluția de AIB 1000 ppm au înregistrat cel mai mare procent de înrădăcinare, la ambele specii iar substratul de înrădăcinare cel mai eficient s-a dovedit a fi vermiculitul. Din interacțiunea biostimulatorului cu substratul de înrădăcinare reiese că butașii netratați cu biostimulator au înregistrat cele mai mici valori ale lungimii lăstarului, de unde se concluzionează importanța utilizării biostimulatorului atât pentru facilitarea emiterii de rădăcini, cât și pentru buna dezvoltare a noilor plante formate. Prin analiza comparativă a datelor obținute se constată că substraturile de înrădăcinare nu prezintă influență importantă pentru numărul lăstarilor emiși, însă butașii înrădăcinați în vermiculit au obținut o lăstărire mai abundentă. În cazul speciei *P. quadrangularis*, datele înregistrate indică valori semnificativ superioare pentru numărul de lăstari emiși, față de *P. caerulea*, ceea ce indică o capacitate ridicată de lăstărire a speciei.

### **Concluzii privind regimul de fertilizare pentru cultura în sistem controlat**

În ceea ce privește creșterea medie a plantelor în primul an de la plantare, la *P. caerulea*, fertilizarea cu Cropmax a condus la cele mai viguroase creșteri, plantele ajungând în medie la 418.4 cm iar la *P. quadrangularis* de 434.2 cm. În ceea ce privește RGR, influențe semnificative s-au constatat în special în primul an. De asemenea, cea mai intensă perioadă de creștere a plantelor are loc în intervalul iunie-august, atât la *P. caerulea* (2.44), cât și la *P. quadrangularis* (2.61), în urma aplicării fertilizantului Cropmax.

### **Seria experimentală II - Concluzii privind înmulțirea prin metode necoventionale (*in vitro*) la *Passiflora***

#### **Concluzii privind multiplicarea prin organogeneză directă la *P. caerulea***

*P. caerulea* este o specie de referință pentru micropropagarea passifloraceelor, literatura de specialitate dovedește că este intens studiată în ceea ce privește toate tipurile de culturi de țesuturi. Mediul de cultură MS suplimentat cu 2 mg/l BAP și 1 mg/l KIN a determinat regenerarea în medie a 88.22% din explante, generând un



număr de 2.42 lăstari per explant, cu o lungime medie de 2.10 cm. Subcultivarea s-a realizat cu o rată de rizogeneză de peste 80% în subcultura a șasea pe mediul de cultură MS suplimentat cu 2 mg/l BAP + 0.5mg/l ANA. În etapa de aclimatizare, pe substratul de amestec turbă + vermiculit s-a înregistrat o rată de supraviețuire a plantelor de 74.56%.

### **Concluzii privind multiplicarea prin organogeneză directă la *P. quadrangularis***

Prezentul studiu a condus la elaborarea primului protocol complet de regenerare prin organogeneză directă la *P. quadrangularis*. Pornind de la segmentele nodale, protocolul s-a dovedit eficient și reproductibil. În urma studiului efectuat pentru stabilirea tratamentului optim de aspesizare a explantelor nodale, cea mai eficientă formulă s-a dovedit a fi pretratatamentul EtOH 70%, 1 min + NaClO 50%, 10 min urmate de tratamentul realizat cu amestecul de antibiotic Rifampicină 15 (μg/ml) + fungicid Benomyl (2 g/l). În etapa preliminară de inițiere pe mediul de cultură MS suplimentat cu 2 mg/l BAP respectiv, MS cu 2 mg/l BAP + 1 mg/l KIN s-au obținut cele mai bune răspunsuri morfogenice. Suplimentarea mediului de cultură cu PF-68 0.2% a dovedit capacitate de lăstărire de 84.44% iar PF-68 0.4% a condus la maximizarea parametrilor biometrici. În etapa de multiplicare, adăugarea fitoregulatorilor BAP și KIN au indus proliferarea lăstarilor care a fost pregnant sporită prin adăugarea surfactantului PF-68 0.2%. La înrădăcinarea *in vitro*, suplimentarea mediului ½ MS cu 1 mg/l ANA a fost cea mai prolifică. În etapa de aclimatizare pe substratul de amestec turbă + vermiculit 1:1 s-a înregistrat cea mai mare rată de supraviețuire a plantelor.

### **Concluzii privind multiplicarea prin organogeneză indirectă și embriogeneză somatică la *P. quadrangularis***

Absența luminii asociată cu fitohormonii din mediul de cultură a avut ca efect mai mult decât dublarea procentului de calus embriogen. Pentru *P. quadrangularis*, sistemul de cultură pe mediu lichid s-a dovedit a fi superior atât în ceea ce privește masa celulelor, cât și conținutul de materie uscată. Multiplicarea calusului este stimulată de întuneric și de un substrat nutritiv bogat (apa de cocos). Embriogeneza somatică reprezintă o modalitate importantă de propagare clonală *in vitro* la *P. quadrangularis* datorită faptului că recalcitranta nu se manifestă prin această tehnică de micropropagare și datorită randamentului ridicat a formării de embrioni somatici pe care îl prezintă, în medie de 32.67.

### **Seria experimentală III – Concluzii privind determinarea unor compuși biochimici și bioactivi la *Passiflora***

Sinteza lipidelor și a proteinelor este stimulată atât la *P. caerulea* cât și la *P. quadrangularis*. Cultura *in vitro* reprezintă o abordare eficientă a metodelor de propagare cu atât mai mult, cu cât, oferă oportunitatea dezvoltării producției controlate a metaboliților naturali importanți în condiții de laborator monitorizate, fără a depinde de habitatele naturale ale plantelor.

### **RECOMANDĂRI**

- Pe baza studiului privind gradul de popularitate a genului *Passiflora* se recomandă introducerea passifloraceelor în sortimentul de plante floricole cultivate în

România și promovarea lor în rândul producătorilor autohtoni de plante ornamentale.

- În urma cercetării privind posibilitățile de înmulțire prin butași, se recomandă substratul de vermiculit, respectiv amestecul de turbă + vermiculit 1:1 și tratamentul butașilor cu AIB 1000 ppm la înrădăcinarea buașilor de *Passiflora*.
- Fertilizările foliare la *Passiflora* se recomandă a fi realizate folosind biostimulatorul Cropmax datorită creșterii biomasei plantelor ornamentale dar și în cazul unei culturi ecologice, pentru cultura de fructe, în scop alimentar.
- *P. caerulea* este o specie fără probleme de micropropagare prin urmare se recomandă multiplicarea acesteia prin organogeneză directă în scopul producției industriale de plante ornamentale datorită stabilității genetice asigurate și a calității materialului săditor.
- Cu toate că specia *P. quadrangularis* s-a dovedit a fi recalcitrantă la propagarea prin organogeneză directă *in vitro*, această metodă de înmulțire se recomandă în special pentru producția la scară largă de material vegetal uniform genetic, dar și pentru colecțiile de germoplasmă ale speciei *P. quadrangularis*.
- Embriogeneza somatică se recomandă ca metodă de propagare clonală *in vitro*, la scară industrială pentru *P. quadrangularis* datorită randamentului ridicat al formării embrionilor somatici și a lipsei recalcitranței.
- Determinarea compușilor biochimici și bioactivi se recomandă în cazul plantelor importante din punct de vedere fitochimic pentru confirmarea livrării biotehnologice a metaboliților primari și secundari relevanți structural-celular și terapeutic cu atât mai mult cu cât plantele mamă nu sunt cultivate în habitatele lor indigene.

#### **ORIGINALITATEA ȘI CONTRIBUȚIILE INOVATIVE ALE TEZEI**

- Stabilirea posibilităților de înmulțire vegetativă prin butași la *P. caerulea* și *P. quadrangularis* în scopul obținerii unei eficiențe ridicate de înmulțire.
- Stabilirea unui regim de fertilizare optim culturii în sistem controlat pentru îmbunătățirea caracterelor morfologice decorative.
- Stabilirea primului protocol de multiplicare prin organogeneză directă la *P. quadrangularis* care soluționează recalcitranța speciei la cultura *in vitro*.
- Stabilirea primului protocol de multiplicare prin embriogeneza somatică, cu un randament ridicat a formării embrionilor somatici la *P. quadrangularis*.
- Utilizarea apei de cocos la proliferarea culturilor embriogene la *P. quadrangularis*.
- Determinarea comparativă a compușilor biochimici și bioactivi la plantele obținute în urma protocolurilor de multiplicare convenționale și neconvenționale.

#### **BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ**

1. BOBOC (OROS) P., CANTOR, M., HITTER T., GOCAN, T.M. (2017). *Passiflora* – source of sanogenic compounds, prospects for medicine and current uses. *Lucrări Științifice Seria Horticultură (BDI), USAMV IAȘI*, 60 (1/2), 269-274.
2. CANTOR, M., E., BUTA, T., BURU. (2021). Cultura plantelor ornamentale în climat controlat. *AcademicPres, Cluj-Napoca*.
3. OZAROWSKI, MARCIN, & THIEM, B. (2013). Progress in micropropagation of *Passiflora* spp. to produce medicinal plants: A mini-review. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 23(6), 937–947.