
TEZĂ DE DOCTORAT

Cercetări privind cultivarea *in vitro* a unor soiuri de cartof (*Solanum tuberosum* L.) bogate în compuși antioxidanți

(REZUMAT AL TEZEI DE DOCTORAT)

Doctorand **Alexandra-Mihaela Nagy (căs. Frățilă)**

Conducător de doctorat **Prof.univ.dr. Camelia Sava**



INTRODUCERE

O dată cu tendințele populației de a consuma mai multe fructe și legume bogate în antioxidanți, fermierii români au început să manifeste interes pentru introducerea în cultură a unor varietăți de *Solanum tuberosum* L. cu un conținut crescut de antociani în tuberculi. În ultimii ani, diverse soiuri de cartofi cu pulpa violet (CPV), au început să fie cultivate în România, neavând încă informații clare asupra capacității lor de aclimatizare și de producție în condițiile climatului din țara noastră.

Teza de doctorat, intitulată „Cercetări privind cultivarea *in vitro* a unor soiuri de cartof (*Solanum tuberosum* L.) bogate în compuși antioxidanți” are ca scop realizarea unor cercetări de laborator care vizează printre altele, optimizarea unui protocol de creștere și dezvoltare *in vitro* a unor soiuri de cartof cu pulpă violet. Cercetările au vizat și studiul biochimic al antioxidanților prezenți în mod natural, precum și analiza în microscopie electronică de transmisie a țesuturilor producătoare de antociani. În final, optimizarea protocolului de micropropagare *in vitro* poate sta la baza unei tehnologii verzi, în vederea consumului de microtuberculi sau a utilizării acestora ca material săditor pentru agricultură.

STRUCTURA TEZEI DE DOCTORAT

Teza de doctorat cuprinde un total de 150 pagini și a fost structurată în două părți:

- Stadiul actual al cunoașterii – patru capitole, 48 pagini (32%);
- Contribuția personală – cinci capitole, 102 pagini (68%).

În cadrul cercetării s-au urmărit și analizat 224 de referințe bibliografice din domeniu, pentru a raporta rezultatele obținute într-o manieră cât mai realistă și pentru a sublinia caracterul de originalitate, precum și potențialul inovator al tezei de doctorat. Lucrarea conține un număr de 22 tabele, 48 figuri care includ 20 grafice individuale și 80 fotografii originale. Din totalul figurilor și tabelelor, 24 sunt asigurate din punct de vedere statistic (16 figuri și 8 tabele).

SCOPUL ȘI OBIECTIVELE CERCETĂRII

Scopul central al cercetărilor derulate în cadrul tezei de doctorat a fost de a studia cartoful cu pulpă violet (CPV) pentru a oferi un protocol de cultură *in vitro*.

Principalele obiective ale cercetărilor efectuate în prezenta teză de doctorat, au constat în:

1. Determinarea gradului de cunoaștere și de acceptare a soiurilor de CPV în rândul populației din județul Sibiu, cu scopul de a conștientiza valoarea nutritivă a consumului de CPV;
2. Optimizarea unui protocol complet de lucru *in vitro* care vizează creșterea și dezvoltarea *in vitro* a unor soiuri de CPV;
3. Identificarea și determinarea biochimică a unor compuși bioactivi la *S. tuberosum* obținuți prin culturi *in vitro* și din planta mamă cu scopul de a verifica prezența sau absența antocianilor;
4. Analiza elementelor de ultrastructură prin microscopie electronică de transmisie (TEM) asupra plantulelor și microtuberculelor de *S. tuberosum* proveniți din cultura *in vitro* în vederea analizei citologice a țesuturilor implicate în sinteza de antociani.

CONTRIBUȚII PERSONALE

Prima parte a cercetării a urmărit **aplicarea unui chestionar** pentru a identifica gradul de cunoaștere și de acceptare în rândul respondenților a soiurilor de cartof cu pulpă violet. Grupul țintă a fost constituit din locuitorii din județul Sibiu, România. Prin intermediul acestui studiu, s-au determinat în rândul respondenților chestionați, nivelul de cunoaștere asupra existenței de varietăți de CPV și beneficiile exercitate de acestea asupra sănătății, împreună cu deschiderea manifestată pentru consumul unor astfel de soiuri. Toate răspunsurile colectate (279) au fost confidențiale și anonime, ulterior fiind interpretate cu ajutorul programului statistic SPSS, versiunea 13.

În **cea de-a doua parte** a cercetării științifice, s-a urmărit inițierea, creșterea și dezvoltarea *in vitro* a soiurilor de cartofi luate în studiu, și anume: `Christian` (CH), `Blue Danube` (BD), `Salad Blue` (SB), `Purple Majesty` (PM), `Violet Negretin` (VN) și `Violet Queen` (VQ). În acest context, s-a testat varianta optimă de **asepsizare** a materialului vegetal în vederea inoculării *in vitro*, rezultând o experiență bifactorială de tipul 3x2, cu 6 variante experimentale, din interacțiunea celor 2 factori (concentrația tratamentului și durata de imersie). S-au efectuat determinări cu privire la rata de supraviețuire a inoculului după trei săptămâni de la momentul inoculării, iar datele obținute au fost prelucrate în programul statistic Polifact. Mai apoi au fost testate tehnici de **inițiere și multiplicare *in vitro*** a CPV. Pentru partea de inițiere, a fost utilizată o experiență monofactorială, de tipul 6x1 (factor soiul), astfel rezultând 6 variante experimentale. Au fost efectuate determinări privind rata de supraviețuire a inoculilor în urma inițierii, iar datele obținute au fost prelucrate cu programul statistic Polifact. Pentru partea de multiplicare, s-au testat diferite tipuri de mediu de cultură, urmărindu-se:

I. Efectul glicinei asupra creșterii și dezvoltării plantulelor

II. Efectul vitaminelor asupra creșterii și dezvoltării plantulelor

III. Efectul cărbunelui activ și al chitosanului asupra creșterii și dezvoltării plantulelor

Experimentul studierii glicinei a presupus o experiență bifactorială de tipul 6x2, rezultând un număr de 12 variante experimentale în urma interacțiunii celor 2 factori (soiul și concentrația de glicină adăugată mediului de cultură). Au fost efectuate determinări biometrice pentru plantulele obținute din subculturile 2, 3 și 4, la un interval de 4 săptămâni de la momentul transferului, urmărindu-se lungimea lăstarilor (cm), numărul de internoduri și distanța dintre internoduri (cm). Datele obținute au fost prelucrate în programul statistic Polifact. Experimentul studierii vitaminelor a avut la bază tot o experiență bifactorială de tipul 6x2, cu 12 variante experimentale în urma interacțiunii celor 2 factori (soiul și tipul de vitamine adăugat în mediul de cultură), fiind efectuate aceleași determinări ca și în cazul precedent. Experimentul studierii cărbunelui activ și al chitosanului a presupus o experiență bifactorială de tipul 6x4, cu 24 variante experimentale, în urma interacțiunii celor 2 factori (soiul de cartofi și tipul de vitamine). Și de această dată, au fost efectuate aceleași determinări ca și în cazurile precedente.

Alături de aceste experimente, s-au stabilit protocoale optime de lucru pentru **inițierea calusogenezei și subcultivarea calusului**. Pentru partea de inițiere, s-a pus în aplicare o experiență trifactorială, de tipul 4x5x2, cu factorii A (soiul de cartofi), B (mediul de cultură) și C (fotoperioada), fiind obținută o experiență randomizată cu 40 de variante experimentale. Pentru subcultura calusului, a fost aplicată o experiență

bifactorială, de tipul 4x5, prin interacțiunea factorilor A (soiul de cartofi) și B (tipul mediului de cultură), rezultând 20 de variante experimentale. La patru săptămâni după inițierea calusului, au fost efectuate determinări privind rata de formare a calusului, iar după șase săptămâni de la momentul inoculării celei de-a treia subculturi, au fost determinați următorii parametri biometrici: rata de regenerare a lăstarilor (%), greutatea proaspătă (g) și principalele caracteristici ale calusului, cum ar fi culoarea și textura. Datele obținute au fost prelucrate în programul statistic Polifact.

Optimizarea tehnicilor de microtuberizare a presupus **inducerea tuberizării *in vitro*** prin testarea unor protocoale de lucru, urmărindu-se:

I. Influența zaharozei asupra procesului de tuberizare *in vitro*

II. Influența culturii în dublu strat asupra procesului de tuberizare *in vitro*

Pentru a analiza influența zaharozei asupra procesului de tuberizare *in vitro* s-a utilizat o experiență bifactorială, de tipul 6x4, iar în urma interacțiunii celor doi factori (soiul de cartofi și concentrația de zaharoză), a rezultat un număr de 24 de variante. Au fost efectuate determinări biometrice asupra procentului de tuberizare (%), numărul de microtuberculi pe plantulă, greutatea (g) și diametrul (mm) acestora. Datele colectate au fost prelucrate cu ajutorul programului statistic Polifact. În cazul studierii influenței culturii în dublu strat asupra procesului de tuberizare *in vitro*, s-a utilizat o experiență monofactorială, de tipul 2x1 (factor soiul), obținându-se 2 variante experimentale. Au fost efectuate determinări biometrice ca și în cazul precedent.

Cea de-a treia etapă a cercetărilor a fost dedicată studiilor de cercetare a conținutului de compuși bioactivi ai anumitor soiuri de cartofi. Aceste analize au fost realizate prin metode de spectrofotometrie și HPLC (High Performance Liquid Chromatography). Prin aceste tehnici s-a urmărit identificarea prezenței de compuși antioxidanți, atât la nivel de plantulă provenită din culturile *in vitro*, cât și la nivel de microtubercul și tubercul.

Pentru a se identifica locul în care se acumulează acești compuși bioactivi, s-a apelat la analiza elementelor de ultrastructură ale plantulelor și microtuberculelor obținuți *in vitro* prin aplicarea tehnicii de microscopie electronică de transmisie (TEM), analize care însumează **ultima etapă a cercetării**.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

1. Studiu privind gradul de cunoaștere și de acceptare în rândul populației a cartofilor violet

În ceea ce privește gradul de cunoaștere a varietăților de *S. tuberosum* cu pulpa violet, în rândul populației, un procent de 36,2% din totalul respondenților chestionați au afirmat că nu știau că există și varietăți de cartofi care au pulpa tuberculului complet colorată în violet, iar 69,90% din totalul respondenților nu au consumat niciodată asemenea soiuri de cartof, dar un procent de 65,20% ar dori să încerce să consume tuberculi CPV și doar 1,80% din respondenți au afirmat că nu sunt dispuși să încerce să consume aceste soiuri sub nici o formă.

2. Inițierea, creșterea și dezvoltarea *in vitro* a soiurilor de cartofi luate în studiu

Asepsia. În urma testării celor 6 tratamente de asepsie pentru explantele provenite din lăstari ai soiului SB, procentul de supraviețuire al inoculilor a fost cuprins între 24,44% (T₁) și 79,99% (T₆). Expresia perioadei de contaminare a variat între 2 și 6 zile începând cu momentul inoculării explantului și a depins de concentrația de dezinfectant utilizată. Tratamentul cu cele mai bune rezultate utilizat în scopul de a

realiza asepsia explantelor a fost metoda de dezinfectie T₆, unde s-a obținut o rată de supraviețuire a fitoinoculilor de 79,99% și o contaminare foarte scăzută în eprubete.

Inițiere și multiplicare *in vitro*. În procesul de **inițiere**, au fost testate 2 metode de prelevare a materialului vegetal, și anume: prin stimularea creșterii mugurilor de cartofi prin excizarea „ochiurilor” și punerea acestora în vase Petri cu apă distilată ulterior dezinfectiei acestora și prin utilizarea de „colți” de cartofi obținuți în urma depozitării tuberculilor la întuneric. Prima metodă nu a avut succes, astfel că s-a recurs la obținerea de explante în urma încolțirii tuberculilor prin menținerea acestora la temperatura camerei, în întuneric, pentru o perioadă de o săptămână. Explantele ce au constat din muguri de cartofi, au fost dezinfectate cu succes, utilizând varianta de asepsizare T₆, și ulterior au fost inoculate pe MS62. La trei zile de la inoculare, la toate explantele au fost observate procese hipertrofice. Cel mai mare succes în procesul de inițiere a fost înregistrat la soiul SB (87,50%), urmat de soiurile VQ (82,50%), CH și BD (77,50%), VN (72,50%) și PM (70,00%). Rata de succes pentru acest proces a fost de 77,91%.

Pentru **multiplicarea** materialului vegetal, s-a continuat cu toate soiurile de cartofi luate în studiu, prin realizarea de subculturi efectuate pe mediu de cultură proaspăt, prin secționarea plantulelor și prelevarea de microbutași ce conțineau 1-2 frunzulițe, respectiv 1 sau 2 noduri, fiind organizate 3 experimente.

I. Efectul glicinei asupra creșterii și dezvoltării plantulelor

Glicina adăugată în mediul de cultură a contribuit la obținerea de lăstari mai lungi la soiurile CH, BD, SB, PM și VN, înregistrându-se diferențe statistice semnificative. În ceea ce privește mediul de cultură MS62+Gly, soiul VN a avut o creștere semnificativă a taliei lăstarului (9,50 cm), urmat de soiurile SB (9,00 cm), BD (8,40 cm), CH (7,42 cm) și PM (5,70 cm). Pentru soiul VQ, mediul de cultură MS62+Gly a avut un efect opus față de celelalte soiuri studiate, lungimea lăstarilor a fost de 4,27 cm, aproximativ de două ori mai mică decât pe mediul de cultură MS62 (Ct), dar plantulele au fost mai viguroase în comparație cu cele crescute pe mediul de cultură de control, prezentând tulpină mai robustă și frunze bine formate de culoare verde intens. În ceea ce privește analiza numărului de noduri și distanța internodală, cele mai bune rezultate au fost obținute în urma cultivării plantulelor pe mediul de cultură MS62 adăugat cu glicină.

II. Efectul vitaminelor asupra creșterii și dezvoltării plantulelor

Fiecare soi de CPV a fost cultivat pe două variante de mediu de cultură, și anume MS62 (control) și MS cu adaos de vitamine Gamborg, MS+B₅. Nu au existat diferențe semnificative între cele două tipuri de medii de cultură pentru niciunul dintre soiurile studiate, media de lăstari per probă fiind situată între 1,07 și 2,03. Nici în cazul monitorizării lungimii lăstarilor, nu au fost înregistrate diferențe semnificative, însă se pot observa diferențe semnificative pozitive între lungimea plantulelor crescute pe mediul MS62 (martor), comparativ cu cele crescute pe mediul MS+B₅. Cea mai mare diferență de creștere a plantulelor pe cele două tipuri de mediu de cultură, și anume 3,32 cm este evidențiată în cazul soiului SB, cu o lungime de 7,99 cm pe mediul de cultură MS62, respectiv 4,67 cm pe cea de a doua variantă de mediu de cultură, fiind urmată de CH, PM, BD, VN și VQ.

III. Efectul cărbunelui activ și al chitosanului asupra creșterii și dezvoltării plantulelor

În cadrul acestui experiment, s-au utilizat 4 tipuri de mediu de cultură, după cum urmează: MS62 (control), MS62+C, MS62+A și MS62+C+A. Pe MS62, plantulele tuturor

soiurilor studiate au prezentat cea mai bună dezvoltare (6,17 cm–7,99 cm), fiind urmat de varianta de mediu MS62+A cu valori similare controlului (5,26 cm–7,78 cm). Conform rezultatelor, mediile de cultură la care s-a adăugat chitosan și cărbune activ sau doar chitosan, nu se pretează creșterii *in vitro* pentru soiurile studiate, datorită manifestării fenomenului de stagnare în creșterea plantulelor.

Inițierea calusogenezei și subcultivarea calusului. S-a testat obținerea culturii de de calus la CPV, pe cinci variante de medii de cultură cu diferite concentrații de fitoregulatori de creștere (PGR) și/sau sursă de azot organic (glicină). Materialul biologic a fost reprezentat de fragmente de țesut provenit de la tuberculi, sterilizat cu tratamentul T₆. Explantul a proliferat după aproximativ trei săptămâni de la inițierea culturii. Atât pentru rata de calusare, cât și în ceea ce privește frecvența regenerării pentru perioada de calusogeneză, cele mai bune rezultate s-au obținut în condiții de lumină, cu o fotoperioadă de 16 ore lumină și 8 ore întuneric, pentru toate variantele de mediu testate. Cea mai mare frecvență a calusării s-a înregistrat pe mediul de cultură C₅, având în compoziție ANA 5,00 mg/l, GA₃ 1,00 mg/l, TDZ 1,00 mg/l, la care s-au adăugat și 15,00 mg/l de glicină. În condiții de lumină, calusul a proliferat generând noi plantule pe toate variantele de mediu testate, cu excepția variantei C₁, care a avut în compoziția sa 2,4-D 2,50 mg/l. Și de această dată, ca și în cazul frecvenței calusării, cele mai bune rezultate au fost obținute tot pe varianta de mediu C₅, după cum urmează: BD 74,07%, SB 73,07%, CH 70,00%, VN 65,38%, PM 63,33% și VQ 60,00%. Cele mai bune rezultate privind proliferarea și greutatea proaspătă ale calusului, au fost vizibile, atât pe varianta de mediu de cultură C₁ cu un conținut de 2,50 mg/l 2,4-D, cât și pe varianta C₅, având în compoziția sa ANA 5,00 mg/l, GA₃ 1,00 mg/l, TDZ 1,00 mg/l, la care s-au adăugat și 15,00 mg/l de glicină. Calusul cu cea mai mare greutate a fost cultivat pe varianta de mediu C₁, aparținând soiului CH (2,06 g), pe când cea mai scăzută valoare asupra greutateii calusului, a fost înregistrată pe varianta de mediu C₂ pentru soiul PM (0,42 g). Culoarea predominantă a calusului cultivat a fost verde, cu excepția calusului cultivat pe varianta de mediu C₅, unde culoarea violet a fost evidențiată la 4 din cele 6 soiuri de cartofi studiate. Textura calusului a fost diferită, variind în special în funcție de mediul de cultură, de la moale, la friabil și rugos.

Inducerea tuberizării *in vitro*. În prima parte a experimentului a fost testat procesul de microtuberizare pentru patru variante de mediu de cultură (MS62) suplimentate cu diferite concentrații de zaharoză (6, 8, 10 și 12%). S-a continuat în partea a doua, cu studiul comportamentului pe mediul de cultură în dublu strat a soiurilor CH și SB.

I. Influența zaharozei asupra procesului de tuberizare *in vitro*

Mediul de cultură cu o concentrație de 8% zaharoză (MT₂) a prezentat cele mai bune rezultate, obținându-se următoarele rate de tuberizare: 37,78% SB, 36,67% VN, 35,56% CH, 33,33% VQ, 31,11% BD, 27,78% PM. Cel mai scăzut procent în ceea ce privește tuberizarea *in vitro* a fost obținut utilizând mediul de cultură cu o concentrație de 120 g/l zaharoză (MT₄), unde rata de tuberizare a fost sub 7% în cazul tuturor soiurilor luate în studiu. Cele mai bune rezultate în obținerea de microtuberculi per plantulă au fost înregistrate pe MT₂. Pe acest tip de mediu, cel mai productiv soi a fost SB (3,67), urmat de VN (3,00), CH (2,33), VQ (2,33), PM (2,00) și BD (1,67). Pentru variantele de mediu de cultură MT₁ și MT₄, toate cele șase soiuri au generat doar un microtuber per plantulă. La variantele de medii de cultură MT₂ și MT₃, greutatea microtuberculilor a avut o valoare similară pentru toate soiurile studiate, fiind

totodată superioară greutateii microtuberculilor obținuți în urma cultivării pe MT₁ și MT₄. De exemplu, la soiul SB, greutatea medie a microtuberculilor obținuți pe mediul de cultură MT₂ a fost de 1,11 g, pe când la cultura pe varianta de mediu MT₄ greutatea medie a microtuberculilor din același soi a fost semnificativ redusă, atingând doar valoarea de 0,36 g. De asemenea, și în cazul măsurării diametrului microtuberculilor, au fost obținute rezultate similare pentru mediile de cultură MT₂ și MT₃, respectiv MT₁ și MT₄, dar cu diferențe semnificative din punct de vedere statistic. Cel mai mare diametru al microtuberculilor a fost înregistrat pe varianta de mediu MT₂ pentru soiul SB cu 8,70 mm, urmat de CH (8,27 mm), BD (8,03 mm) și PM (7,77 mm) pe același mediu de cultură. Cel mai mic diametru a fost la microtuberculii obținuți pe MT₄ pentru soiul VQ (4,07 mm) urmat de soiurile VN (4,17 mm), PM (4,23 mm) și BD (4,27 mm), pe același mediu de cultură.

II. Influența culturii în dublu strat asupra procesului de tuberizare *in vitro*

Pentru soiul CH, s-a obținut o medie de 10,33 microtuberculi per vas de cultură, valoare semnificativ redusă, comparativ cu soiul SB, unde media obținută a fost de 20,67 microtuberculi per vas de cultură. Mediul de cultură în dublu strat a favorizat obținerea de microtuberculi pentru soiul SB. Soiul SB a înregistrat o medie a microtuberculilor de 1,08 g, pe când soiul CH o medie de 0,92 g, diferență nesemnificativă din punct de vedere statistic. Nici în cazul lungimii microtuberculilor, nu au fost înregistrate diferențe asigurate din punct de vedere statistic, chiar dacă soiul SB a avut o lungime medie de 93 mm, și CH doar 63 mm. În ceea ce privește diametrul, soiul SB a prezentat o valoare mai mare (9,00 mm), comparativ cu CH (3,67 mm).

3. Identificarea și determinarea unor compuși bioactivi la *Solanum tuberosum* L.

S-au realizat analize de spectrofotometrie, pentru a compara cantitățile de antociani și polifenoli din tuberculii și microtuberculii soiurilor SB și CH. Cantitatea de antociani determinată pentru cele 4 probe este în general destul de scăzută. În cazul microtuberculilor soiului SB (23,839 mg/100 g s.u.), respectiv a CH (16,387 mg/100 g s.u.), conținutul în antociani este semnificativ mai mare, comparativ cu cantitatea determinată în compoziția tuberculilor acelorași soiuri (7,877 mg/100 g s.u. SB, respectiv 4,774 mg/100 g s.u. CH). În ceea ce privește conținutul total de polifenoli, se observă că atât microtuberculii, cât și tuberculii conțin cantități apreciabile, cea mai mare valoare fiind obținută pentru proba TSB (301,6709 mg GAE/100 g s.u.), iar cea mai mică valoare pentru TCH (230,7533 mg GAE/100 g s.u.).

La 2 dintre cele 4 soiuri cu pulpa violet, s-a identificat vizual o colorație violet intensă la nivelul tulpinii *in vitro*, și s-a recurs la identificarea și cuantificarea cantității de antociani la nivel *in vitro* asupra plantulelor, prin analize HPLC pentru soiurile SB și VN. S-au identificat 19 compuși fenolici ce aparțin subclaselor de antociani, acizi benzoici și hidroxicinamici, la care se adaugă și flavonele. Antocianidinele identificate la cele două soiuri au fost peonidina și pelargonidina. Din punct de vedere cantitativ, soiul VN este semnificativ mai bogat în compuși fenolici (1.304,361 μg/g) față de soiul SB (842,853 μg/g). Dacă facem referire strict la conținutul în antociani, soiul SB conține o cantitate mai mare de antociani (5,72%), pe când soiul VN are un conținut în antociani de 4,52% din totalul compușilor fenolici identificați.

4. Analiza elementelor de ultrastructură pentru țesuturi producătoare de antociani

La **microtuberculii** soiului SB se remarcă prezența unor celule cu vacuolă mare, tonoplast activ cu depuneri fine electrono-dense, urmare a sinuoziității precis

exprimate, a unui reticul endoplasmatic de tip rugos, bine reprezentat. La acestea se adaugă și prezența amiloplastelor bine dezvoltate, dar și a incluziunilor sferice de tipul protruziunilor. La microtuberulii soiului CH, se distinge în citoplasma celulelor parenchimului acestora, prezența amiloplastelor în contiguitate cu peroxizomi care conțin corpi proteici rectangulari, demonstrând o activitate sintetică mare. La **lăstarii proveniți din tuberculii** soiului CH, se observă la nivel de citosol, aglomerări de materiale electrono-dense, mitocondrii și profile ale reticulului endoplasmatic neted. La lăstarii de tuberculi ce provin de la soiul SB, se observă prezența unor celule active metabolic datorită membranei tonoplastului care este tapisat cu material fin electrono-dens ce se regăsește și în interiorul acestuia și este însoțit de prezența abundentă a amiloplastelor bine formate. În imediata apropiere a lor se regăsesc și incluziuni sferice de tipul protruziunilor cu material fin electrono-dens. Veziculele de secreție de tipul protruziunilor și materialul electrono-dens de la nivelul vacuolei sunt dispuse în contiguitate, sugerând mecanismul de transport al antocianilor către vacuolă. Acestea sunt însoțite adesea de vezicule aplatizate ale Complexului Golgian și foarte multe mitocondrii. Se observă și prezența proplastidelor cu formațiuni tilacoidale în formare însoțite, de asemenea, de vezicule de secreție de tipul protruziunilor și materiale electrono-dense, depozite electrono-dense dispuse la nivelul peretelui celular în contiguitate cu plasmalema activă metabolic și cu tonoplastul, de asemenea, activ metabolic. Secțiunile efectuate prin **tulpina plantulelor** soiului CH, au prezentat rar în celule, depuneri electrono-dense, în vacuole, iar în citoplasmă se pot identifica plastide și coprusculi (mitocondrii). În schimb, în secțiunile efectuate la tulpina plantulelor soiului SB, s-a putut observa, în citoplasmă, prezența de plastide care conțineau formațiuni corpusculare, veziculare. **Radicele plantulelor *in vitro*** provenită de la soiul CH, în general poate fi considerată ca nefiind colorată. În schimb, în zona de formare a radicelelor secundare la soiul SB, se disting – în zona de joncțiune – celule colorate în mod natural în roșu, aspect datorat, prezenței antocianilor. În cazul radicelelor provenite de la soiul CH se remarcă la nivelul plasmalemei puternic active prezența reticulului endoplasmatic rugos, a cristalelor proteice de tipul peroxizomilor, precum și a incluziunilor sferice de tipul protruziunilor. La acestea se adaugă prezența unor formațiuni electrono-dense la nivelul protruziunilor în contiguitate cu profile de reticul endoplasmatic și o plasmalemă puternic activă. Celule tinere active în care se pot observa profile dense de REG, mitocondrii și o membrană puternic activă metabolic. De asemenea, se remarcă prezența de material electrono-dens depus pe fața inferioară a tonoplastului. La radicelele soiului SB, se remarcă prezența de celule tinere cu proplastide care acumulează deja incluziuni de amidon între mebranele tilacoidale încă nematurate la structuri granna. Tot aici, se observă celulele mature, care prezintă un vacuum mare, o citoplasmă fină activă metabolic, ce conține peroxizomi, mitocondrii, profile ale reticulului endoplasmatic rugos, precum și depuneri fine de material electrono-dens pe fața interioară a tonoplastului.

CONCLUZII

1. Studiu privind gradul de cunoaștere și de acceptare în rândul populației a cartofilor violet

Rezultatele obținute scot în evidență deschiderea respondenților față de acceptarea unor noi soiuri de cartofi în dieta lor, și mai mult decât atât, în viziunea acestora, cartofii violet sunt asimilați cu un produs „novel food”.

2. Inițierea, creșterea și dezvoltarea *in vitro* a soiurilor de cartofi luate în studiu

Pornind de la **asepsizarea** materialului vegetal, cele mai bune rezultate s-au obținut în urma aplicării tratamentului: 1 minut scufundat în etanol 70%, imersie 20 minute în soluție Domestos® 20% (v/v) și spălare repetată cu apă sterilă, sub agitare continuă sub hota cu flux laminar în condiții sterile. Pentru **inițierea culturii** de CPV, s-au utilizat cu succes lăstari de *S. tuberosum* inoculați pe varianta de mediu MS62, asigurând o creștere constantă, urmând ca în procesul de **multiplicare *in vitro*** să fie obținute rezultate excelente pe varianta de mediu de cultură MS62 cu adădire de 15 mg/l glicină. Astfel, s-au obținut plantule mult mai viguroase și cu frunze foarte bine dezvoltate, comparativ cu plantulele obținute în urma cultivării pe celelalte variante de mediu de cultură. În cazul **inițierii calusogenezei și subcultivării calusului**, cele mai bune rezultate cu privire la proliferarea de calus s-au obținut în condiții de lumină, cu o fotoperioadă de 16 ore lumină și 8 ore întuneric, cu o capacitate de iradiere de 100-112 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. Cea mai mare frecvență a calusării în etapa de **inițierea calusogenezei** s-a înregistrat pe varianta de mediu de cultură MS62 cu adădire de ANA 5,00 mg/l, GA₃ 1,00 mg/l, TDZ 1,00 mg/l și glicină 15 mg/l. Pentru **multiplicarea de calus**, s-au obținut rezultate excelente pe varianta de mediu de cultură MS62 cu 2,4-D 2,50 mg/l. Pe varianta de mediu de cultură MS62 cu adădire de ANA 5,00 mg/l, GA₃ 1,00 mg/l, TDZ 1,00 mg/l și 15 mg/l glicină, textura calusului a devenit mai moale, cu apariția de colorații purpurii, astfel că se poate afirma faptul că glicina a stimulat producția de antociani în calus. Cele mai bune rezultate au fost obținute pentru soiul SB, urmată de CH. Rezultatele prezentate au arătat că de la soiurile de *S. tuberosum*, luate în studiu se pot obține **microtuberculi** pe mediul de cultură suplimentat cu zaharoză 8%, obținându-se rezultate excelente, în special pentru CH și SB. Aceste rezultate sunt similare cu cele obținute pentru soiuri clasice de cartof. S-a dovedit că metoda culturii în dublu strat se pretează în procesul de obținere a microtuberculelor, obținându-se într-o perioadă de timp relativ scurtă, o cantitate semnificativă de microtuberculi.

3. Identificarea și determinarea unor compuși bioactivi la *Solanum tuberosum* L.

În urma investigării conținutului de compuși bioactivi cu structură polifenolică, rezultatele obținute arată că atât pentru soiul SB, cât și pentru CH, microtuberculi au o concentrație mai mare de antociani, comparativ cu tuberculi. Au fost identificați din materialul vegetal al soiurilor SB și VN, 5 compuși biochimici ce aparțin subclasei de antociani, din care 4 aparțin grupei peonidine și unul face parte din grupa pelargonidinelor, în urma analizelor HPLC. S-a demonstrat faptul că și în cadrul materialului vegetal cultivat *in vitro*, se acumulează antociani. Se pare că la nivelul tulpinii *in vitro*, soiul VN este mai bogat, atât în compuși fenolici, cât și în antociani, comparativ cu soiul SB.

4. Analiza elementelor de ultrastructură pentru țesuturi producătoare de antociani

Celulele surprinse în analize, sunt în general tinere, cu nucleu evident, membrană plasmatică activă, cu sinuoziități evidente. În plus, la nivelul microtuberculelor se remarcă prezența grupelor de amiloplaste în contiguitate cu incluziuni sferice de tipul protruziunilor de foarte multe ori asociate cu formațiuni sferice prezente la nivelul amiloplastelor și cu grăuncioare de amidon în diferite stadii de dezvoltare. Acestea sunt mai puțin evidente la lăstari. Mitocondriile se asociază, în general, în clustere în imediata apropiere a amiloplastelor, a reticulului endoplasmatic rugos, precum și a

nucleului. Această asociere evidentă susține ipoteza manifestării unei nevoi energetice celulare ridicate, esențială pentru procesele biosintetice. Tonoplastul vacuolei este tapisat, în general, de material fin electrono-dens pe fața internă și de cele mai multe ori, doar în cazul soiurilor violet, acesta este în contiguitate cu protruziunile de la nivelul amiloplastelor, sugerând de asemenea, transferul de antociani către vacuolă, ca și organit pentru depozitarea acestora. Prezența Complexului Golgian completează tabloul metabolic al acestor celule extrem de active, la care asociem prezența inclusiv a corpilor paramurali ca structuri membranare eminentamente implicate în localizarea de enzime cu roluri specifice, absolut necesare dezvoltării celulare.

Cellulele ce provin din soiurile de cartofi violet, conțin frecvent formațiuni sferice de tipul peroxizomilor care includ cristale proteice rectangulare ca formă și permanent asociate cu profile ale reticulului endoplasmatic rugos, de cele mai multe ori localizate în apropierea vacuolei. Problema localizării citologice a produșilor de secreție în general este mai dificilă, deoarece în procesul de preparare a materialelor biologice, se degradează sau se pierde în operațiunile de spălare a probelor. Din acest punct de vedere, în prezent tehnicile de microscopie electronică sunt asociate cu utilizarea markerilor moleculari care cu precizie pot să identifice, atât locul sintezei, cât și traseul distribuției la nivelul celular al acestora.

RECOMANDĂRI

Pe baza rezultatelor obținute în urma cercetărilor efectuate în prezenta teză de doctorat, se recomandă următoarele:

1. Implementarea protocolului de cultivare *in vitro* a soiurilor de CPV începând cu:
 - prelevarea de explante de la nivelul mugurilor generați la nivelul „ochiurilor” încolțite pe tuberculii adulți de *S. tuberosum* de la soiuri cu pulpa violet;
 - aseptizarea materialului vegetal timp 1 minut scufundat în etanol 70%, urmat de imersie timp de 20 minute în soluție Domestos® 20% (v/v) și spălare consecutivă cu apă sterilă sub agitare continuă, până la eliminarea completă a soluției de sterilizat, sub hota cu flux laminar steril.
 - inocularea explantelor pe mediu de cultură MS62 pentru inițierea vitroculturii pentru a realiza micropropagarea clonală;
 - multiplicarea materialului vegetal vitrocultivat pe varianta de mediu de cultură MS62 cu adădire de glicină 15 mg/l;
 - inducerea tuberizării *in vitro* prin implementarea culturii în dublu strat;
 - recoltarea și depozitarea microtuberculilor obținuți până în momentul consumului sau utilizării acestora.
2. Adădirea de glicină în mediile de cultură care vizează obținerea de calus, pentru a stimula proliferarea de calus violet cu textură dură;
3. Obținerea de microtuberculi la scară industrială cu scopul de a constitui viitor material de plantat sau de consum;
4. Cultivarea și consumarea soiului SB datorită adaptabilității sale la condițiile *in vitro* și totodată datorită conținutului crescut de principii active;
5. Utilizarea datelor obținute în prezenta teză, în obținerea unor soiuri românești de CPV, de către amelioratori, dat fiind faptul că pe piață există un interes crescut pentru aceste soiuri de cartof.
6. Continuarea studiilor cu privire la CPV, prin aprofundarea studiilor care vizează compoziția biochimică a materialului vegetal.

7. Continuarea studiilor de microscopie electronică cu sprijinul markerilor moleculari de localizare strictă a antocianilor la nivel celular.

ORIGINALITATEA ȘI CONTRIBUȚIILE INOVATIVE ALE TEZEI

Studiul realizat denotă un caracter profund de interdisciplinaritate și transdisciplinaritate plecând de la aprofundarea studiilor de cercetare fundamentală către cercetarea aplicativă. În cadrul tezei de doctorat au fost accesate cunoștințele fundamentale de biologie, fiziologie a plantelor, biochimie, genetică, biotehnologie vegetală, microscopie optică și electronică, potențial farmaceutic și alimentar a speciei studiate.

Ca și elemente de originalitate, pot fi punctate următoarele:

- modelul de abordare privind inițierea și multiplicarea *in vitro* cu succes a celor 6 soiuri de CPV;
- studiul efectului chitosanului și a glicinei adăugate în compoziția mediului de cultură, pentru creșterea plantulelor de CPV *in vitro*;
- modelul experimental, în dublu strat, pentru microtuberizare la soiurile CPV;
- analiza elementelor de ultrastructură pentru țesuturi producătoare de antociani ale soiurilor de cartofi CPV.

Caracterul inovativ al prezentei teze constă, în primul rând, în optimizarea unui protocol de înmulțire vegetativă a CPV, care este diferit față de soiurile de cartofi cu pulpă albă. De asemenea, și tipul de abordare a studiului, privind cultivarea *in vitro* a soiurilor de CPV, începând cu procesul de inițiere și terminând cu obținerea de microtuberculi, poate fi considerat un alt element inovativ al prezentei lucrări datorită asocierii cu metodele de analiză morfometrică și de ultrastructură celulară.

Teza de doctorat se încadrează la nivelul de laborator, iar transferul cunoștințelor la nivel pilot, poate fi realizat cu ușurință, respectând modele deja oferite de cultura cartofului, motiv pentru care aceste rezultate se pot implementa direct.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. ANGHEL, I., BREZEANU, AURELIA, TOMA, N. (1981). Ultrastructura celulei vegetale. Atlas. Ed. Academiei Republicii Socialiste România, București.
2. BORUCKI, W., BEDERSKA, MAGDALENA (2015). Visualisation of plastid outgrowths in potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers by carboxyfluorescein diacetate staining. *Plant Cell Rep*, 34, 853-860.
3. BURZO, I., TOMA, C. (2012) Țesuturile secretoare și substanțele volatile din plante. Ed. Univ. „Alexandru Ioan Cuza” Iași.
4. CACHIȚA-COSMA, DORINA, ZĂPĂRȚAN, MARIA (1991). Potato tuberogenesis using in vitro bi-layer tehnique. In *The IVth National Symposium on plant cel land Tissue Culture* (pp. 7-9).
5. COELHO, N., ROMANO, A. (2022). Impact of chitosan on plant tissue culture: recent applications. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 1-13.
6. ISLAM, M. S., RONI, M. Z. K., JAMAL UDDIN, A. F. M., SHIMASAKI, K. (2017). Tracing the role of sucrose in potato microtuber formation 'in vitro'. *Plant omics*, 10(1), 15-19.
7. NAGY, ALEXANDRA-MIHAELA, OROS, PAULA., CĂTANĂ, CORINA, ANTOFIE, MARIA-MIHAELA, SAVA SAND, CAMELIA (2023). In Vitro Cultivation of Purple-Fleshed Potato Varieties: Insights into Their Growth and Development. *Horticulturae*, 9(4), 425.
8. SAND, CAMELIA, ANTOFIE, MARIA-MIHAELA (2022). De Novo Shoot Development of Tropical Plants: New Insights for Syngonium Podophyllum Schott. *Horticulturae*, 8, 1105.