

**MINISTERUL EDUCAȚIEI, CULTURII ȘI CERCETĂRII AL
REPUBLICII MOLDOVA
GRĂDINA BOTANICĂ NAȚIONALĂ (INSTITUT)
„ALEXANDRU CIUBOTARU”**

Cu titlu de manuscris:

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

LOZINSCHII MARIANA

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

164.01 – BOTANICA

Teză de doctor în științe biologice

Conducător științific:	_____	CIORCHINĂ Nina doctor în științe biologice conferențiar cercetător
Consultant științific:	_____	CALALB Tatiana doctor habilitat în științe biologice conferențiar universitar
Autorul:	_____	LOZINSCHII Mariana

CHIȘINĂU, 2019

© Lozinschii Mariana, 2019

CUPRINS

ADNOTĂRI (română, engleză, rusă).....	5
LISTA ABREVIERILOR	8
INTRODUCERE.....	9
1. ISTORICUL, ORIGINEA ȘI TEHNOLOGIILE DE CULTIVARE <i>IN VITRO</i> A GENULUI <i>RUBUS</i> L.....	14
1.1. Etimologia și scurt istoric al taxonilor	14
1.2. Caracteristica taxonomică și botanică a genului <i>Rubus</i> L.....	16
1.3. Originea și ariile de cultivare a murului.....	18
1.4. Valoarea nutritivă și terapeutică a fructelor de mur.....	20
1.5. Cerințele murului față de factorii ecologici	24
1.6. Tehnologii de multiplicare și cultivare a soiurilor de mur de perspectivă.....	26
1.7. Concluzii la capitolul 1	28
2. CARACTERISTICA MATERIALULUI BIOLOGIC ȘI METODELE DE INVESTIGAȚIE.....	30
2.1. Caracteristica materialului biologic și centrele științifice de efectuare a experiențelor.....	30
2.2. Metode de studii.....	30
2.2.1. Metode biotehnologice	30
2.2.2. Metode biochimice	36
2.2.3. Metode de studiu anatomic	37
2.3. Concluzii capitolul 2	38
3. MICROPROPAGAREA ȘI DEZVOLTAREA <i>IN VITRO</i> A SOIURILOR VALOROASE DE MUR FĂRĂ SPINI.....	39
3.1. Inițierea culturilor avirolice de mur	39
3.2. Morfogeneza <i>in vitro</i> la soiurile de mur	45
3.3. Micropropagarea și multiplicarea <i>in vitro</i>	53
3.3.1. Elaborarea și testarea mediilor nutritive eficiente pentru inocularea, creșterea, dezvoltarea, menținerea și înrădăcinarea explanților	53
3.3.2. Influența regulatorilor de creștere asupra procesului de multiplicare	55
3.3.3. Microclonarea.....	56
3.3.4. Influența balanțelor hormonale asupra creșterii și multiplicării vitroculturilor de mur.....	61
3.3.5. Influența auxinelor asupra și rizogenezii și creșterii vitroplantulelor la soiurile de mur.....	66
3.4. Aclimatizarea materialului multiplicat <i>in vitro</i>	71
3.5. Înființarea colecției de mur în Grădina Botanică Națională (Institut)	76
3.6. Particularitățile agrotehnicii cultivării în câmp.....	78
3.7. Concluzii la capitolul 3	84
4. PARTICULARITĂȚILE MORFO-ANATOMICE ȘI BIOCHIMICE ALE SOIURILOR DE MUR.....	86
4.1. Descrierea morfologică a soiurilor de mur multiplicare <i>in vitro</i> pe lotul experimental al Grădinii Botanice Naționale (Institut).....	86

4.2. Studiul anatomic comparativ al frunzelor unor specii și soiuri de mur	95
4.2.1. Descrierea anatomică a frunzelor taxonilor de mur studiați	96
4.2.2. Anatomia comparată a frunzelor unor taxoni studiați (condiții de seră și teren) ..	101
4.3. Studiul fitochimic comparativ al frunzelor și fructelor la soiuri și specii de mur	105
4.3.1. Studiul calitativ și cantitativ al flavonozidelor	105
4.3.2. Studiul calitativ și cantitativ al taninurilor	111
4.3.3. Analiza cantitativă a acidului ascorbic	116
4.4. Concluzii la capitolul 4	118
CONCLUZII GENERALE	119
BIBLIOGRAFIE	121
ANEXE.....	134
Anexa 1. Microclonarea soiurilor de mur	134
Anexa 2. Micropropagarea și rizogeneza soiurilor de mur	138
Anexa 3. Rizogeneza pe medii suplimentate cu auxine (Nr. 7, Nr. 8, Nr. 9).....	140
Anexa 4. Calusogeneza și organogeneza obținută din limb foliar	141
Anexa 5. Aclimatizarea vitroplantulelor de mur.....	142
Anexa 6. Material săditor obținut prin tehnici biotehnologice	144
Anexa 7. Studiul anatomic	147
Anexa 8. Biochimia principalelor grupe de compuși chimici.....	152
Anexa 9. Colecția de arbuști fruciferi	162
Anexa 10. Act de implimentare a rezultatelor	172
DECLARAȚIA PRIVIND ASUMAREA RĂSPUNDERII.....	174
CURRICULUM VITAE.....	175

ADNOTARE

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

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

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

Domeniu de studiu: 164.01 – Botanica

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

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

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

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

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

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

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

АННОТАЦИЯ

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

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

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

Специальность: 164.01 – Ботаника.

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

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

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

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

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

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

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

ANNOTATION

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

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

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

Field of study: 164.01 – Botany

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

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

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

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

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

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

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

LISTA ABREVIERILOR

2,4-D – acid 2,4 – diclorfenoxiacetic
ABTS – 2,2azinobis 3-etilbenzotiazolin 6-acid sulfonic
AG₃– acid giberilinic
AIA – acid 3-indolilacetic
AIB – acid 3-indolilbutiric
ANA – acid -naftilacetic
ARN – acid ribonucleic
BAP (BA) – benziladenină (sau 6-benzilaminopurină)
CGE – echivalent catehin galic
CLIP – cromatografie de lichide de înaltă performanță
CSS – Cromatografia pe strat subțire
GAE– echivalent al acid galic
GBNI – Grădina Botanică Națională Institut
KIN (KN) – kinetină
MS – Murashige-Skoog
OMS – Organizația Mondială a Sănătății
ORAC – capacitate de absorbție a radicalilor de oxigen
R. Moldova – Republica Moldova
RE – echivalent rutin
SUA – Statele Unite ale Americii
TDZ – thiadizuron
Zea – zeatină

INTRODUCERE

Republica Moldova tradițional produce o cantitate impunătoare de fructe (mere, prune, caise, pere etc.) dar necesitatea în fructe de mur, considerate importante pentru alimentația sănătoasă și echilibrată, și conform OMS, constituie un component important antioxidant, antiradiant vitaminizat, rămâne actuală [169-171]. Extinderea diversității culturilor pomicole poate fi efectuată prin introducerea în cultură a unor soiuri, provenite de la specia *Rubus fruticosus* L.: ‘Arapaho’, ‘Triple Crown’, ‘Loch Ness’, ‘Black Satin’, ‘Polar’, ‘Chester’, ‘Thornfree’, ‘Smoothstem’, ‘Reuben’, inclusiv a soiului ‘Thornless Evergreen’ care provine de la specia *R. laciniatus* Willd [15, 25, 75, 76, 78]. Studiarea particularităților de dezvoltare ale acestor culturi și determinarea cerințelor față de factorii ecologici ar constitui o posibilitate reală de cultivare pe sectoare de producere în agricultura R. Moldova [38, 71, 80, 93]. În ultimele decenii, pentru a satisface necesitățile crescânde ale populației cu fructe de mur, se investește în ameliorarea genotipurilor de mur cu caracteristici biologice valoroase, adaptate la tehnologii moderne de creștere și cu proprietăți gustative și terapeutice înalte [75, 76, 78].

Fructele soiurilor, a populațiilor hibride noi de mur pot servi ca aliment sănătos și o sursă reală de materie primă pentru industria farmaceutică [70, 141, 143, 172]. Astăzi sunt oportune lucrările științifice complexe și de cooperare ale specialiștilor din diferite domenii de activitate pentru extinderea soiurilor de mur în practica agricolă a R. Moldova [1, 6, 15, 19, 48, 49].

Actualitatea și importanța problemei abordate

R. Moldova este la o etapă incipientă în domeniul dezvoltării pomuşoarelor, organizațiile „Pomuşoarele Moldovei”, „Agricultura performantă în R. Moldova”, iar „Centrul de consultanță în afaceri”, proiectul „Îmbunătățirea productivității în cultivarea arbuștilor fructiferi și a căpșunului” contribuie substanțial la susținerea și dezvoltarea acestei ramuri.

Unul din obiectivele comune ale acestor organizații și proiecte este asistența producătorilor privind tehnologiile moderne de producere a materialului săditor prin suport informațional specializat. Dezvoltarea sectorului de pomuşoare din R. Moldova generează o cerere mare a materialului săditor, calitatea cărui va influența și productivitatea plantelor. Sectorul de pomuşoare, în special cultura murului, este foarte atractivă, iar suprafețele cultivate cresc an de an. Pentru dezvoltarea și susținerea pepinierelor de arbuști fructiferi, care comercializează soiuri autorizate de pomuşoare valoroase și potrivite condițiilor climaterice ale R. Moldova, o soluție ar fi multiplicarea plantelor prin microtehnici *in vitro*, care ar asigura obținerea culturilor sănătoase și viguroase într-o perioadă de timp mai scurt. Cultura *in vitro* are mai multe avantaje: plantulele obținute sunt devirusate, cu o pondere scăzută a bolilor, este o metodă rapidă și eficientă de

multiplicare, comparativ cu cea tradițională, de la o plantă-donor se obțin mai mulți inoculi omogeni cu calități determinate și identice plantei-donor, cu o rată de multiplicare și rentabilitate economică sporită, indiferent de cotația sezonieră [2, 3, 7, 53, 54].

Murul este un arbust fructifer productiv, cu fructe de calitate nutrițională avansată. Fructele de mur dispun de un conținut bogat de compuși naturali prețioși, sunt solicitate pe piață, nu doar în calitate de aliment cu conținut sporit de substanțe nutritive și antioxidante, dar și pentru calitățile gustative, aromă, aspectul atrăgător și apetisant. Datorită conținutului sporit de nutrienți, fructul de mur este un produs înalt apreciat și frecvent solicitat, atât pe piața autohtonă, cât și pe cea mondială [94, 95]. În R. Moldova sunt solicitate soiurile de mur fără spini, rezistente la îngheț și secetă, cu diferite perioade de coacere. Alte criterii de apreciere a fructelor de mur sunt fermitatea sporită a fructului și gustul dulce-acrișor.

Cultivarea soiurilor de mur de perspectivă va contribui la dezvoltarea industriei naționale, alimentare, farmaceutice, cosmetice, bazată pe materie primă locală, naturală și de calitate.

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

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

1. identificarea soiurilor de mur, donatoare de explanți pentru inițierea culturilor *in vitro*;
2. testarea factorilor biologici, fizici și chimici pentru cultura *in vitro* la soiurile de mur introducte. Elaborarea formulelor mediilor nutritive optime pentru calusogeneză și morfogeneză (caulogeneză, rizogeneză) la fiecare soi;
3. studierea particularităților biologice ale vitroplantulelor obținute la soiurile de mur și determinarea condițiilor de aclimatizare în seră și de inițiere a plantațiilor în teren;
4. studiul anatomic și biochimic comparativ (flavonozide, taninuri, acid ascorbic) la soiurile de mur;
5. elaborarea schemei tehnologice de micropropagare a materialului săditor la soiurile de mur de perspectivă și contribuții la fortificarea genofondului GBNI (crearea colecției cu soiuri de mur).

Metodologia cercetării științifice. Pentru realizarea tezei au fost utilizate metode de cercetare a plantelor în cultura *in vitro* și *ex vitro*. Metode de studii anatomice și biochimice [42, 44]. La micropropagarea soiurilor de mur în cultura *in vitro* au fost utilizate metode biotehnologice [9, 10]. Vesela utilizată pentru cultivarea plantei a fost sterilizată conform metodelor elaborate în cadrul Laboratorului de Biotehnologie și Embriologie al GBNI. Calcularea indicilor statistici s-a efectuat prin metoda după Mărușteri M. (2006), programul Statistic 7 și MS Excel.

Noutatea științifică a rezultatelor obținute

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

Studiul anatomic al frunzelor de mur a scos în evidență structurile cu caracter diagnostic de identificare a soiurilor de mur fără spini, adaptiv la condițiile pedoclimatice caracteristice R. Moldova. Au fost determinate unele caracteristici biochimice ale fructelor și frunzelor soiurilor de mur.

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

Importanța teoretică

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

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

Aprobarea rezultatelor

Rezultatele tezei au fost publicate în 23 de lucrări științifice, inclusiv 7 în reviste recenzate. Comunicările științifice au fost prezentate și aprobate în rapoartele anuale ale

consiliului științific al GBNI în perioada studiilor doctorale (2013-2016). Cele mai importante rezultate au fost prezentate în cadrul conferințelor științifice internaționale: Международная Научная Конференция. К 200 Летию НБС, "Роль Ботанических Садов в Сохранении Разнообразия Растений", Ялта, Украина; 2012; Юбилейная Международная Научно-Практическая Конференция, посвященная 100-летию Ботанического Сада, Батуми, 2013; 12th International Symposium "Prospects for the 3th Millennium, Agriculture", Cluj-Napoca, România, 2013; International Symposium "Conservation of Plant Diversity", 3 edition, Chisinau, 2014; Conferința Științifică Internațională a Doctoranzilor: "Tendințe contemporane ale dezvoltării științei: Viziuni ale Tinerilor Cercetători", ediția a III-a, Chișinău 2014, ediția a IV-a, 2015, ediția a V-a, 2016; International Symposium, dedicated to the 65th anniversary of the Botanical Garden (Institute) of the Academy of Sciences of Moldova Conservation of Plant Diversity, Chișinău, 2015; Conferința Națională cu participare internațională "Știința în Nordul Republicii: realizări, probleme, perspective" (ediția a II-a) Bălți, 2016. Simpozionul științific „Conservarea diversității plantelor *in situ* și *ex situ*”, Iași, 2016; Simpozion național cu participare internațională „Biotehnologii avansate — Realizări și Perspective”, ediția a IV-a, Chișinău 2016; International Symposium "Conservation of plant diversity" 5th edition, Chisinau, 2017.

Sumarul compartimentelor tezei

În capitolul 1 este descrisă valoarea speciei în aspect biochimic, taxonomia, originea și aria geografică de răspândire a murului. Este prezentat un scurt istoric al murului ca plantă de cultură, sunt evidențiate avantajele economice inclusiv pentru R. Moldova. Tot aici sunt descrise biotehnologiile de cultivare *in vitro* cunoscute în lume, îndeosebi la plantele producătoare de fructe suculente.

În capitolul 2 sunt elucidate materialele biologice și metodele de cercetare. Sunt caracterizate soiurile de mur luate în studiu și descrise metodele biotehnologice (condițiile de sterilizare, inoculare, subcultivare, formulele chimice ale mediilor nutritive, caracteristica factorilor fizici, tehnologici, morfo-anatomici, biochimici (analiza calitativă și cantitativă a flavonozidelor, taninurilor și acidului ascorbic), activitatea antioxidantă și prelucrarea statistică a datelor.

În capitolul 3 sunt prezentate rezultatele cercetărilor proprii, studiul microtehnichilor de cultivare tisulară în cultura *in vitro*. Sunt elaborate formule hormonale și stabilite mediile nutritive optime pentru caulogeneză, calusogeneză, microclonare, micropropagare, sunt evidențiate interacțiunile dintre mediul de cultură, explant și regulatorii de creștere. Sunt descrise procesele

calusogenezei și organogenezei la soiurile de mur, și dinamica de dezvoltare a inoculilor obținuți. Au fost selectate și determinate substraturile de cultivare ale plantulelor de mur *ex vitro*, stabilite și descrise condițiile pentru aclimatizarea și călirea plantulelor regenerate (cerințele față de factorii de mediu), eficiența aclimatizării. Sunt descrise aspecte agrotehnice de cultivare a murului.

În capitolul 4 s-a descris studiul anatomic al frunzelor și evidențiate structurile anatomice cu caracter diagnostic pentru identificarea soiurilor și a fost determinat complexul de indicatori cu potențial structural adaptiv la acțiunea condițiilor mediului.

Studiul biochimic al fructelor și frunzelor a scos în evidență prezența flavonozidelor, taninurilor, acidului ascorbic și conținutul lor comparativ. Fructele de mur care provin de la plante multiplicare biotehnologic posedă activitate antioxidantă înaltă și pot fi recomandate ca aliment sănătos și materie primă în domeniul, cosmetic și farmaceutic.

Concluziile generale și recomandările practice. Sunt formulate 7 concluzii generale și 3 recomandări practice care elucidează pe deplin rezultatele obținute în realizarea scopului și obiectivelor trasate.

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

1.1. Etimologia și scurt istoric al taxonilor

Rubus L. este un gen de plante care face parte din familia Rosaceae. Numele derivă de la cuvântul latin „ruber” ceea ce înseamnă roșu [34]. Acest gen cuprinde zmeurul, murul și alte fructe de pădure. Fructele acestui gen deseori numite pomușoare de tip polidrupă, sunt alcătuite din numeroase drupeole. Fructele sunt succulente, roșii și acrișoare, ulterior negricioase și dulci la coacere [43].

Genul *Rubus* cuprinde multe specii arbustive sau subarbustive cu tulpinile prevăzute cu ghimpi [122, 132]. Datarea în timp a momentului de când omul a început să cultive diferite specii agricole și pomicole este foarte veche. Domesticirea plantelor pomicole s-a produs în momentul în care triburile au renunțat la viața nomadă și au devenit sedentare. Fructele de pădure au constituit primordial primul aliment pentru om încă de la începutul evoluției sale [86, 131] .

Dovezi ale utilizării fructelor în hrana oamenilor sunt numeroase și datează de la sfârșitul epocii de piatră [61, 65]. Există multiple informații și dovezi materiale cum ar fi: fructe carbonizate, sculpturi și basoreliefuri de pe vechile monumente, scrieri vechi religioase, inscripții, legende religioase, istorice și mitologice î. Hr. (înainte de Hristos) etc. Pomii și arbuștii fructiferi au fost introduși în cultură mai întâi la popoarele din Orient, Egipt (pe valea Nilului), Mesopotamia (pe valea Tigrului și Eufratului), Fenicia, Palestina, Persia, India, China [78, 79]. Dezvoltarea impetuoasă a științelor naturii a determinat importante progrese în agricultură care a devenit o ramură de producție mai rentabilă [19, 20, 25]. Alături de cultura extensivă a plantelor agroalimentare se dezvoltă rapid producția intensivă horticola, cu deosebire pomicultura și legumicultura. Primele informații referitoare la cultura arbuștilor fructiferi se găsesc în limba strămoșilor noștri daco-romani [43].

Murul este nativ din Asia, Europa, America de Nord, Australia, Africa și America de Sud are originea geografică cea mai răspândită [81, 98]. Conform manuscriptelor au fost identificate imagini ale genului *Rubus* din antichitate și până în epoca Renașterii, care sunt descrise și evaluate pentru informații botanice și horticole [78, 81]. Cea mai veche specie europeană supraviețuitoare de mur este *R. fruticosus* L. [79]. Imaginile ei se găsesc în *Codexul Juliana Anicia (Codex Vindobonensis)* din 512 d. Hr. (după Hristos), care conține copii ale mai multor texte mai vechi inclusiv un ilustrat iluminat revizuire, parțială alfabetică în *Materia Medica* [98]. Cu privire la aspectele medicale ale genului găsim lucrări scrise în primul secol de *Pedanius Dioscorides*. În aceste lucrări sunt comparațiile imaginilor plantelor de mur existente cu cele de mai înainte, și sunt

redate date despre identificarea filogenetică a murului de *Dioscoridean* în *Codexul revizuirii Neapolitanus* (sec. VII d. Hr.), *Morgan* (secolul X d. Hr.), Grecian (sec. al VIII-lea d. Hr.) și *Arabe* (sec. al XIII-lea d. Hr.). Sunt redate imagini ale g. *Rubus* L. din perioada medievală în revizuirile lui *Apuleius Platonius*: *Leyden Apuleius*, *Book of Bald* și *Bodley* [98]. Murul în calitate de plantă alimentară și medicinală se întâlnește în descrierile artistice și științifice din perioada sec. XIV-XIX d. Hr. Astfel putem conchide că murul a fost cultivat în diferite regiuni specifice în mare parte ca derivat a speciilor indigene din regiunile respective [98, 182].

Murul a fost întrebuințat în Europa de peste 2000 de ani. Fructele erau consumate ca sursă de hrană, uneori folosite în scopuri medicinale. Frecvent erau plantate în garduri vii pentru a se proteja de intruși [5, 43, 81].

Obținerea și selecția soiurilor de mur, hibridizarea și introducerea lor în cultură are o istorie nu prea lungă. Zmeurul *R. idaeus* L. a început să fie introdus în cultură în Anglia în 1500. Soiuri noi ale g. *Rubus* au fost obținute în America de Nord la începutul anilor 1800 [81, 182]. Exploatarea speciilor sălbatice de mur are loc până în zilele noastre servind ca material biologic inițial în practica amelioratorilor pentru crearea de soiuri, hibrizi cu caracteristici gustative, terapeutice și tehnologice avantajoase celor preexistente [102-104].

În SUA, *Rubus allegheniensis* Porter, *R. argutus* L., *R. cuneifolius* Pursh și *R. canadensis* L. au fost importante în obținerea principalelor soiuri de mur, inclusiv ale unor taxoni lipsiți de spini [78-80]. În sud-estul SUA, *R. trivialis* Michx. a fost utilizat pentru a conferi rezistență la frig și boli, cum ar fi soiul 'Brazos'. În Europa, *R. laciniatus* Willd. a fost prima specie domesticită. Ulterior această specie a fost exportată în nord-vestul Pacificului (anul 1860), unde a fost creat unul dintre principalele soiuri pentru această regiune, 'Thornless Evergreen'. Specia *R. ursinus* Cham. & Schlecht. este nativă Pacificului de Nord-Vest și a fost folosită la obținerea soiurilor care se dezvoltă în această regiune [79, 81].

Astăzi cei mai importanți producători de fructe de mur sunt anume pe teritoriul statelor Mexico și Oregon (SUA), și în Serbia unde se cultivă soiuri erecte, semierecte și repente [6, 15, 76]. La nivel mondial se cultivă următoarele soiuri de mur fără spini: 'Apache', 'Hull', 'Thornfree', 'Black Satin', 'Arapaho', 'Navaho', 'Triple Crown', 'Chester' și 'Boysenberry' [170-172]. Producția globală comercială a fost suplinită și de soiurile de mur cu spini: 'Austin-Mayes', 'Shawnee', 'Kiowa', 'Choctaw', 'Cherokee', 'Cheyenne', 'Ouchita' [78]. În statul Mexico cel mai cultivat soi este 'Tupy'. În Oregon și Chile, pe scară largă sunt cultivate preponderent pentru procesare soiurile 'Marion', 'Black Diamond', 'Thornless Evergreen', 'Silvan', 'Boysenberry'. Pentru comercializarea în stare proaspătă cel mai solicitat este soiul de mur 'Obsidian'. În Australia și Noua Zeelandă frecvent este cultivat soiul cu spini 'Karak Black' [86]. În Rusia este solicitat

soiul ‘Lawton’ [78]. În România s-au adaptat mai bine soiurile de mur fără spini ‘Thornfree’, ‘Smoothstem’, ‘Loch Ness’ care au un potențial de producție foarte mare. Soiurile de mur lipsite de spini, care au dat rezultate apreciable în România, sunt în totalitate proveniență americană, [89, 90]. Astfel, ele sunt recomandate pentru multiplicare grație diferitor particularități biologice: ‘Navaho’, ‘Chester’, ‘Triple Crown’, ‘Thornfree’, ‘Smoothstem’, ‘Thornless Evergreen’, ‘Hull Thornless’, ‘Logan-berry’, ‘Black Satin’ și ‘Loch Ness’ [80, 93]. Dintre soiurile cu ghimpi recomandate sunt: ‘Darrow’, ‘Wilson Early’ și ‘Comanche’ sau ‘Gazda’ cu ghimpi puțini [89-91].

1.2. Caracteristica taxonomică și botanică a genului *Rubus* L.

Genul *Rubus* L. cuprinde numeroase specii variate de arbuști și subarbuști, prezente în ambele emisfere ale Terrei, greu de delimitat din punct de vedere sistematic [51, 86, 122].

Conform sistemului de clasificare Takhtajan [149] genul *Rubus* L. are următoarea încadrare sistematică (Figura 1.1):

REGN:	PLANTAE
Subregn:	Cormobionta
Fylum:	Magnoliophyta
Clasă:	Magnoliopsida
Ordin:	Rosales
Familie:	Rosaceae
Subfamilie:	Rosoideae
Gen:	<i>Rubus</i>

Fig. 1.1. Încadrarea sistematică a genului *Rubus*.

Genul *Rubus* cuprinde mai mult de 250 specii, răspândite pe Terra dar mai frecvent în regiunile cu climă temperată din emisfera nordică. Identificarea și delimitarea lor de-a lungul anilor a fost foarte dificilă din cauza hibridării naturale și artificiale extinse ce a avut loc. În plus soiurile au fost obținute prin hibridare interspecifică, în special pe teritoriul Eurasiei și Americii de Nord [24, 39, 43].

Murul comun sau murul european, cuprinde un număr mare de specii înrudite care, în literatura contemporană de specialitate este tratat sub numele latinesc *Rubus fruticosus* [100, 132, 149,].

La scară mondială, taxonul complex sau agregatul *R. fruticosus* cuprinde aproximativ 2000 de denumiri de subspecii. Identitatea și denumirile corecte ale taxonilor subgenici în cadrul acestui agregat necesită clarificări [122, 132, 152]. Deosebirea taxonilor specifici în cadrul genului *Rubus*

este, de regulă, problematică, deoarece diversitatea morfologică este foarte înaltă, iar hibridizarea interspecifică este larg răspândită. După Evans și al, 2007; Morin și al, 2012 termenul ”*R. fruticosus* aggregate” este folosit pentru a diferenția murul european de speciile care vegetează în America de Nord [86, 96, 182].

Descrierea morfologică a genului *Rubus* L.

Arbuști cu tulpini bi- sau multianuale, mai rar plante subfrutescente sau erbacee, anuale. Tulpini erecte, arcuite aplecate în jos sau repente, aculeate, uneori cu peri setacei, cu glande stipitate sau glabre [78, 122]. Lăstarii sunt de 1-3 m lungime, cu tulpina arcuită, rareori târătoare, acoperită de ghimpi dreupți sau recurbați. Frunzele sunt palmat-compuse, cu marginile neregulat serate, cu nervuri păroase și proeminente pe fața interioară. Frunze, de regulă digitat sau pedat-compuse, mai rar penat-compuse sau simple și lobate, pețiolate, stipelate, glabre, păroase sau tomentoase, de obicei cu spini pe nervura dorsală și pe pețiole [132, 169]. Florile bisexuate, rar monoice sau dioice, albe, roze sau roșii, de obicei adunate în inflorescențe cu puține sau multe flori, cu aspect de racem simplu sau compus sau paniculă și foarte rar solitare și terminale. Corola cu 5 petale de forma și mărimi diferite, rareori lipsesc. Receptacul plan sau concav dilatat, de obicei alungit convex. Stamine numeroase, așezate în mai multe cercuri, fixate de marginea receptaculului, uneori mai lungi decât stilele, mai scurte, sau egale cu acestea [153, 167]. Carpele numeroase, libere (gineceu apocarpic), rareori numai 1-6, înserate pe receptaculul convex, cu câte 2 ovule, dintre care unul degenerază. Stil filiform, așezat aproape de vârful ovarului, cu stigmat simplu. Fruct apocarpic, compus din drupeole libere, zemoase, pe receptacul, căzând împreună cu receptaculul sau fără acesta [39, 51, 86].

Conform literaturii [39, 51, 152], în flora spontană a R. Moldova vegetează 8 specii din genul *Rubus* – *R. idaeus* L., *R. caesius* L., *R. canescens* DC., *R. lloydianus* Genev., *R. tereticaulis* P. J. Muell., *R. serpens* Weihe ex Lej. et Court., *R. nessensis* W. Hall și *R. candicans* Weihe ex Reichenb. Dintre speciile spontane un interes deosebit din punct de vedere farmaceutic reprezintă *R. candicans* Weihe ex Reichenb., care habitează în pădurile de foioase răspândite în centrul republicii. Această specie este tratată diferit de către taxonomiștii școlii est-europene. Conform literaturii de specialitate (Czerepanov, 1995) specia *R. candicans* este parte componentă din taxonul specific complex (agsp.) *R. fruticosus* L. agsp. *candicans* (Weihe ex Reichenb.) A. et D. Löve [149, 152].

***R. fruticosus* L.** agsp. *candicans* (Weihe ex Reichenb.) A. et D. Löve, crește spontan în zona pădurilor, pe liziere. Lăstarii din partea superioară sunt canaliculați, lungi, zvelți [132]. Frunzele destul de variate, în general mai înguste, cu foliole terminale eliptice, mai rar lat-eliptice,

ovate sau obovate, adeseori mici, de obicei cu vârf alungit, la frunzele superioare ovat-lanceolat. Foliiolele inferioare – scurt pețiolulate. Inflorescența – racem simplu, mai rar panicul. Florile – albe sau palid roz, rar de un roz viu. Înfloarește în lunile iunie-iulie, fructifică în august [122, 170].

1.3. Originea și ariile de cultivare a murului

Murul este originar din Europa, Asia Mijlocie și America de Nord. Datorită faptului că se poate aclimatiza foarte ușor, această plantă a cucerit aproape toate continentele și zonele geografice [15, 76, 185]. Speciile native de mur sunt din abundență întâlnite în Europa, Asia de Vest, America Centrală și de Nord. Frecvent în unele regiuni din America de Sud (Bolivia, Peru) dar mai rar în alte regiuni ale lumii. În zilele noastre specii de mur sunt întâlnite atât în America de Nord, Europa, Asia, cât și în Australia și Africa (cu excepția deșerturilor) [172, 180, 183].

În Europa murul a început să fie utilizat atât în medicina tradițională, cât și ca plantă ornamentală, cu aproximativ 1800-2000 de ani în urmă. În SUA, după anii 1800 se încercau primele aclimatizări ale soiurilor din regiunile nordice, în special soiurile fără spini [173, 174].

Conform cercetărilor unui grup de savanți [78] primul soi de mur a fost ‘Dorchester’ obținut în anul 1841, însă primul soi plantat a fost ‘Newrochele’ [79] în anul 1854, mai târziu a fost redenumit de *American Pomological Society* – ‘Lawton’. Ambele soiuri selectate au fost din flora spontană, la fel ca alte soiuri ‘Auginbaugh’, ‘Eldorado’, ‘Lucreția’, ‘Snyder’ [78].

În anul 1860 în Europa, s-a reușit prima aclimatizare a soiului ‘Thornless Evergreen’. Acest soi având un rol important în industria comercială, mai apoi a fost exportat în regiunea de Vest a statelor, unde a devenit ulterior principala sursă de mur. Suprafața de cultivarea a soiului ‘Thornless Evergreen’ în statul Oregon (anul 2006) erau de 300 ha, pe când în anul 1970 a fost de peste 1000 ha [78]. Selecționerul american Hall în anul 1990 declara că au fost selectate cu succes soiuri de mur fără spini, ceea ce constituia o platformă importantă pentru cercetare [78].

Principalii cultivatori de mur la nivel mondial rămân a fi cultivatorii din Rusia, Serbia, Polonia, SUA. Cu cantități mai modeste se impun pe piață cultivatorii din Ucraina, Canada, Mexic și Spania. Exportul fructelor de mur și de zmeur în R. Moldova în perioada anilor 2013-2015 a crescut cantitativ de 111 ori, de la 6,42 tone în 2013 la 712,065 tone, iar importul lor a scăzut de la 0,202 tone în 2013 la 0,086 tone în 2015 [48, 49, 171]. Conform datelor prezentate în Figura 1.1. suprafața terenurilor ocupate cu arbuști fructiferi a crescut de 3 ori în anii 2014-2016 comparativ cu anii 2006-2013. De la o suprafață de 0,9 mii ha (hectare) în anul 2006 la 3,1 mii ha în anul 2016.

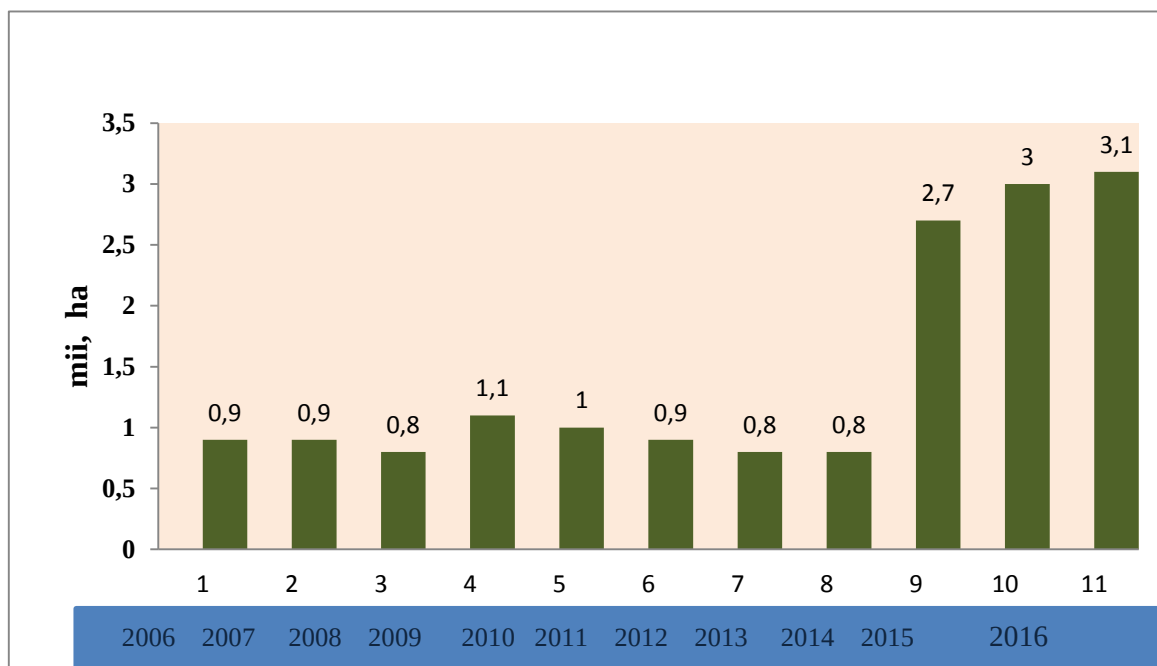


Fig. 1.1. Dinamica suprafețelor totale cu plantații de arbuști fructiferi și căpșun [1]

În anul 2014, suprafața terenurilor arabile pe Terra constituiau 10,924% din suprafața totală. Cele mai valorificate sunt terenurile din Europa – 30,35%, în special R. Moldova cu suprafața terenurilor arabile în 2016 de 53,9% din suprafața totală. Anual în lume cresc suprafețele cultivate cu arbuști fructiferi cu 6% [48].

Din anul 1989 până în 2003 în România erau arii extinse de mur și respectiv, producția era semnificativă (Tabelul 1.2.) iar începând cu anul 2004 a început să se reducă simțitor.

Tabelul 1.2.
Producerea fructelor de mur pe perioada 1989-2007 în România

Ani	1989	2002	2003	2004	2005	2006	2007
Parametri							
Producția (t)	3000	2500	2000	804	109	115	120
Suprafața (ha)	250	150	100	79	63	63	65

Clima generoasă, pământurile roditoare și oamenii muncitori sunt principalele repere care au permis aclimatizarea unor soiuri de mur în R. Moldova. Prima plantație de mur înregistrată oficial în R. Moldova este cea din raionul Fălești, satul Sărata-Veche [173, 181].

Astăzi în R. Moldova sunt înregistrate mai multe plantații de mur. Una în raionul Ialoveni, satul Țipala cu 3,7 ha, două plantații în raionul Fălești în satele Sărata-Veche și Pârlița cu 13 și respectiv 1,5 ha, rn. Călărași 2 ha, rn. Orhei 2 ha [30, 173, 179, 181]. Plantația din satul Holercani,

raionul Dubăsari cu o suprafață de 25 ha, a fost inițiată cu material săditor avirotic multiplicat *in vitro*, în laboratorul de Biotehnologie și Embriologie a GBNI.

Cultivatorii se bucură de o productivitate sporită cu peste 15 tone la hectar anual. Unicul soi de mur omologat înregistrat în catalogul de soiuri al R. Moldova este ‘Thornfree’. Soiul un arbust cu port robust, prevăzut cu un sistem radicular puternic și bine dezvoltat, care pătrunde până la 1,5 m adâncime în sol, din acest motiv planta rezistă secetei. Mugurii adventivi de pe rădăcini asigură refacerea în fiecare an a părții aeriene și permit înmulțirea murului prin butași de rădăcină.

Soiul ‘Thornfree’ are creștere repentă, cu ramuri arcuite spre bază, cu o lungime de 180-350 cm, glabre, cu scoarța de culoare verde, fără spini. Mugurii se formează în axila frunzei. Frunza este compusă cu 5 foliole de formă obovată [48].

Florile bisexuate sunt adunate în spic multiflor situat la vârful ramurilor laterale crescute în anul precedent. Corola este de tipul 5, sepal pubescente lungi de 8-12 mm, petale de aceeași lungime cu caliciul, de culoare roz-deschis. Stamine numeroase. Fructul – o polidrupă succulentă, de culoare negricioasă, lucioasă, compusă din drupeole, prevăzute cu o sămânță pietroasă, la maturitate se desprinde cu tot cu receptacul [15]. Perioada de înflorire – luna mai; fructele se maturizează în lunile iulie-august (Figura A.9.7).

1.4. Valoarea nutritivă și terapeutică a fructelor de mur

Fructele constituie primul aliment în hrana omului chiar de la începutul evoluției sale [168]. Importanța esențială a fructelor de mur constă în aceea că conțin compuși naturali cum ar fi: flavonozide, antociani, taninuri, vitamine, săruri minerale, fibre, acizi organici, pectine [37, 104-106, 171]. Aceste produse sunt recomandate în primul rând, când hrana omului este săracă în vitamine. Trebuie de menționat faptul că murul este o plantă meliferă, deoarece florile sunt deosebit de bogate în nectar, cu o valoare înaltă nutritivă și terapeutică [94, 95].

Substanțele biologice din fructele de mur se asimilează rapid în organism, refac rezerva de glicogen a ficatului, conferind organismului stare reconfortantă. Consumul fructelor de mur nu conduce la obezitate [5, 97, 99, 100]. Acizii organici asigură păstrarea mai bună a vitaminei C, măresc pofta de mâncare, potolesc setea și au rol răcoritor. În calitate de aliment sănătos în hrana omului, fructele de mur sunt utilizate sub formă de gustare sau desert între mese, în stare proaspătă, ceea ce permite ingerarea întregii cantități de vitamine și săruri minerale necesare organismului uman [102-105].

Fructele de mur pot fi consumate proaspete, uscate, congelate sau procesate [174]. Sub formă de suc unicomponent sau cupajat, pireuri, dulceață, marmeladă, compoturi, gemuri, băuturi alcoolice (vin, lichior, rom). Sunt adăugate în înghețate, iaurturi, brânzeturi, diferite produse de

patiserie. *Plinius cel Bătrân* și *Dioscorides Pedanius*, doi dintre cei mai cunoscuți savanți antici, apreciau însușirea astringentă terapeutică a fructelor de mur, iar sucul fiind utilizat contra mai multor afecțiuni [104-106].

Fructele de mur constituie totodată o sursă importantă de materie primă, deosebit de valoroasă pentru obținerea unor produse naturale (pectine, uleiuri, vitamine, taninuri etc.), cu utilizare largă în medicină și cosmetică. Fructele în stare proaspătă, au calități gustative și aspect exterior atrăgător [106, 170].

Fructele de mur conțin: 2-25% hidrați de carbon sub formă de zaharuri ușor asimilabile (zaharoză, glucoză, fructoză), 80-85% apă, 0,5-1,5% proteine, 0,5% acizi organici liberi, 0,4-1,6% substanțe pectice, 0,1% substanțe tanoide, 0,5% substanțe minerale pe bază de K, Ca, Mn, Fe, Al, S, P, Si, Cl, B, 0,8-1,0% celuloză, 0,1-0,7% lipide, vitamine, aminoacizi, 0,4-1,6% substanțe pectice, 0,5% substanțe minerale, 0,5-1,5% proteine și vitaminele A, B₁, B₂, B₅, B₆, C și E [168, 169]. Zaharurile din fructe spre deosebire de cele simple, sunt asimilate de organismul uman foarte ușor, intrând direct în circuitul sanguin, fără transformări prealabile care să necesite consum de energie.

Acizii organici ce se conțin în fructele de mur sunt neutri față de aciditatea sucului gastric, iar substanțele pectice și sărurile minerale din fructe contribuie la diminuarea acidității gastrice. Sucul fructelor, posedă efecte benefice asupra sistemului neurovegetativ [138, 140, 147].

Conform principiilor alimentației raționale, consumul zilnic al murelor este de circa 200-300 g fructe proaspete și industrializate, constituind cca 75-100 kg de fructe anual per locuitor [68, 74, 185, 186].

Fructele speciei *R. fruticosus* au proprietăți astringente generate de conținutul sporit de tanin. Acesta fortifică țesuturile, ameliorează sângerările minore, favorizează tratarea diareei și a inflamațiilor intestinale. Consumul fructelor de mur este indicat, în caz de infecții ușoare precum iritații ale gingiilor și căilor respiratorii. Tot datorită taninurilor, fructele de mur sunt benefice la tratarea afecțiunilor inflamatorii [107, 112, 139].

Fructele de mur dețin un conținut sporit de antociani – responsabili de culoarea lor intensă. Aceste substanțe posedă proprietăți puternic antioxidante, în corelație cu vitaminele C, E și acidul elagic. În ansamblu posedă efect anticancerigen, sunt binevenite în afecțiuni cronice, cardiace. De asemenea, antocianii au efect antioxidant și ameliorează starea sistemului nervos, sunt o clasă de compuși naturali polifenolici care sunt responsabile pentru culoarea întunecată. Fructele de culoare întunecată în opinia mai multor cercetători, reprezintă o sursă de compuși bioactivi cu caracter antioxidant, în special cele de mur și afin [74, 75, 141, 142, 160]. Fructele de mur sunt sursă naturală de salicil, substanță activă regăsită în aspirină.

Fructele de mur sunt surse bogate în fibre. Murele conțin fibre solubile precum pectina care contribuie la activitatea normală a tractului digestiv uman și previne obezitatea [138, 146, 147]. Substanțele pectice din mur, importante pentru calități gelifiante, sunt utilizate în tehnologia de prelucrare, sunt transformate în protopectine și pectine. Celuloza din fructele de mur, joacă un rol important mecanic, stimulează peristaltismul intestinal [142, 147].

Substanțele minerale din mur cum sunt sărurile de potasiu au acțiune alcalinizantă, iar prezența lor în cantități sporite în organismul uman favorizează eliminarea sodiului, datorită căruia aceste pomușoare previn apariția edemelor în tratamente cu cortizon [135-137]. Potasiul și magneziul sunt necesari în procesul de creștere și la sinteza proteinelor. Fierul participă la refacerea hemoglobinei și este indispensabil respirației celulare. Fosforul intervine în metabolismul glucidic, intră în constituția țesutului osos, participă în diverse reacții biochimice. Calciu este constituentul de bază al scheletului, are un rol de coagulare sanguină, în funcționarea normală a sistemului nervos. Sulfur împreună cu fosforul participă la sinteza substanțelor proteice, din aceste motive murul este un aliment primordial pentru om [107, 147, 185].

Fructele de mur contribuie la echilibrul de calciu în organism și are efect pozitiv asupra sistemului circulator, digestiv etc. [107].

Fructele de mur au o capacitate de absorbție a radicalilor de oxigen (ORAC) de aproximativ 28 micromoli la 100 g de fructe, fiind unele dintre cele mai bogate surse de antioxidanți. Sunt bogate în acid elagic, care este un compus fenolic, antiviral, antibacterian și anticancer. Conform datelor expuse de organizația mondială de *Berry Health Benefits Network* fructele de mur conțin 3,69 mg de acid elagic per gram de fructe [170, 171, 176]. Cercetările efectuate de *American Cancer Society* au demonstrat că acest compus este promițător în tratamentul cancerului. Pectina nu este singurul remediu împotriva colesterolului pe care îl posedă fructele de mur. Fibrele solubile au și ele un rol foarte important în reducerea nivelului de colesterol LDL (lipoproteina care conține cea mai mare cantitate de colesterol seric (60-70 %)). Fructele de mur posedă conținut sporit de vitamina C. În acest context în cadrul *Oregon State University* s-a realizat un studiu care a demonstrat că: doze mari de vitamina C pot preveni răceala la unii indivizi și pot reduce durata maladiei cu 14% la copii și cu 8% la adulți [125, 165, 171, 185]. De asemenea, datorită conținutului de taninuri, murele favorizează ameliorarea iritațiilor faringiene, laringiene, provocate de răceli și gripă. Fibrele și pectina prezente în fructele de mur sunt benefice sistemului cardiovascular, reducând nivelul colesterolului. De asemenea, magneziul din aceste fructe fortifică sistemul cardiovascular relaxând arterele, permițând sângelui oxigenat să circule fluid în organism [68, 74, 156, 165].

Analizând principalele clase de compuși (Tabelul 1.2) în două soiuri de mur frecvent cultivate în Serbia, observăm că în soiul de mur ‘Thornfree’ cantitatea de compuși fenolici este mai mare comparativ cu soiul autohton ‘Cancansca Bestrna’, conținutul de fenoli variază între 235,09 GAE/100g FW și 270,22 GAE/100g FW mg. La fel și cantitatea de flavonozide, antociane și substanțe pectice. Factorii abiotici au o influență însemnată asupra capacității antioxidante a plantelor.

Tabelul 1.2.
Compuși chimici în fructele soiurilor de mur cultivate în Serbia [31]

Nr. d/o	Compuși chimici		‘Cancansca Bestrna’	‘Thornfree’
1.	Fenoli g/100 FW	GAE	235,09	270,22
2.	Flavonoide g/100 FW	RE	143,33	172,95
3.	Antociane g/100 FW	CGE	50,95	102,31
4.	Substanțe solide g /100g FW		11,96	15,57
5.	Celuloză g/100g FW		2,20	2,97
6.	Substanțe pectice g/100g FW		0,29	0,30
7.	Protopectină g /100g FW		0,15	0,17
8.	Aciditate g /100g FW		1,36	1,39
9.	Zahăr total g /100g FW		5,36	5,98
10.	Zahăr reducător g /100g FW		1,46	1,32
11.	Zaharoză g /100g FW		3,71	4,43
12.	Proteine g /100g FW		1,40	1,49

Notă: FW – fructe proaspete

Numeroase lucrări [83, 84, 125, 139, 150, 155, 160, 166] demonstrează că factorii de mediu (lumina, temperatura), procedeele de cultivare se răsfrâng asupra capacității antioxidante a pomuşoarelor. Mai mulți factori genetici și de mediu afectează producția de fructe și acumularea de compuși bioactivi în fructe, determinând calitatea nutrițională [87, 125, 128, 155, 160, 164, 166]. Aceste caracteristici ce țin de factorii de mediu, factorii fiziologici, cantitatea de principii active, în fructe manifestă interes în studii și cercetări, ca consumul de fructe sau pomuşoare să compenseze consumatorului aportul necesar de compuși și principii activi, necesare sănătății umane.

În timpul studiilor de laborator, s-a sesizat că acidul elagic încetinește creșterea tumorilor maligne și distruge celulele canceroase la animalele de laborator [135, 136]. Alte studii efectuate de *American Cancer Society* indică că acidul elagic poate reduce efectele nocive pe care estrogenul le are în cazul cancerului glandelor mamare [136, 140, 141].

Un rol important în lupta împotriva cancerului îl au și antioxidanții și vitamina C din mure care ajută la reducerea radicalilor liberi, prevenind astfel apariția cancerului și a diferitelor boli cronice. Murele conțin pectină și fibre solubile, două substanțe cunoscute pentru efectul lor de

reducere a colesterolului (LDL) [176]. Un studiu din 1987 a Universității din Florida, condus de Dr. James Cerda, publicat în *Science News*, evidențiază faptul că după 4 luni în care au consumat pectine din fructe, participanților la studiu li s-a redus nivelul de colesterol cu o medie de 9%, iar la unii participanți li s-a redus nivelul de colesterol cu până la 19% [141, 147, 171].

1.5. Cerințele murului față de factorii ecologici

Murul în calitate de plantă de cultură corespunde condițiilor de sol și climă ce sunt favorabile cultivării pe suprafețe mari în R. Moldova [18, 19]. O serie de însușiri remarcabile ale acestor specii: precocitate, capacitatea de a valorifica o gamă variată de tipuri de sol, bogăția în substanțe nutritive a fructelor și frunzelor, sunt argumente care pledează pentru accelerarea ritmului de extindere a murului și a mai multor soiuri și varietăți de mur valoroase, precum și valorificarea în condiții experimentale cu ulterioară introducere în cultură [1, 4, 6, 175, 177]. Specii rustice, unele din ele cu plasticitate ecologică destul de bună, arbuștii fructiferi se adaptează relativ ușor la condiții și sisteme de cultură variată din R. Moldova. Cultivarea arbuștilor de mur în fermele și gospodăriile profilate asigură o utilizare mai rațională și mai uniformă a forței de muncă în cursul anului [88, 177]. Sunt mai mulți factori ecologici care contribuie la creșterea și dezvoltarea murului.

Lumina influențează pozitiv calitatea fructelor. Murul este o specie exigentă față de lumină, necesită plantare pe versanții cu expoziție favorabilă. De asemenea direcția rândurilor se orientează în așa fel, încât, să valorifice maximum lumina, mai ales în zonele înalte [1, 48, 6].

Temperatura poate fi un factor limitativ pentru cultivarea murului, deoarece poate fi afectat de temperaturi excesiv de scăzute – 20-25°C în perioada de repaus, dar nici extrem de ridicate în perioada de vegetație. Soiurile ce provin din murul sălbatic sunt mai rezistente la ger [41, 47].

Umiditatea. Murul față de umiditatea solului este mai rezistent decât zmeurul, are sistemul radicular mai profund și poate rezista la perioade scurte de secetă. Pentru rezultate mai bune în cultivarea murului cultura se recomandă să fie irigată. Se recomandă irigarea în perioada de formare și coacere a fructelor [1, 144, 145].

Solul. Plantațiile de mur valorifică mai bine terenurile comparativ cu alte culturi. Este recomandat solul nisipos-lutos, bogat în humus, cu bună capacitate de reținere a apei și bine aerisit, cu pH — 5,6-6,5, bogat în azot și proteine [88, 126]. Nu sunt recomandate solurile sărace și foarte grele, reci, uscate și calcaroase. Datorită sistemului radicular dezvoltat, speciile de mur valorifică terenul și în acest mod, asigurând, în condițiile unor tehnologii adecvate producției eficiente și

avantajoase. De menționat faptul că murul nu valorifică unele terenuri, deseori cu risc de eroziune, terenuri alunecoase, cu solul subțire sau cele mlăștinoase din luncile râurilor [151].

Curenții de aer în perioada de iarnă pot provoca pagube de îngheț, vara măresc seceta atmosferică. Lipsa totală a curenților favorizează apariția bolilor și măresc pericolul înghețurilor târzii de primăvară [178, 180, 183].

Relieful variat al teritoriului R. Moldova, cu versanți expuși la soare și văi adăpostite, care întrunesc condiții de precipitații suficiente, temperaturi moderate, insolație favorabilă și adăpost împotriva curenților și a vânturilor, ar favoriza dezvoltarea unui important patrimoniu de culturi de bacifere. În condiții normale, producția de fructe la unele specii ar depăși necesitățile de consum intern, fiind utilizate la export în stare proaspătă sau prelucrată [145, 146, 151]. În comparație cu alte produse agricole, fructele și produsele din fructe de mur dețin o valoare amplă, asigurând comerț avantajos. Cultivarea murului contribuie la combaterea eroziunii și a poluării solurilor. Prezența într-o anumită regiune, pe un anumit teritoriu a unor plantații în masiv, contribuie semnificativ la modificarea de multe ori a regimului și calității climatului [75, 151, 182-184].

Boli și dăunători. Protecția plantelor de mur împotriva bolilor și dăunătorilor se efectuează prin tratamente pe baza buletinelor de avertizare emise de unitățile abilitate în acest sens. Dintre bolile specifice menționăm: rugina (produsă de ciupercile *Phragmidium rubiidaeisi*, *Phragmidium violaceum*) care atacă atât frunzele, cât și scoarța tulpinilor și lăstarilor; pătarea albă (produsă de *Mycosphaerella rubi*) a frunzelor; mucegaiul cenușiu al fructelor (*Botrytis cinerea*). Dintre dăunători, pericol prezintă afidele, păianjenii tetranichizi și insectele defoliatoare, care se combat cu produsele specificate în buletinele de avertizare [48, 58].

Importanța murului din punct de vedere ecologic este: plantele de mur purifică aerul de praf, fum și gaze; asigură o compoziție normală a atmosferei prin consumul de CO₂ și eliberarea în schimb a unei cantități de aproape 3 ori mai mare de oxigen; atenuează extremele de temperatură; măresc umiditatea relativă a aerului; micșorează viteza vânturilor; favorizează reținerea zăpezii etc. [88]. Plantațiile joacă un rol antierozional, intervenind activ în conservarea solului prin protecția împotriva eroziunii de suprafață și adâncime, prin evitarea și împiedicarea alunecărilor de teren [40, 45, 46]. O metodă eficientă se realizează prin selectarea soiurilor rezistente la boli și dăunători și arderea buruienilor. Se aplică produse pe bază de plante, uleiuri vegetale aromatice și anumite pesticide clasice pe baza de sulf sau cupru [145-147].

Tendențele dezvoltării culturilor bacifere din R. Moldova, având în vedere importanța economică deosebită a fructelor cuprind măsuri și acțiuni prioritare. Dintre acestea pe primul loc se situează promovarea tehnologiilor de cultivare ecologică a plantelor [102, 107].

1.6. Tehnologii de multiplicare și cultivare a soiurilor de mur de perspectivă

Lucrări științifice privind micropropagarea *in vitro* a murului în literatura din domeniu sunt limitate [37, 38, 66, 89, 90, 118-120].

În prezent metoda culturii tisulare și celulare *in vitro* a creat o posibilitate reală pentru obținerea unui material săditor de calitate înaltă [64]. Elaborarea bazelor metodice și formarea acestei științe are o istorie relativ scurtă de dezvoltare. Cele mai timpurii lucrări, în care s-au făcut încercări de a folosi metoda culturii izolate în condiții controlate au fost cercetările lui Boune (1907), Sachs (1893), Brown și Morria (1892). Primele experimente ale unor celule vegetale au fost realizate de Haberlandt încă în 1902, care pentru prima dată a folosit metoda culturii țesuturilor și celulelor vegetale pentru demonstrarea totipotenței celulelor [2, 3, 7].

Ulterior, în anul 1932, White a reușit realizarea unei culturi indefinite de extremități de rădăcină, iar în 1939 Gautheret, Nobecourt și White realizează astfel de culturi din diverse țesuturi vegetale [8-11].

Cu ajutorul metodelor biotehnologice *in vitro* se obțin biomase bogate în substanțe active cu un înalt grad de puritate, țesuturi ale plantelor sau chiar indivizi întregi de organisme [33, 46].

Biotehnologia are numeroase aplicații în cultivarea plantelor. S-a constatat că toate tipurile de celule pot fi cultivate pe medii nutritive artificiale în laborator [3, 11, 64]. Cultivarea *in vitro* a celulei vegetale este capabilă să regenereze o plantă nouă. Această aptitudine, numită totipotență, stă la baza metodei principale biotehnologice moderne folosite în agricultură. Celulele vegetale și țesuturi cultivate pot sintetiza substanțe biologice active, care sunt produse de plante. Aceste tehnologii sunt utilizate în industriile alimentară și farmaceutică [8-11, 16, 17].

În anul 1952 s-a reușit pentru prima dată, prin metoda lui Morel și Martin (Franța), bazată pe cultura de meristeme, obținerea imunității față de viroze în cazul unei crizanteme. În 1975, au extins tehnica la cartof. În perioada anilor 1958-1960, s-a înființat prima minicolecție de plante „vindecate”, folosindu-se tehnici de micro-reproducere *in vitro*. În anul 1963, Morel a folosit metoda de cultivare a meristemului pentru a obține orhidee indemne, din punct de vedere viral, a căror înmulțire vegetativă este foarte lentă. Din 1963, microînmulțirea *in vitro* s-a răspândit foarte rapid în întreaga lume [8-11, 64].

Cultura de țesuturi aplicată la mur s-a dovedit a fi o cale eficientă și rapidă de obținere a materialului săditor în R. Moldova [17, 27-29, 30]. Această tehnică este utilizată în special când materialul biologic micropropagat este bine selectat și lipsit de virusuri [3, 30, 33]. Micropropagarea murului implică secvențierea lăstarilor proliferați din mugurii apicali și axilari. Lăstarii se înrădăcinează pe medii speciale de inducere a rizogenezei. Această tehnică este cea mai eficientă metodă pentru

proliferarea rapidă și evită variația somaclonală [2, 3]. Broome și Zimmerman (1978) micropropagând soiurile de mur ‘Black Satin’, ‘Dirksen Thornless’, ‘Smoothstem’ au observat variații între genotipuri la explanții proliferati și răspunsul morfogenetic al mediului de cultură în dependență de compoziția acestuia [119, 124]. Cercetătorul Red (1990) a evaluat 256 de combinații ale genului *Rubus* regenerându-le și proliferându-le, apoi constatând că 69% din genotipuri pot fi crescute cu succes pe mediul MS (1962). Un număr impunător de cercetători a încercat în cultura de meristeme de a îmbunătăți procedeele de cultivare pentru a evita variația somaclonală [119, 120, 157]. Protocolul de regenerare este esențial pentru transformările genetice [8-10, 16]. Graham și McNicol (1990) raportează că fragmentele de internod posedă o rată mai sporită de regenerare decât segmentele fasonate din limbul foliar al plantei de zmeur la soiurile ‘Autumn Bliss’ și *SCRI 824E6* și pentru hibrizii ‘Taybery’, ‘Temmelberry’ și ‘Sumberry’ cât și pentru soiul de mur ‘Loch Ness’. Meng și colaboratorii (2004) au descoperit procedura de regenerare a explanților din pețiolul de frunză la soiul ‘Marion’ [120, 121].

Posibilitatea de a selecta plante tipice (caracteristice) din cele derivate din cultura de țesuturi este foarte importantă pentru propagatorii de plante. Skirvin și al. (1981) a obținut o rată înaltă de proliferare la soiurile ‘Thornless Boysen’, ‘Thornlees Young’ și ‘Thornless Evergreen’. Cea mai înaltă rată de proliferare a fost remarcat la soiurile ‘Thornless Boysen’ și ‘Thornless Evergreen’ evidențiindu-se plante tipice în cultura *in vitro* timp de 2 ani de zile [118, 119, 121].

Cercetători români [89, 91] pentru faza de inițiere au utilizat MS 100% 1962 modificat, Myo inositol 100 mg, vitamina B₁ – 1,0 mg/l, vitamina B₆ – 0,5 mg/l, acid nicotinic – 0,5 mg/l și BAP – 0,7 mg/l. Pentru procesul de multiplicare *in vitro*. S-au efectuat numeroase cercetări și experimente pentru a stabili un mediu optim, veselă adecvată multiplicării, diferite tipuri de butași (minilăstari), agenți de gelificare pentru a avea o pondere de multiplicare rentabilă. Tot pentru faza de multiplicare este selectat mediul MS 1962, care este suplimentat cu diferiți regulatori de creștere din grupul auxinelor (în special AIB), citochinine, mai des utilizat fiind BAP cu concentrații de 1-3 mg/l și concentrații scăzute de giberilină AG₃. La specia de *R. laciniatus*, soiul ‘Thornless Evergreen’, concentrațiile de BAP au fost mai scăzute de 1mg/l, fără supliment de auxine, pentru o rată înaltă de multiplicare studiată de Fira și colaboratorii (2009, 2010). Pentru inițierea rizogenezei *in vitro* cel mai des regulator de creștere utilizat este auxina AIB [37, 89, 113].

O etapă importantă este și procesul de aclimatizare *ex vitro*. Este necesar de stabilit condiții optimale și eficiente pentru o pondere înaltă de aclimatizare a vitroculturilor [89-91]. Des fiind utilizat diferite tipuri de palete cu turbă sau mixuri (perlit, sol de gazon, turbă, vermiculit) utilizându-se individual sau amestecuri în diferite proporții [27, 28, 30, 31, 53, 57]. Faza de *ex vitro* de obicei are loc în camere de cultivare, sere. La faza de aclimatizare plantele sunt deja înrădăcinate *in vitro* pe medii nutritive cercetate de un grup de savanți [66, 89, 154] la soiurile

‘Thornless Evergreen’ și ‘Loch Ness’ înrădăcinarea a avut loc în faza de *ex vitro* în hidro cultură. Reeșind din datele literaturii de specialitate o astfel de cercetare este foarte oportună pentru agricultura R. Moldova, fiind formulat scopul tezei: Elaborarea biotehnologiilor de micropropagare și microclonare a soiurilor de mur fără spini de perspectivă și studiul biomorfologic în condițiile pedoclimatice ale R. Moldova. Pentru realizarea acestui scop au fost propuse următoarele obiective: Identificarea soiurilor de mur, donatoare de explanți pentru inițierea culturilor *in vitro*. Testarea factorilor biologici, fizici și chimici pentru cultura *in vitro* la soiurile de mur introductive. Elaborarea formulelor mediilor nutritive optime pentru calusogeneză și morfogeneză (caulogeneză, rizogeneză) la fiecare soi. Studiarea particularităților biologice ale vitroplantulelor obținute la soiurile de mur și determinarea condițiilor de aclimatizare în seră și de inițiere a plantațiilor în teren. Studiul anatomic și biochimic comparativ (flavonozide, taninuri, acid ascorbic) la soiurile de mur. Elaborarea schemei tehnologice de micropropagare a materialului săditor la soiurile de mur de perspectivă și contribuții la fortificarea genofondului GBNI (crearea colecției cu soiuri de mur).

1.7. Concluzii la capitolul 1

Analiza literaturii de specialitate atestă că:

1. potrivit relatărilor murul este utilizat încă din antichitate în calitate de plantă alimentară și medicinală, fiind întâlnit în descrierile, artistice și științifice, se consideră derivat în mare parte din speciile indigene;
2. obținerea și selecția soiurilor noi are loc din anii 1800, în America de Nord, iar exploatarea speciilor sălbatice are loc până în prezent;
3. fructele de mur sunt bogate în numeroși nutrienți valoroși esențiali pentru sănătatea umană – fenoli, flavonoide, compuși antioxidanți, minerale, vitamine, fibre. Acești compuși au rol protector al organismului de cancer, îmbătrânire, diverse inflamații, afecțiuni neurologice. Consumul de fructe de mur are un potențial sporit și necesar pentru menținerea unui echilibru nutrițional de calitate pentru toate categoriile de consumatori;
4. cultivarea murului în condițiile R. Moldova este eficientă deoarece planta este rezistentă la condițiile pedo-climatice: temperaturi înalte de caniculă, secete, cât și temperaturi joase de până la -25°C . Cu toate acestea, cercetarea particularităților de dezvoltare a acestei culturi, precum și aprecierea cerințelor față de factorii ecologici, ne-a permis să constatăm o posibilitate reală de introducere pe sectoare de producere a soiurilor din agsp. *R. fruticosus* L., și sp. *R. lacinatus* Willd., în R. Moldova, respectând anumite cerințe specifice în ceea ce privește condițiile de cultivare;

5. relativ nouă, cultura "*in vitro*" a meristemelor constituie o metodă cu aplicație largă, care a fost utilizată în experiențele mai multor savanți atât în scopuri practice, cât și pentru regenerarea plantelor libere de virusuri, înmulțirea rapidă, neoformarea materialului săditor cu valoare biologică ridicată. Înmulțirea prin minibutași la mur și micropropagarea "*in vitro*" oferă o bună stabilitate genetică a materialului săditor obținut.

2. CARACTERISTICA MATERIALULUI BIOLOGIC ȘI METODELE DE INVESTIGAȚIE

2.1. Caracteristica materialului biologic și centrele științifice de efectuare a experiențelor

În calitate de material biologic au servit soiurile speciei *Rubus fruticosus* L. (agsp.): ‘Arapaho’, ‘Triple Crown’, ‘Loch Ness’, ‘Polar’, ‘Black Satin’, ‘Reuben’, ‘Chester’, ‘Thornfree’, ‘Smoothstem’ și soiul ‘Thornles Evergreen’ care provine de la specia *R. laciniatus* Willd, având origine americană, soiul ‘Polar’ origine poloneză și ‘Loch Ness’ origine scoțiană.

Prin colaborarea Laboratorului de Embriologie și Biotehnologie a GBNI cu „Stațiunea de cercetare și dezvoltare în pomicultură” din Cluj-Napoca, România în cadrul proiectului bilateral, a fost efectuat schimb de material biologic. Cercetările de micropropagare, multiplicare *in vitro*, aclimatizare a materialului vegetal au fost efectuate în Laboratorul de Embriologie și Biotehnologie a GBNI. Înființarea colecției cu soiuri de mur a avut loc pe lotul experimental al GBNI. Studiu fitochimic al celor mai principale clase de compuși chimici și studiul anatomic s-a efectuat la Catedra de farmacognozie și botanică farmaceutică a USMF “Nicolae Testemițanu”.

2.2. Metode de studii

2.2.1. Metode biotehnologice

Pregătirea materialului vegetativ și prelevarea explantului. Experiențele au fost efectuate în cadrul laboratorului de Embriologie și Biotehnologie al GBNI. Cercetările s-au rezumat la stabilirea metodologiei de microînmulțire, folosind explante de la soiurile studiate.

În calitate de obiect de cercetare în cultura *in vitro* au servit meristemele apicale, meristeme apicale ale lăstarilor laterali (provenite de la plantele din teren deschis); fragmente de limb foliar, fragment de lăstar, fragment de rădăcini care ulterior au fost sterilizate conform metodelor adaptate în laboratorul de Embriologie și Biotehnologie al GBNI și metode descrise în metodicele de specialitate [7, 9, 10]. Pentru experimente s-au utilizat diferite medii suplinite cu regulatori de creștere.

Tehnici de sterilizare a veselei și mediilor de cultură.

Laboratorul de culturi *in vitro* dispune de 5 zone distincte: zona de preparare a mediilor nutritive, zona de inoculare a explantelor, zona de micropropagare și microbutășire, zona de creștere a culturilor *in vitro*, zona de aclimatizare a plantelor obținute prin culturi *in vitro*.

Asepsia inventarului, boxelor, echipamentului este o condiție obligatorie a reușitei unei cultivări *in vitro* [31]. Echipamentul dotat pentru aceste încăperi care a fost utilizat la realizarea cercetărilor este prezentat în Tabelul 2.1.

Tabelul 2.1.
Echipamente de laborator utilizate în cercetări biotehnologice

Nr. d/o	Denumirea echipamentului	Marca	Utilizare
1.	Aragaz electric	FIRST Austria	Prepararea mediilor nutritive, dizolvarea componentelor chimice
2.	Balanță analitică	KERN ALJ 220-4M	Cântărirea substanțelor pentru prepararea mediilor nutritive
3.	Distilator	GEU-2120	Producerea apei distilate pentru prepararea soluțiilor stoc și a mediilor nutritive
4.	Dulap	VEB	pentru uscarea vaselor chimice
5.	Dulap	CHOJI-3,5 KC-65	Pentru sterilizarea vaselor de cultivare a plantulelor (eprubete, colbe, borcane, cutii Petri)
6.	Frigider, congelator	NORD	Pentru păstrarea reagenților chimici, soluțiilor stoc etc.
7.	pH-metru	И-160МП	Ajustarea pH-ului mediilor de cultură
8.	Hota cu lux laminar de aer steril		Asigură zona sterilă în hotă și în jurul ei
9.	Autoclav	SYSTEC BB-150 VAPORMATIC 770	Sterilizează mediile nutritive, instrumentarul

În asemenea cazuri se creează un mediu favorabil pentru dezvoltarea diferitor microorganisme ca: ciuperci, bacterii. Astfel, apare necesitatea de a introduce anumite mijloace de sterilizare. În dependență de obiectul sterilizat procedura de sterilizare s-a efectuat utilizând următoarele patru metode:

- sterilizarea cu aer fierbinte în dulapuri speciale de uscat la o temperatură cuprinsă între 170-180°C. Prin asemenea mijloc sunt sterilizate vasele necesare pentru inocularea și dezvoltarea de mai departe a culturilor *in vitro* și, de asemenea vasele pentru pregătirea mediilor de cultură.
- sterilizarea cu aburi prin intermediul autoclavului la 120°C timp de 15-20 minute. Acest tip de sterilizare s-a utilizat în cazul mediilor de cultură.
- sterilizarea cu ajutorul compușilor chimici de diferită natură și la o anumită durată de timp. În acest context s-a recurs la sterilizarea materialului inițial.
- sterilizarea cu ajutorul razelor ultraviolete, necesară pentru laminar și încăperea aseptică unde se derulează activitatea de inoculare și transfer a materialului vegetativ.

Sterilizările efectuate s-au rezumat la următoarele acțiuni:

În calitate de vase s-au utilizat: vase de sticlă cu volumul de 50 ml; colbe conice; eprubete biologice cu baza rotundă; cutii Petri.

Pentru pregătirea propriu-zisă a mediilor s-a folosit: baloane *Erlenmeier*, *Bunzen*, baloane și pahare cotate, cilindri de măsurat, pipete. Toate vasele bine spălate s-au trecut prin apă distilată și s-au sterilizat prin expunerea la aer uscat fierbinte la 180°C timp de 2-3 ore în etuve. Mediile de cultură pregătite au fost repartizate în vase, acoperite cu foliole de aluminiu și autoclavate la 120°C timp de 15-20 minute [8, 22].

Sterilizarea boxei, laminarului și a încăperii aseptice. În acest scop s-a pus în funcțiune lampa bactericidă pentru 2-3 ore. Paralel s-a efectuat și sterilizarea îmbrăcămintei și a instrumentelor de lucru amplasate în interiorul boxei. În cazul transferului materialului prin intermediul laminarului, sterilizarea s-a efectuat cu raze ultraviolete timp de 1 oră și apoi s-a aseptizat toată suprafața cu alcool.

Sterilizarea instrumentarului de lucru. După o sterilizare prealabilă în etuvă timp de 2 ore și o prelucrare cu raze ultraviolete, instrumentele sunt supuse altei proceduri. Înainte de a începe lucru și nemijlocit în procesul de desfășurare a activităților de inoculare, de transfer sterilizarea s-a realizat prin flambare repetată ori de câte ori se finalizează o acțiune și începe alta, la flacăra spirtierei. Imersarea s-a făcut în alcool etilic de 95% [56, 57].

Mediul de cultură se sterilizează la presiunea de 0,75 – 1,0 atm, temperatura 110-120°C în decurs de 15 minute pentru eprubete și colbe mici de 25-50 ml și în decurs de 30-40 minute pentru volume de 3-4 ore pentru colbe mari de 1 l. Mediul de cultură se sterilizează în aparatul *Vapomatic 770* sau prin fierbere la temperatura de 120° C în decurs de 20 minute. Dopurile pentru eprubete și colbe cu mediu se fac din tifon sterilizat în prealabil. Închiderea vaselor cu dopuri de cauciuc sau plută nu se permite în nici un caz, altfel asta va duce la înăbușirea țesutului [2, 23, 52, 53]. Zona de inoculare a explantelor pe mediile de cultură, trebuie să fie perfect sterilă deoarece aici au loc operațiuni de inoculare și transfer pe mediile de cultură sterile.

Compoziția și prepararea mediilor de cultură. Obiectivul urmărit în experiențele efectuate a fost elaborarea mediilor de cultură favorabile pentru creșterea și dezvoltarea culturii *in vitro* la speciile genului *Rubus* și anume a soiurilor luate în studiu. În acest scop au fost testate în jur de 35 variante de medii nutritive cu concentrații de regulatori de creștere de la 0,1 mg/l – 2,0 mg/l: mediu pentru inițierea culturii de mur *in vitro*, mediu pentru obținerea organogenezei din calus, mediul pentru micropropagare și multiplicare, și mediu pentru inițierea rizogenezei. Procesele de dezvoltare *in vitro* sunt dirijate în special de fitohormonii utilizați în mediu. În dependență de concentrația auxinelor și a citochininelor precum și raportul dintre aceste categorii

de hormoni depinde tipul de morfogeneză [7-9]. Pentru prepararea mediilor nutritive și distribuirea lor în vasele de cultură sunt necesare echipamente pentru dozare și măsurarea reagenților chimici, apei distilate, soluțiilor stoc etc. (Tabelul 2.2.).

Tabel 2.2.
Echipamente utilizate la prepararea mediilor nutritive

Nr. d/o	Denumirea echipamentului	Utilizare
1.	Colbe (l) – 0,5; 1; 2; Pahare gradate (ml) – 50; 100; 150; 200; 300; 400; 500;	Vase pentru prepararea mediilor nutritive
2.	Cilindri gradați (ml) – 10; 25; 50; 100; 150; 200; 500; 1000;	Pentru măsurarea volumului apei, soluțiilor etc.
3.	Pipete (ml) – 0,1; 1,0; 2,0; 5,0; 10,0; 20,0	Pentru dozarea reagenților chimici
4.	Recipiente din sticlă	Pentru păstrarea soluțiilor

Una dintre cele mai importante etape ale acestei tehnologii constă în alegerea și prepararea mediului de cultură adecvat. Mediul de cultură conține componente esențiale: apă, săruri organice, sursă de carbon, vitamine, fitohormoni și componente opționale: azot organic, acizi organici, extracte de origine diferită [52, 53, 56].

Mediul *Murashige-Skoog* (MS), a fost utilizat pentru cultura *in vitro* la plantele de mur prezentat în Tabelul 2.3, îndeosebi pentru morfogeneză, cultura de meristeme și regenerarea plantelor. Acest mediu se caracterizează printr-o concentrație ridicată de săruri [52, 53, 124].

Tabelul 2.3.
Componența chimică a mediului *Murashige-Skoog* [7]

Nr. d/o	Macroelemente (mg/l)		Microelemente (mg/l)		Constituenți organici (mg/l)	
1.	MgSO ₄ x7H ₂ O	370	FeSO ₄ x 7H ₂ O	27,8	Mionozitol	100
2.	CaCl ₂ x2 H ₂ O	440	Na ₂ EDTAx2 H ₂ O	37,3	Acid nicotinic	0,5
3.	KNO ₃	1900	MnSO ₄ x 4H ₂ O	22,3	Pirodoxină HCl	0,5
4.	NH ₄ NO ₃	1650	KI	0,83	Tiamină HCl	0,1
5.	KH ₂ PO ₄	170	CoCl ₂ x 6H ₂ O	0,025	Glicină	2
6.	-	-	ZnSO ₄ x 7H ₂ O	8,6	Zaharoză	30000
7.	-	-	CuSO ₄ x 5H ₂ O	0,025	-	-
8.	-	-	H ₃ BO ₃	6,2	-	-
9.	-	-	Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	0,25	-	-

Soluțiile-stoc se prepară prin dizolvarea substanțelor chimice în apă distilată și se păstrează în sticle ermetic închise, la întuneric și temperatura de +5°C. Se adaugă zaharoză, cantitățile

corespunzătoare din soluțiile-stoc și se aduce totul la volumul necesar cu apă distilată. Se ajustează pH-ul mediului, înainte de autoclavare, cu soluție de NaOH 0,1N. Se adaugă agarul (5 g/l). Se sterilizează la 120°C timp de 15-25 minute, în funcție de volumul vasului utilizat. Mediul se autoclavează direct în vasele de cultură [7-9].

Favorizarea procesului de organogeneză fie directă sau indirectă are loc în cazul conținutului scăzut de auxine, rizogeneza s-a obținut prin sporirea conținutului de auxine și micșorarea cantității de citochinine. Pornind de la faptele menționate mai sus, au fost testate un șir de medii nutritive care se deosebeau după conținutul de micro-, macroelemente și raportul auxină/citochinină [56, 57]. Astfel, în dependență de scopul propus au fost utilizat mediul MS suplinit cu diferiți regulatori de creștere în diferite doze,

1. BAP – 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,7; 0,9; 1,0; 1,5; 2,0 mg/l
2. AIB – 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 mg/l
3. AIA – 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 mg/l
4. NAA – 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 mg/l
5. KIN – 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 mg/l
6. GA₃ – 0,1; 0,2; 0,3; mg/l

S-a testat mediul de bază MS cu diferite concentrații de zaharoză și zahăr alimentar.

1. Zahăr alimentar – 15; 25; 30; 45 g/l
2. Zaharoză – 15; 25; 30; 45 g/l

S-a testat mediul de bază MS cu diferite concentrații de agar.

1. Agar – 3,0; 4,0; 4,5; 5,0; 6,0.

S-a testat mediul de bază MS cu diferite concentrații de vitamine.

1. B1 – 0,1, 1,0; 50; 100 mg/l
2. B12 – 0,1, 1,0; 50; 100 mg/l
3. C – 1,0; 50; 100 mg/l

Aclimatizarea plantelor obținute prin culturi *in vitro*. Plantulele de mur au fost aclimatizate în camera de aclimatizare sau sera dotată cu boxe special prevăzute pentru acest proces, unde sunt condiții controlate ferite de anumiți factori ce ar putea duce la deteriorarea sau distrugerea vitroplantulelor de mur. Această etapă când vitroplantulele sunt adaptate la condițiile normale de mediu este foarte importantă, totodată foarte dificilă, în caz dacă se comit erori pot duce la pierderea materialului biologic obținut în faza de micropropagare și microclonare. Mediul controlat din camera de aclimatizare oferă o temperatură constantă, cantitate de apă și nutrienți

necesare culturii. Crearea unui microclimat plăcut creșterii și dezvoltării speciilor de plante are loc prin: dirijarea temperaturii din aer și sol, dirijarea luminii, aerisirea și dirijarea umidității relative a aerului. Protejarea de ploile acide și temperaturile nefavorabile pe toată durata de vegetație.

În experimentele efectuate la GBNI butașii au fost înrădăcinați *in vitro*, după care au fost aclimatizați în camera de adaptare a vitroculturilor care este prevăzută cu rafturi iluminate, pe aceste rafturi s-au confecționat mici tuneluri care să asigure umiditatea necesară. În perioada rece a anului plantulele au fost aclimatizate în camera de aclimatizare, în perioada caldă a anului vitroplantulele au fost aclimatizate în seră, în calitate de suport pentru substrat s-au utilizat plăcile alveolare, din care mai apoi plantele de mur au fost trecute în ghivece de diferite dimensiuni, corespunzător destinației lor.

Substratul nutritiv pentru palete. Amestecul de pământ pentru palete, ghiveciuri se poate cumpăra sau se poate produce, având următoarea compoziție: mraniță, turbă, pământ de țelină sau de grădină și nisip. Întrucât turba are un pH acid, trebuie achiziționată turbă cu pH-ul corectat.

Pământul de țelină rezultă din decopertarea terenurilor înțelenite pe o adâncime de 15-20 cm, iar brazdele obținute se păstrează timp de un an pentru a se descompune. Toate componentele se cern, se amestecă și se autoclavează în autoclav. Apoi, amestecul de pământ se umezește bine, se tasează ușor și se lasă până când temperatura substratului ajunge la 18-20°C, după care se poate trece plantele la *ex vitro*. Sera și fiacre boxă este dotată cu un termometru solar (recomandat fiind termometrul care înregistrează cele mai ridicate și respectiv cele mai scăzute temperaturi).

Metode agrotehnice. Conform literaturii de specialitate pentru cultura murului sunt corespunzătoare terenurile adăpostite natural de păduri, dealuri, perdele de protecție, ferite de curenții reci și vânturi puternice [1]. Pregătirea terenului înainte de plantare se recomandă după aceleași criterii folosite și la alte specii pomicole. Rândurile orientate pe direcția N-S, pentru ca plantele să beneficieze de cât mai multă lumină, iar pe terenurile în pantă vor fi orientate pe curbele de nivel. Distanța cea mai potrivită de plantare este de 2,5 m între rânduri și de 1,8-2 m pe rând [4, 6]. Plantarea se efectuează primăvara, după ce pericolul de îngheț a trecut, în gropi de 40/40/40 cm sau de 60/60/40 cm, dacă solul a fost arat superficial. În ziua plantării, materialul săditor se fășonează, se mocirlesc rădăcinile și se distribuie la groapă. La fiecare groapa se administrează 5 kg mraniță sau gunoi de grajd bine fermentat, 20-30 g superfosfat, 10-15 g, sare potasică și 20 g azotat de amoniu. Plantarea se face la fel ca și la celelalte specii pomicole [1, 4, 6]. Sisteme de conducere. Majoritatea soiurilor de mur au tulpini lungi și foarte lungi care, sub propria lor greutate sau datorită rodului, se apleacă și în lipsa unui sistem de susținere, se culcă pe pământ. Sistemele de conducere au evoluat, iar printre factorii care au contribuit la diversificarea lor au fost: habitusul

diferit al soiurilor, extinderea suprafețelor cultivate, posibilitățile materiale și inventivitatea cultivatorilor. Indiferent de formele de conducere, toate se bazează pe principiul separării tulpinilor fructifere de cele de înlocuire.

Conducerea pe un singur pilon. Sistemul presupune prezența unui pilon înalt de 2,3-2,4 m, gros de 7-10 cm, fixat în pământ la adâncimea de 35-40 cm, la distanța de 25-30 cm de plantă în lungul rândului și în jurul căruia se conduc lăstarii de doi ani, în formă de spirală, până în vârful tutorelui, unde se scurtează. Creșterile ce apar de la baza tufelor, respectiv tulpinile de un an, se conduc pe pământ în lungul rândurilor, toate în aceeași direcție. Acest sistem prezintă dezavantajul ca prin aglomerarea tulpinilor pe tutore, lăstarii fructiferi vor fi și ei înghesuiți, favorizând atacul de *Botrytis cinerea* [1, 4, 15].

Conducerea murului pe doi piloni. Tehnologia de lucru este asemănătoare cu precedentă, cu deosebirea că se folosesc doi piloni plasați de o parte și alta a tufei, la distanța de 25-30 cm în direcția rândului. Pe unul se conduc tulpinile de 2 ani, iar pe celălalt tulpinile de un an. În această situație, lucrările solului se execută mai ușor. Conducerea murului pe spalier cu 2 sârme. Sârmele se fixează de spalier la înălțimea de 1m și 1,7 m [1, 4, 33]. Tulpinile de 1 și 2 ani se palisează la nivele diferite și se dirijează în una sau ambele direcții. Conducerea pe spalier cu ondularea tulpinilor se folosește mai rar și numai la soiurile de mur cu număr redus de tulpini, însă foarte lungi. Pentru a se asigura numărul necesar de muguri de rod, tulpinile se taie mai lungi și se conduc între 2 sârme, sub formă de curbe sinusoidale, ondulându-se într-o singură direcție sau în două. Conducerea pe spalier sub formă de evantai este sistemul adoptat tot mai mult în producție și care răspunde mai bine cerințelor biologice ale murului. Plantele sunt mai bine luminate, aerisite, iar lucrările ce se execută pe plantă [33]. La acest sistem se folosesc 3 sârme la 0,6 m, 1,1 m și 1,7 m, fixate pe stâlpi (h=1,8 m), amplasați din 10 în 10 metri [4].

2.2.2. Metode biochimice

S-a efectuat studiul biochimic comparativ al celor mai valoroase clase de compuși chimici naturali: flavonozide, substanțe tanante și acidul ascorbic în frunze și fructe la soiurile de mur fără spini: ‘Arapaho’, ‘Thornless Evergreen’, ‘Chester’, ‘Thornfree’ și specia *R. candicans* Weihe din flora spontană a R. Moldova.

Studiul calitativ și cantitativ al flavonoidelor

Studiu calitativ și cantitativ se bazează pe caracteristicile fizico-chimice ale flavonoidelor, care chimic sunt destul de labile. Reprezintă substanțe solide, cristalizate, colorate în culori vii de

diferite intensități, lipsite de gust și miros. Culoarea derivaților flavonici este datorată grupărilor cromofore $>C=C<$. Gruparea hidroxolică din poziția 3 cauzează colorația galbenă, iar cele din pozițiile 3' și 4' – colorația galbenă intens. Când în toate pozițiile amintite sunt grupări hidroxilice, culoarea se accentuează și se deplasează spre oranj. În cazul antocianilor, colorarea se produce prin alt mecanism, formarea de legături cu acizii și bazele, în plus, se mai formează un sistem continuu de duble legături conjugate, alături de legătura chinonică [11, 12, 44].

Studiul cantitativ în extractele din produsele vegetale ale soiurilor 'Arapaho', 'Thornless Evergreen', 'Chester', 'Thornfree' și specia *R. candicans* din flora spontană s-a realizat prin metoda spectrofotometrică [11, 12, 44].

Pentru determinarea concentrației sumei de flavonozide, în probele analizate s-au efectuat calcule conform următoarei formule:

$$C = x \cdot 10 \cdot \frac{a \cdot 10}{100} \text{ unde:} \quad (2.1.)$$

x – valoarea corespunzătoare absorbantei la lungimea de undă 430 nm

a – masa produsului vegetal luat pentru analiză

Determinarea calitativă și cantitativă a substanțelor tanante

1. Reacția cu alauni de fier și amoniu.
2. Reacția cu acid acetic și acetat de Pb.
3. Reacția cu soluție de clorură ferică 1%.
4. Reacția cu cristale de NaNO_3 și HCl de 0,1 N.

Pentru determinarea cantitativă a substanțelor tanante sau obținut extractele. Soluția test s-a obținut conform metodicii [42, 44].

Metoda de determinare a acidului ascorbic

Analiza acidului ascorbic a fost determinată titrimetric conform metodicilor de specialitate [42, 44], metoda se bazează pe proprietatea lui de a reduce 2,6-diclorfenoindofenol, în mediu alcalin are culoare albastră, în mediu acid – roșie, iar la reducere se decolorează. Reducerea are loc la interacțiunea cu acidul ascorbic.

2.2.3. Metode de studiu anatomic

Studiul anatomic a fost realizat pe secțiuni transversale ale tulpinilor și frunzelor proaspete conform procedeelelor [21]. Pentru pregătirea secțiunilor transversale ale tulpinii, fragmentul zonei mediane al lamei s-a plasat între două jumătăți ale măduvei de soc, apoi s-au efectuat secțiuni succesive, strict perpendicular pe axa lungă a ei, cele mai subțiri s-au colectat și sa transferat în lichidul de încorporare (apă distilată sau apă distilată și glicerol 1:1) pe lama de preparare [11, 42].

Pentru studiul anatomic au fost confecționate preparate superficiale din material javelizat cu soluție NaOH 3% sau cloralhidrat, care pătrunde ușor în țesuturi, înlătură aerul, granulele de amidon se umflă și se extind, clorofilele și substanțele albuminoase se distrug, iar țesuturile colorate devin mai deschise, cristalele rămân fără schimbări. Uleiurile grase și volatile se contopesc în picături mari, apoi treptat se dizolvă. Pentru aceasta materialul botanic uscat a fost supus fierberii în soluție de NaOH 3% sau cloralhidrat timp de 3-5 minute în dependență de grosimea organului. Fragmentele de material botanic javelizat (tulpini, frunze) se plasează pe lama de preparare, se înlătură cutele, se acoperă cu lamela și se presează ușor pentru înlăturarea bulelor de gaze și excesului de lichid [7, 42].

Micropreparatele cu secțiuni transversale și superficiale au fost examinate în microscopul *Micros* (Austria), cu puterea de mărire a obiectivului x4, x10, x40. Microscopul este cuplat cu cameră digitală la computer, care permite analiza microgafiilor, efectuarea măsurătorilor și stocarea în baza de date. Examenul microscopic a fost realizat la Catedra de farmacognozie și botanică farmaceutică, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”.

Datele numerice obținute în experimentele efectuate s-a efectuat conform metodelor recomandate de M. Mărușteri [32]. Rezultatele experimentale au fost prelucrate cu utilizarea pachetului de programe a testului ANOVA și *Statistic 7*. Prezentarea grafică, tabelară și textuală a fost efectuată prin intermediul programelor *Microsoft Office* în *Windows^{xp} Professional* și *Microsoft Excel*.

2.3. Concluzii capitolul 2

1. Caracteristica materialului biologic denotă că taxonii luați în studiu se deosebesc după port, perioadă de înflorire și coacere, proveniență taxonomică și origine geografică.

2. În calitate de sursă de explanți au servit organe tinere prelevate de la plantele cu vârsta de 3 ani în perioada de creștere intensă a țesuturilor. Mediul nutritiv de cultivare a fost MS, suplinit cu diferite combinații și doze de regulatori de creștere (0,1-2,0 mg/l).

3. Au fost descrise metodele și procedeele biotehnologice, biochimice, anatomice, de prelucrare statistică; selectate din literatura de specialitate și adaptate pentru studiul morfobiologic și micrpropagarea soiurilor de mur fără spini.

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

Pentru evidențierea caracteristicilor biologice și tehnice, comparative în investigațiile științifice au fost mobilizate mai multe soiuri introducute de mur ‘Arapaho’, ‘Triple Crown’, ‘Black Satin’, ‘Reuben’, ‘Chester’, ‘Thornfree’, ‘Smoothstem’ de origine americană, ‘Polar’ – origine poloneză, ‘Loch Ness’ – origine scoțiană provenite de la specia *R. fruticosus* L., și soiul ‘Thornless Evergreen’ al speciei *R. laciniatus*, familia Rosaceae [73, 76, 78].

S-au selectat soiuri de mur fără spini cu caracteristici deosebite: rezistența la îngheț, la secetă și la acțiunea fitopatogenilor; fructe cu diferit termen de maturare, perioadă mai mare de păstrare, aspect și calități gustative noi, rezistență la acțiuni mecanice. Astfel, aceste soiuri introducute de mur fără spini ar permite asigurarea eșalonată a consumatorilor cu fructe autohtone, proaspete, calitative, bogate în vitamine și alți compuși chimici utili cu valoare terapeutică și alimentară incontestabilă pe o perioadă mai extinsă [48, 78, 80, 111, 112].

Soiurile se caracterizează prin diferite perioade de maturare a fructelor: ‘Arapaho’, ‘Loch Ness’, ‘Triple Crown’, ‘Polar’ (*R. fruticosus*) – precoce (iunie-iulie), ‘Thornless Evergreen’ (*R. laciniatus*), ‘Chester’, ‘Thornfree’ (iulie-august), (*R. fruticosus*) – mai tardive (iunie-septembrie), ‘Reuben’ – soi de mur remontant.

3.1. Inițierea culturilor avirolice de mur

Materialul biologic a fost prelevat din colecția GBNI din R. Moldova.

Selectarea explantelor. Explantele au fost prelevate de la plantele tinere (vârsta 3 ani) și din organele recent dezvoltate ale plantei. Pentru obținerea unor plantule viguroase în cultura *in vitro* explantul prelevat trebuie să întrunească un anumit echilibru biochimic, planta-mamă să fie tânără, precum și starea fiziologică bună (fără boli și dăunători) [24, 55].

La mur prelevarea fragmentelor de lăstari apicali și laterali a avut loc în perioada de creștere intensă a țesuturilor lunile (aprilie-mai-iunie). În perioada de latență a plantelor lunile (octombrie-februarie) fragmentele de lăstari apicali, au o viabilitate și regenerare a explantelor mai redusă. În calitate de explanți au servit: meristeme apicale cu primordii ale lăstarilor, meristeme laterale cu primordii, fragmente de lăstar, fragmente de limb foliar, fragmente de rădăcini. Alegerea judicioasă a explantului constituie una dintre condițiile esențiale ale reușitei unei culturi *in vitro*. Totipotența celulară, adică capacitatea oricărei celule vegetale de a reproduce integral planta din care provine – manifestă mai eficient în cazul materialului prelevat de la plantele tinere și robuste [54, 59].

Asepsizarea materialului biologic. Materialul biologic prelevat, adus în laborator, introdus în săculețe de tifon, amplasat în pahare *Berzelius*, acoperite cu cutii *Petri*, a fost spălat în apă cu detergent, în câteva repetări. Ulterior săculețele s-au supus apei curgătoare timp de 2 ore. La sterilizarea mugurilor și vârfurilor lăstarilor, se adaugă *Tween 20*, cu rol protector, care permite evitarea pătrunderii reagenților în interiorul vaselor xilemice, fapt ce ar provoca deteriorarea structurilor și diminuarea viabilității lor [52].

Fragmentele plantei s-au spălat de 4-5 ori în get de apă de la apeduct, pentru îndepărtarea impurităților grosiere. După ce urmează spălarea soluție de Na_2SO_4 , timp de 1 minut, apoi s-a spălat cu apă de la apeduct până la dispariția detergentului. Ulterior materialul biologic a fost menținut în soluție de apă distilată cu 2-3 picături de KMnO_4 0,3%, timp de 10 minute, apoi transferat în încăperi sterile. În boxa sterilă se înlătură soluția de permanganat și se adaugă soluția de clorură de mercuriu 0,1%.

Procedee succesive de sterilizare a materialului biologic pentru inocularea *in vitro* sunt reprezentate schematic în Figura 3.1.:

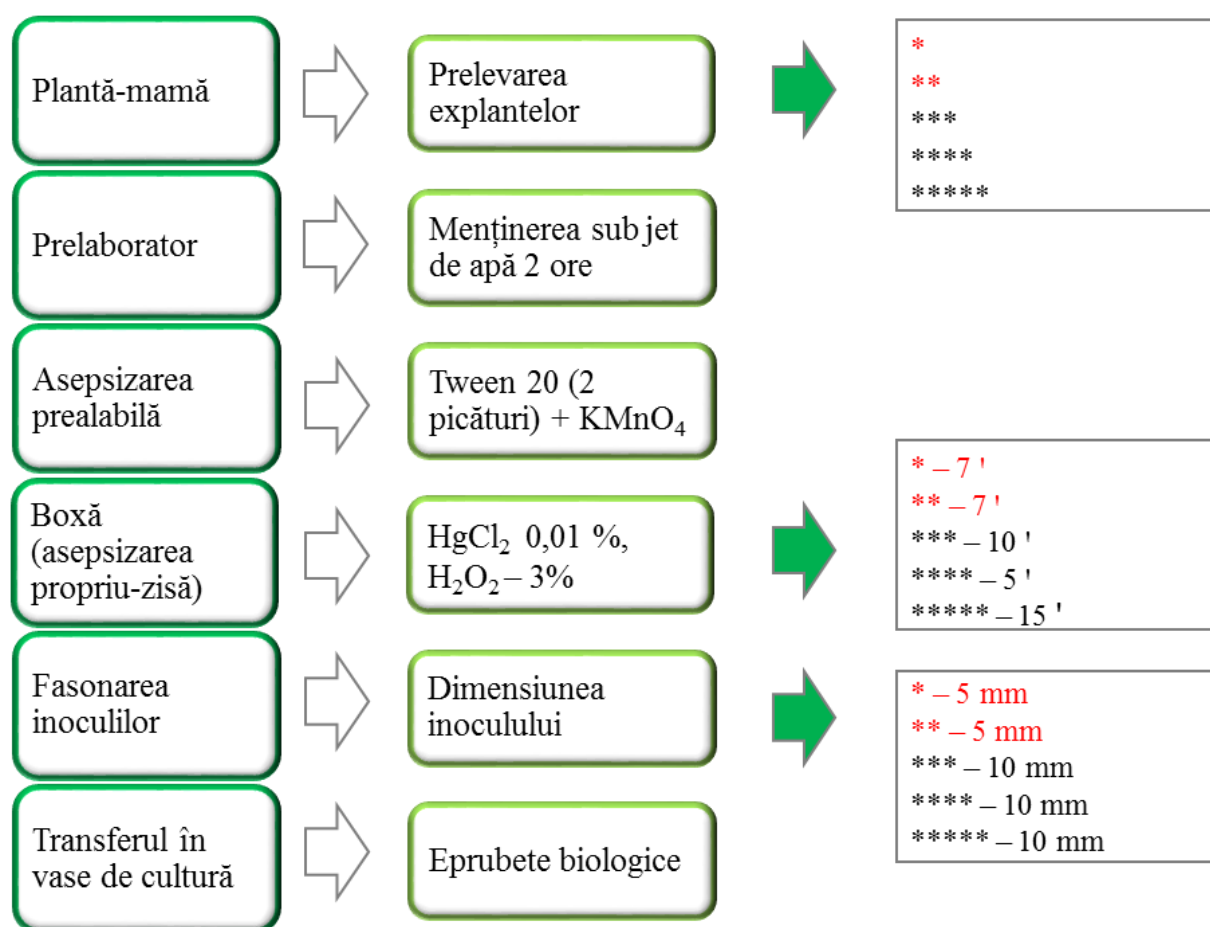


Fig. 3.1. Schema de prelevare și asepsizarea a explanților de mur

Notă: * – meristeme apicale cu primordii; ** – meristeme laterale cu primordii; **** – fragmente de limb foliar; *** – fragmente de lăstar (internod); ***** – fragmente de rădăcini;

Meristemele apicale și laterale ale lăstarilor se mențin în clorură mercurică de 0,1% – 7 minute, fragmentele de lăstar (internodul) – 10 minute, fragmentele de limb foliar – 5 minute, fragmentele de rădăcini – 15 minute.

După înlăturarea clorurii mercurice fragmentele plantei au fost clătite de 4 ori cu apă distilată autoclavată – pentru înlăturarea totală a acesteia. Pentru o dezinfectare mai eficace plantele au fost tratate cu H_2O_2 , apoi clătite încă o dată cu apă distilată autoclavată. Urmează fasonarea inoculilor de dimensiuni – 5 mm pentru meristeme apicale și laterale cu primordii, care se efectuează foarte atent și cu mișcări precise pentru a reduce la minim deteriorarea suprafețelor.

Testarea reagenților chimici. Pentru a eficientiza aseptizarea materialului biologic au fost testați mai mulți agenți sterilizanți: hipocloritul de sodiu, alcoolul etilic, clorura de mercuriu (Tabel 3.1).

Tabelul 3.1.
Agenți sterilizanți utilizați la aseptizarea materialului biologic

Nr. d/o	Reagentul	Concentrații utilizate, (%)	Durata sterilizării, (minute)	Viabilitatea plantulelor, (%)
1.	Hipocloritul de sodiu	20	30	2
2.	Hipocloritul de sodiu	50	20	5
3.	Alcoolul etilic	70	10	0
4.	Clorura de mercuriu	0,1	5	30
5.	Clorura de mercuriu	0,1	7	75
6.	Clorura de mercuriu	0,1	15	30
7.	Peroxid de hidrogen	3	1	75

Cea mai eficientă s-a dovedit a fi clorura de mercuriu cu o rată de viabilitate a plantulelor 75%. Utilizarea clorurii de mercuriu (0,1%) în calitate de reagent aseptice, timp de expunere de 7 minute, pentru meristeme apicale și laterale, 10 minute pentru fragmente de lăstar, 5 minute pentru fragmente de frunză și 15 minute pentru fragmente de rădăcini, succedată de 3 clătiri cu apă autoclavată și soluție de 3% de peroxid de hidrogen (H_2O_2), pentru soiurile ‘Arapaho’, ‘Loch Ness’, ‘Triple Crown’, ‘Thornless Evergreen’, ‘Chester’, ‘Thornfree’, ‘Polar’, ‘Reuben’ s-au dovedit a fi optime (Figura 3.2.).

După sterilizare toate explantele au fost inoculate pe medii nutritive, timp de 7 zile vasele cu fitoinoculi au fost menținute în camera de cultivare. Toate experiențele au fost în camera de creștere cu același regim a factorilor fizici.

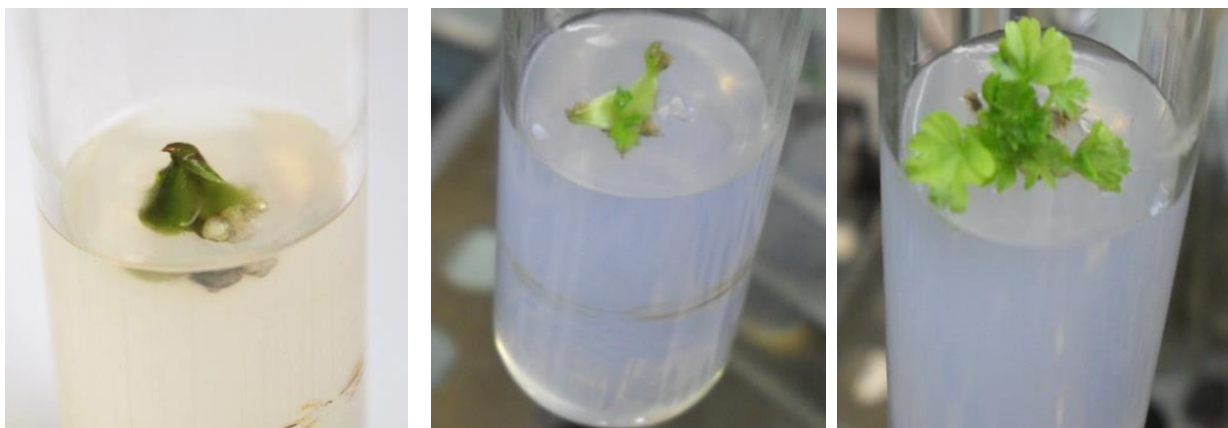


Fig. 3.2. Meristem cu primordii inoculat *in vitro*, soiul ‘Loch Ness’.

Factorii fizici. Camera de cultivare este destinată păstrării condițiilor optime a vitroculturilor pentru a le asigura o dezvoltare bună. La alegerea temperaturii optime, ca de altfel, optimizarea și a celorlalți factori exogeni, care contribuie la realizarea proceselor de multiplicare, creștere și diferențiere, s-a ținut cont de condițiile ecologice la care este adaptată această cultură în condiții naturale. Caracteristicile factorilor fizici din camera de creștere sunt:

- temperatura: $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$;
- regimul de iluminare: iluminarea s-a făcut cu lumina fluorescentă albă având o intensitate de 2000 lucși;
- fotoperioada: 16 ore lumină și 8 ore obscuritate,
- umiditatea aerului – 70% .

Mediul nutritiv. Cercetările ce țin de selectarea unor medii nutritive optime destinate inoculării murului, balansate după componența în macro- și microelemente cu scopul de a obține regenerarea inoculilor este actuală. Pentru identificarea unui mediu nutritiv optim au fost studiate particularitățile de regenerare a inoculilor pe diferite medii nutritive. S-au testat mai multe variante a mediului nutritiv de bază MS, suplinit cu diferite combinații și doze a regulatorilor de creștere:

- 1) MS lipsit de regulatori
- 2) MS+IAA 0,1 mg/l
- 3) MS+NAA 0,1 mg/l
- 4) MS+BAP (0,1; 0,3; 0,5 mg/l)

Mediul cel mai favorabil și eficient utilizat ulterior în experiențele biotehnologice a fost MS suplinit cu BAP 0,5 mg/l (Tabelul 3.2.), care asigură o rată mare de regenerare a inoculilor.

Tabelul 3.2.
Mediu nutritiv MS modificat pentru inițierea culturilor *in vitro*

Nr. d/o	Componentul	Cantitatea (mg/l)
1.	Mio-inositol	50,0
2.	Glicina	2,0
3.	BAP	0,5
4.	Acid ascorbic	10,0
5.	Zaharoză	30 000
6.	Agar	5000
Valoarea pH 5,8		

Inocularea. Explantele de diferite dimensiuni au fost inoculate în condiții aseptice pe medii nutritive proaspăt pregătite. Pasajele s-au realizat la intervale de 3-6 săptămâni în dependență de inocul și compoziția mediului nutritiv. Toate pasajele s-au efectuat pe medii nutritive proaspăt pregătite în condiții aseptice.

Inocularea s-a efectuat în două etape:

- fasonarea explantelor în condiții aseptice utilizând instrumente sterile;
- plasarea orizontală a explantelor pe suprafața mediului de cultură.

Dimensiunile fitoinoculilor de circa 5 mm pentru meristeme cu primordii și de 10 mm pentru fragmente de lăstar, fragmente de frunză, fragmente de rădăcină au fost secționare de la vârful de creștere a plantei, unde țesuturile sunt tinere și sunt în plină dezvoltare, având un potențial sporit de regenerare (Figura 3.3.), fragmentele de explant au fost izolate din apexuri fiind respectate cerințele de păstrare a țesuturilor vii de 5-7 mm.

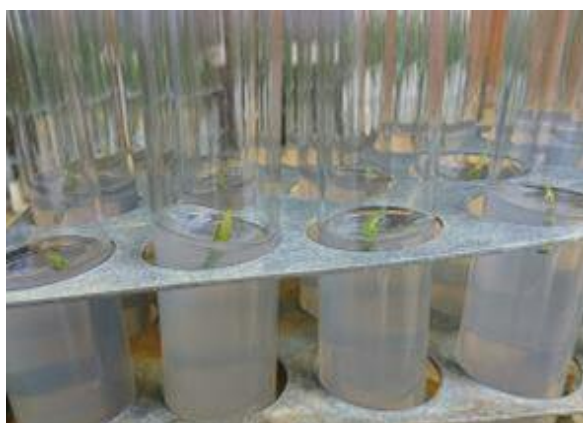


Fig. 3.3. Explante de mur inoculate *in vitro*.

Au fost inoculate pe mediile de cultură 36 fitoinoculi, pentru fiecare soi în parte și efectuată în trei repetări. Pentru inoculare s-au selectat mai întâi meristemele apicale și laterale de 5-10 mm,

s-au utilizat meristemele, țesuturile tinere cu primordii. Subcultivările sau efectuat cu periodicitatea de 30 zile.

Observațiile asupra experimentelor biotehnologice și rezultatele evaluării denotă că pentru soiurile ‘Arapaho’, ‘Triple Crown’, ‘Loch Ness’, ‘Reuben’ este specifică generarea procesului caulogen la a 25-a zi de la inoculare, la celelalte soiuri, generarea plantulei decurge mai anevoios, până la 30 zile.

Cea mai mare rată de regenerare au avut soiurile ‘Reuben’ – 88,9%, și ‘Chester’ 83,3%. Soiul ‘Loch Ness’ a prezentat 80,6% de plantule regenerare din meristem, iar soiurile ‘Black Satin’ și ‘Arapaho’ cu 77,8%, soiul ‘Triple Crown’ a demonstrat o regenerare de 72,2% plantule din totalul de inoculi, soiul ‘Polar’ și ‘Smoothstem’ – 66,7%. Cel mai scăzut proces de regenerare l-a avut soiul ‘Thornfree’ 61,0%, comparativ cu celelalte soiuri (Tabelul 3.3.).

Tabelul 3.3.
Caulogeneza la soiurile de mur

Nr. d/o	Soiul	Nr. de inoculi	Nr. de plantule formate	Rata de formare a plantulelor (%)	Durata caulogenezei (zile)
1.	‘Arapaho’	36	28	77,8	25
2.	‘Triple Crown’	36	26	72,2	25
3.	‘Loch Ness’	36	29	80,6	25
4.	‘Polar’	36	24	66,7	30
5.	‘Black Satin’	36	28	77,8	30
6.	‘Th. Evergreen’	36	20	55,6	30
7.	‘Reuben’	36	32	88,9	25
8.	‘Chester’	36	30	83,33	25
9.	‘Thornfree’	36	22	61,0	30
10.	‘Smothstem’	36	24	66,7	30

În urma cercetărilor efectuate privind inițierea culturilor avirolice de mur am stabilit că cea mai prielnică perioadă de colectare a fragmentelor de lăstari este în lunile aprilie-mai, utilizând drept sursă de material meristeme cu primordii ale lăstarilor apicali și laterali, care au avut potențial regenerant eficient. Fragmentele de lăstar (internod) au necrotizat din cauza prezenței sporite a substanțelor fenolice. Fragmentele de limb foliar au crescut în dimensiuni mai, apoi a necrotizat, iar fragmentele de rădăcini nu au avut răspuns morfogenetic pozitiv.

Cel mai eficace sterilizant s-a dovedit a fi clorura mercurică de 0,1%, cu o durată de expunere de 7 minute. Dimensiunea optimă a inoculelor este de circa 5 mm. Mediul nutritiv optim selectat după MS a fost suplinit cu 10 mg/l de acid ascorbic și regulator de creștere BAP (0,5 mg/l).

3.2. Morfogeneză *in vitro* la soiurile de mur

Morfogeneza *in vitro* este un proces morfoanatomic și fiziologic complex asociat cu fenomenul de diferențiere, din care rezultă constituirea unui organism integrat [2, 3, 109].

La plante masa calusală, reprezintă o formațiune din celule proliferative, cu caracteristici speciale în raport cu alte tipuri de țesuturi vegetale, ele se divid activ și nu se diferențiază decât dacă în celulele lor se formează o anumită balanță hormonală, care este capabilă să influențeze declanșarea proceselor de organogeneză [7, 23]. Calusul poate avea origine diversă, după cauzele care au condus la generarea acestuia [7, 13]. În natură formarea calusului are loc la nivelul zonelor rănite, el exercitând un rol protector, de cicatrizare [7]. În regim de vitrocultură, masă calusală poate fi obținută din oricare celulă vie [1, 7]. Calusogeneza poate fi realizată din material vegetal de proveniență variată: fragmente de frunze, tulpini, muguri, cotiledoane etc. Citochininele BAP și TDZ sunt deseori utilizate de către mulți cercetători pentru inducerea regenerării adventive la diferite genotipuri de mur [3, 6, 121]. Rezultatele cercetării lor au dat răspuns pozitiv obținând regenerare din frunze pe medii suplinate cu TDZ solitar sau TDZ combinat cu AIB (0,1; 1,0; 2,0 mg/l) și ANA (0,1 mg/l). Cel mai mare procent de regenerare obținut pe TDZ necombinat a fost 41,66% [109, 120, 121, 134, 163].

În scopul optimizării mediilor, necesare pentru inducerea proceselor morfogenice, diferite explante colectate de la plantule multiplicare biotehnologic: meristem apical, fragmente de lăstari, fragmente de limb foliar, au fost inoculate pe medii cu diferite doze de regulatori de creștere. Pentru a observa influența mediului și a regulatorilor de creștere asupra inițierii și dezvoltării calusului au fost testate mai multe variante de medii suplinate cu regulatori de creștere (Tabel 3.4). Grație acestor medii s-a declanșat procesul de formare a calusului și de regenerare din el a plantulelor. Experiențele efectuate în cultura *in vitro* asupra soiurilor de mur au avut ca scop identificarea materialului necesar și a condițiilor optime de inițiere a masei calusale inducerea organogenezei *in vitro* și obținerea culturilor omogene, avirolice de mur.

Au fost testate diferite tipuri de explante colectate de la vitroculturile de mur, utilizate în calitate de material biologic de inițiere și la fel testate mediile de cultură cu diferită compoziție. Cel mai eficient rezultat s-a constatat la explantele din frunză. Din acest considerent cercetările s-au axat pe explantele de limb foliar, colectate de la plantule din cultura *in vitro*. Plantele de la care s-au excizat frunzele au fost cultivate pe mediul MS modificat 50% + 25g zahăr alimentară, pH 5,8, pe care au crescut în cultura *in vitro* timp de 30 zile. Frunzele donatoare de explant s-au excizat din partea mediană a vitroculturii.

Tabelul 3.4.

Mediul nutritiv MS suplinut cu diferite doze de regulatori de creștere pentru inducerea calusogenezei și organogenezei, testate la soiurile de mur

Nr. d/o.	Nr. mediului	Nr. de plantule testate	Regulatori de creștere				Zaharoză (g/l)	Valoarea pH
			Citochinine	doza (mg/l)	Auxine	doza (mg/l)		
1.	Nr. 1	36	BAP	2,0	-	-	25	6,0
2.	Nr. 2	36	BAP	1,5	-	-	25	6,0
3.	Nr. 3	36	BAP	1,0	-	-	25	6,0
4.	Nr. 4	36	BAP	1,0	ANA	0,2	25	6,0
5.	Nr. 5	36	BAP	1,0	ANA	0,5	25	6,0
6.	Nr. 6	36	BAP	1,0	AIA	0,2	25	6,0
7.	Nr. 7	36	BAP	1,0	AIA	0,5	25	6,0
8.	Nr. 8	36	BAP	1,0	AIA	1,0	25	6,0
9.	Nr.9	36	KIN	1,0	ANA	1,0	25	6,0
10.	Nr.10	36	KIN	1,0	-	-	25	6,0
11.	Nr.11	36	KIN	1,5	-	-	25	6,0
12.	Nr.12	36	KIN	1,0	ANA	0,1	25	6,0
13.	Nr.13	36	-	-	2,4-D	0,5	25	6,0
14.	Nr.14	18	-	-	2,4-D	0,75	25	6,0
15.	Nr.15	18	-	-	2,4-D	1,0	25	6,0

Ulterior, s-au fragmentat în formă de triunghi, s-au inoculat pe medii nutritive, ușor încorporate în acesta, astfel ca partea abaxială și cele laterale ale limbului să fie în contact cu mediul nutritiv. Experimentul a fost efectuat în 3 repetări, la 10 soiuri de mur ('Arapaho', 'Triple Crown', 'Loch Ness', 'Polar', 'Black Satin', 'Reuben', 'Chester', 'Thornfree', 'Smoothstem', 'Thornless Evergreen') pe perioada lunilor aprilie-mai, a câte 36 probe la fiecare soi. Mediile nutritive pentru calusogeneză și organogeneză s-au preparat conform metodelor de specialitate [1, 4, 5]. Mediul nutritiv pentru inocularea fragmentelor de limb foliar a fost MS 100% modificat, cu 5 g/l agar, 25 g/l zaharoză, pH 6,0, și cu regulatori de creștere (Tabelul 3.4.) BAP (2,0 mg/l; 1,50 mg/l; 1,0 mg/l); BAP 1,0 mg/l+ANA (0,2 mg/l; 0,5 mg/l; 1,0 mg/l); BAP 1,0 mg/l+AIA (0,2 mg/l; 0,5 mg/l; 1,0 mg/l); KIN (1,50 mg/l; 1,0 mg/l); KIN 1,0 mg/l+ANA 0,1 mg/l; 2,4-D (0,5 mg/l; 0,75 mg/l; 1,0 mg/l).

Pentru menținerea culturilor calusale a soiurilor cercetate, în cultura *in vitro*, s-au respectat condițiile necesare: temperatura 23±2°C, fotoperiodismul de 16/8 ore obscuritate ore lumină și umiditatea aerului în încăpere de 70%.

S-au testat anumite medii pentru inducerea calusogenezei și organogenezei la plantulele de mur. Pentru cultivarea *in vitro* au fost utilizate mediile nutritive de bază, auxine, citochinine [124, 109]. Deja după 5 zile de la inoculare s-a constatat inițierea și dezvoltarea proeminențelor de celule calusale pe toate mediile de cultură.

Organogeneza

Perioada de calusogeneză și a fazelor componente corelează cu specificul țesutului și apartenența sistematică a speciei antrenate în cultura *in vitro*. Prin experimentare am urmărit scopul de a determina durata perioadei de calusogeneză și organogeneză la frunzele vitroculturilor de mur.

Pe mediile suplimentate cu BAP – 2,0 mg/l procesul organogen se inițiază după 30 de zile de la inocularea fragmentelor de limb foliar pe medii (Figura 3.5). Pentru o dezvoltare mai eficace a fost testat mediu MS suplinut cu regulatori de creștere pentru inițierea organogenezei. Mediul nutritiv Nr. 1 care a provocat calus morfogen, suplinut cu BAP (2,0 mg/l), a indus procesul de morfogeneză cu o rată mult mai înaltă decât datele care depășesc considerabil datele din literatura de specialitate [109, 120, 121, 134, 157, 159, 163]. Explantele din fragmente de limb foliar cultivate pe mediul Nr.1 s-au gofrat și s-au mărit dimensiunile după 3-4 zile de la inoculare (Figura 3.5.).

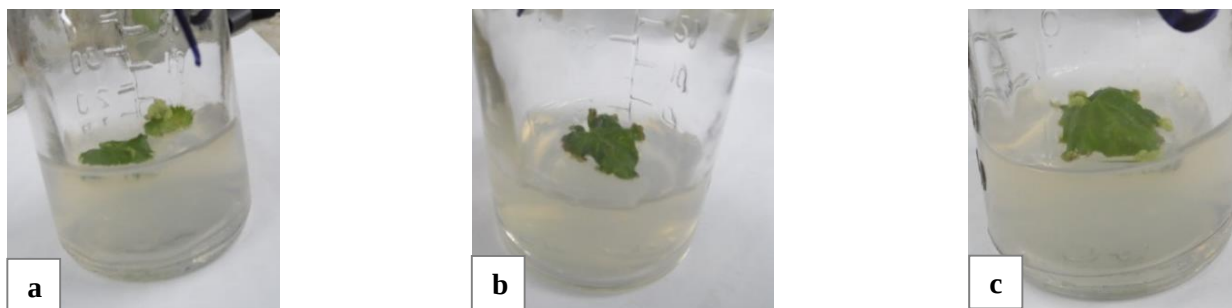


Fig. 3.5. Calus generat din limbul foliar la soiurile de mur.

Notă: a – ‘Polar’, b – ‘Triple Crown’, c – ‘Chester’

După 10-13 zile de la inoculare la periferia limbului apar proeminențe sferice de calus verde, unele de culoare verde-albicioasă. Conform datelor din literatura de specialitate [1, 151], calusul generat din fragmente de limb foliar poate avea diverse nuanțe de culoare verde ce corelează cu conținutul de pigmenți clorofilieni: verde intens, verde-albicios, verde-gălbui.

S-a constatat, că centrele morfogene se află la suprafața calusului, iar la periferie sunt protejate de celulele parenchimatice ale calusului care au pereții mai îngroșați. Calusul morfogen generat pe mediul Nr. 1 este optic dens și compact (Figura 3.5). După câteva zile calusul de culoare verde-intens, verde-albicios, verde cu nuanțe gălbui dezvoltă zone cu centre meristematice

embriogene, iar după 8 zile de diferențiere, pe calus se începe formarea meristemoizilor. Plantulele pe fragment de limb foliar se formează după 30 de zile de la inoculare.

Soiului ‘Loch Ness’ îi este specifică declanșarea formațiunilor calusare de culoare verde-albicioasă și verde-gălbui. Fragmentele de limb foliar, care mai apoi se extind în dimensiuni, formează proeminențe de calus de formă și mărime diferită, dispuse la periferia limbului, și pe toată suprafața dispers (Figura 3.6).

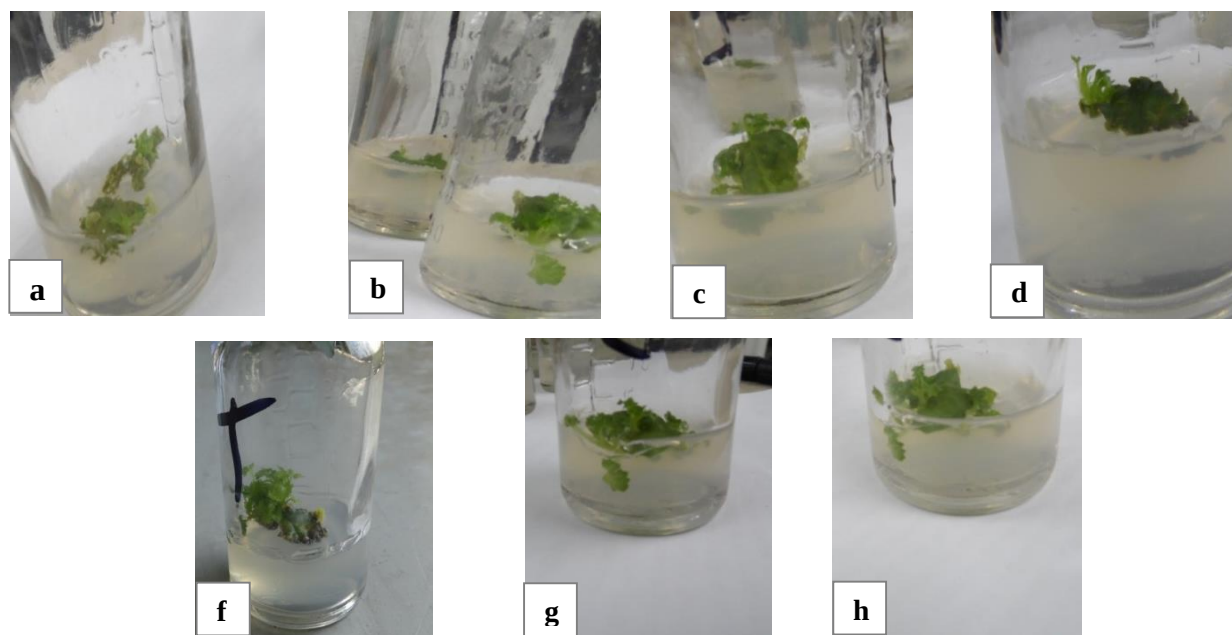


Fig. 3.6. Distribuția meristemoizilor pe limb foliar la diferite soiuri.

Notă: **a** – ‘Loch Ness’, **b** – ‘Polar’, **c** – ‘Arapaho’, **d** – ‘Smoothstem’, **e** – ‘Chester’,
f – ‘Thornfree’, **g** – ‘Triple Crown’

Distribuția meristemoizilor pe limb foliar poate fi clasificată în câteva grupuri și corelează cu soiurile de mur testate:

- **dispers pe suprafața limbului la soiurile:** ‘Loch Ness’ (Figura 3.6. a), ‘Arapaho’ (Figura 3.6. c), ‘Triple Crown’ (Figura 3.6. g);
- **la baza limbului la soiurile:** ‘Polar’, ‘Thornfree’, ‘Triple Crown’, ‘Thornless Evergreen’ (Figura 3.6. b, f);
- **în jurul limbului la soiurile:** ‘Chester’ (Figura 3.6. b), ‘Reuben’;
- **la baza limbului și pe nervuri la soiurile:** ‘Smoothstem’, ‘Triple Crown’, ‘Thornless Evergreen’ (Figura 3.6. d, g).

Rezultatele cercetărilor, efectuate asupra calusului morfogen, inițiat din fragmente de limb foliar au arătat că, din masa calusală derivă meristemoizi din care se dezvoltă tulpina și frunza. Pentru o dezvoltare completă a plantulei meristemoidul derivat este inoculat pe mediu nutritiv proaspăt pregătit MS modificat [111].

Mediile, selectate pentru cultura de calus au capacitatea regenerativă, fapt demonstrat de apariția primordiilor foliare. Dezvoltarea mai viguroasă a centrelor morfogene depinde de anumiți factori: durata perioadei de cultivare a calusului, anumiți regulatori de creștere, sezon, stadiul de dezvoltare al plantei, partea plantei cercetate, precum și de factorii externi ca: temperatura, lumina etc. [10].

Printre soiurile cercetate se evidențiază soiul ‘Chester’ cu un număr de circa 10,02 plantule formate pe fragmentul de limb (Tabelul 3.5).

Soiul ‘Black Satin’ a generat 9,4 plantule pe explantul de limb foliar. Soiurile ‘Triple Crown’ și ‘Smoothstem’ au generat 8 plantule per explant. Cu 7,5 plantule generate s-au evidențiat fragmentele de limb ale soiurilor ‘Thornless Evergreen’ și ‘Arapaho’, iar cu 6,5 plantule generate — soiul ‘Loch Ness’. Un număr mai redus de plantule au generat soiurile ‘Polar’ și ‘Reuben’ 6,2 și 6,3 explanți per limb (Tabelul 3.5).

Tabelul 3.5.
Organogeneza *in vitro* pe fragmente de limb foliar la diferite soiuri de mur

Nr. d/o	Nr. mediului	Soiul	Rata de calusare (%)	Nr. de plantule formate dintr-un fragment de limb foliar			Deviația standard	Nr. de probe testate
				Media	max	min		
1.	Nr.1	‘Arapaho’	85,12	7,5±0,50	9	5	1,58	36
2.	Nr.1	‘Triple Crown’	75,92	8,0±0,59	10	6	1,88	36
3.	Nr.1	‘Loch Ness’	77,77	6,5±0,45	8	4	1,43	36
4.	Nr.1	‘Polar’	77,77	6,2±0,55	9	4	1,75	36
5.	Nr.1	‘Black Satin’	75,92	9,4±0,40	12	8	1,26	36
6.	Nr.1	‘Thornless Evergreen’	66,66	7,5±0,71	14	4	2,27	36
7.	Nr.1	‘Reuben’	40,67	6,3±0,39	9	4	1,25	36
8.	Nr.1	‘Chester’	85,18	10,0±0,69	13	7	2,20	36
9.	Nr.1	‘Thornfree’	77,77	7,8±0,32	9	6	1,03	36
10.	Nr1	‘Smoothstem’	81,48	8±0,54	9	4	1,71	36

Pe mediul Nr. 1 au fost testate câte 36 de probe de fragmente de limb foliar pentru fiecare soi (Figura 3.7.). S-a determinat că din cele 36 de probe expuse în 3 repetări, 30,66 au generat calus morfogen ceea ce constituie 85,5%. Soiul ‘Smoothstem’ a generat în mediu 29,3 probe cu masă calusală, ceea ce constituie 81,48%. Soiurile de mur ‘Thornfree’, ‘Polar’, ‘Loch Ness’ au format 27,99 probe cu calus regenerant din 36 ceea ce constituie 77,77%. Ușor cedează soiurile ‘Triple Crown’ și ‘Black Satin’ cu un procentaj de formare a calusului de 75,92%. Fragmentele de

limb foliar ale soiului 'Thornless Evergreen' au generat 66% ceea ce constituie 23,7 probe cu calus din 36 probe experimentate.

Observațiile arată, că și pe alte medii nutritive s-a menționat calusogeneza din limbul foliar. Este cert faptul că, gradul de dezvoltare este diferit, precum și caracteristicile calusului variază (consistența, culoarea, structura, aspectul). Calusul dezvoltat din limb foliar pe mediile Nr. 2-15 variază ca formă, culoare, consistență. În dependență de tipul regulatorului de creștere, precum și doza cu care mediul nutritiv a fost suplimentat. Inocularea limbului foliar pe medii MS 100%, cu adaos BAP (1,0 mg/l) și BAP (1,5 mg/l) după 11 zile de la plasarea pe mediile cercetate, fragmentele de limb foliar au devenit gofrate și s-au extins în dimensiuni, observându-se o diferențiere a calusului de culoare alb-verzuie, translucid și cu o consistență mai laxă. Celulele acestui calus sunt mari și vacuolizate. Acest calus n-a generat meristemoizi și a fost calificat ca non-morfogen (Figura 3.8 c).

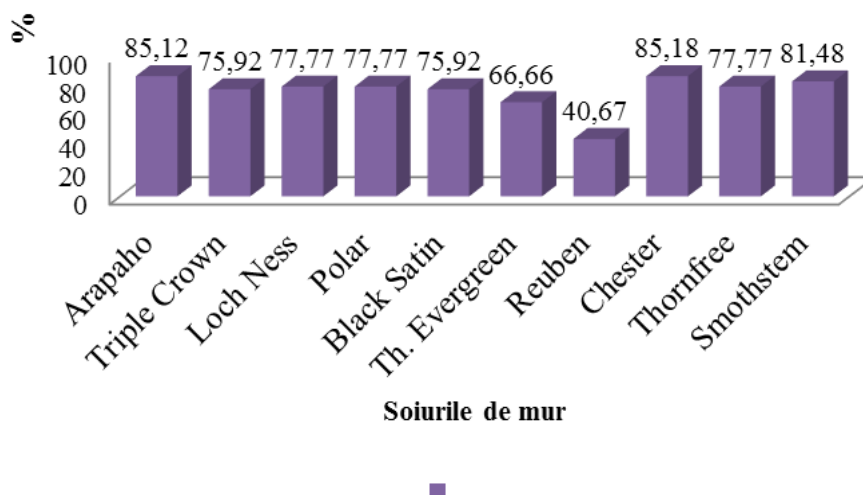


Fig. 3.7. Rata de calusare a inoculilor foliari de la diferite soiuri de mur pe mediul Nr.1.

Pe mediile suplimentate cu citochinina BAP în combinații cu auxine calusul derivat este albicios, unele conglomerate de celule fiind de culoare alb-lăptoasă, consistența friabilă, în totalitate non-morfogen, iar după 35-40 zile necrotizează (Figura 3.8).

Mediile suplinite cu 2,4-D în diferite concentrații (0,5; 0,75; 1,0 mg/l) prezintă un efect inhibitor non-regenerant, ceea ce și confirmă datele din literatura de specialitate [3, 9]. Pe mediile suplinite cu citochinina KIN (Nr. 9-12) explantele foliare inoculate n-au dat răspuns morfogen pozitiv. Un număr redus de probe, după 35-40 zile, produc masă calusară de culoare alb-verzuie și galben-brun cu consistență preponderent friabilă și non-morfogenă (Figura 3.8).

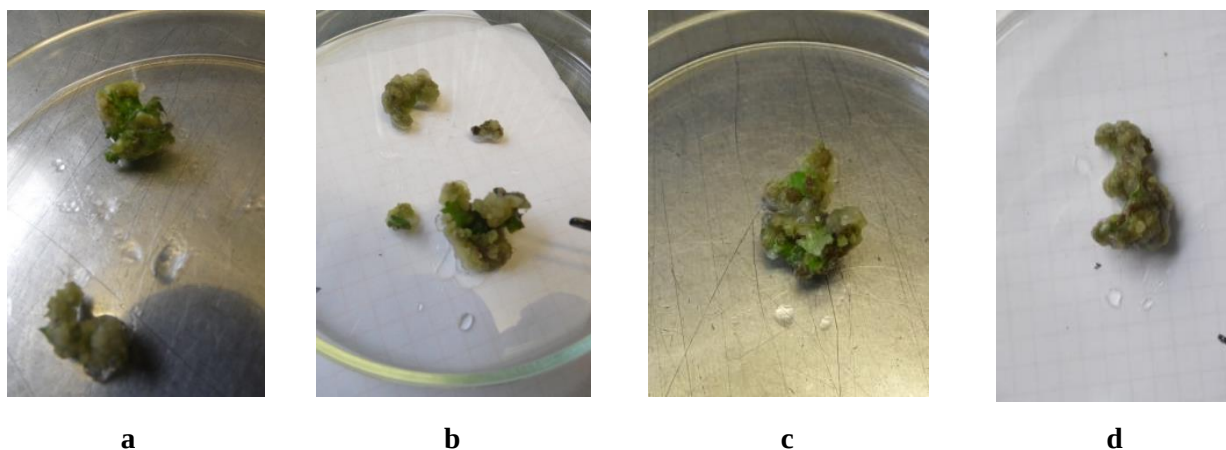


Fig. 3.8. Dezvoltarea calusului din fragmente de limb foliar pe medii suplimentate cu regulatori de creștere

Notă: **a** – mediu cu adaos de BAP (1,0 mg/l; 1,5 mg/l); **b** – mediu cu adaos de BAP – 1,0 mg/l + AIA 0,5 mg/l; **c** – mediu cu adaos de BAP 1,0 mg/l + ANA 0,5 mg/l; **d** – mediu cu adaos de BAP – 1,0 mg/l + ANA 1,0 mg/l

În rezultatul cercetărilor efectuate asupra calusogenezei pe 15 variante nutriționale mediul de bază MS (Tabelul 3.4.) s-a constatat că, pe toate mediile s-a format masă calusară, însă nu în toate cazurile calusul a fost morfogen. Doar pe mediul Nr. 1 calusul este organogen. Regulatorul de creștere cu cele mai bune rezultate în inducerea calusului a fost BAP (1,0; 1,5; 20 mg/l). Alt regulator, care a generat calus a fost 2,4-D (1,0 mg/l) în combinație cu KIN (1,0 mg/l) (Figura 3.9.).

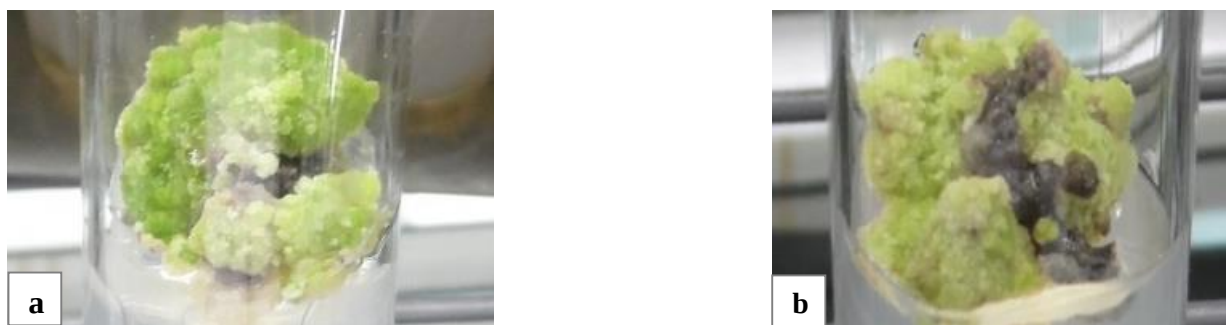


Fig. 3.9. Masă calusală non-morfogenă pe mediul nutritiv MS.

Notă: **a** – suplimentat cu 2,4-D; **b** – suplimentat cu Kin

Plantulele obținute din masă calusală, pe mediul Nr. 1 (Figura 3.9. a), sunt sănătoase, robuste, viguroase, nu se contaminatează în cultura *in vitro* după pasări ulterioare și nici la transfer *ex vitro* [111]. Timp de 7 zile formează un sistem radicular bine dezvoltat, tulpină din câteva internoduri. Dezvoltarea acestor plantule depășește cu 50% creșterea și formarea rizogenezei, comparativ cu plantele obținute tradițional din meristeme prin micropropagare (Figura 3.10.).

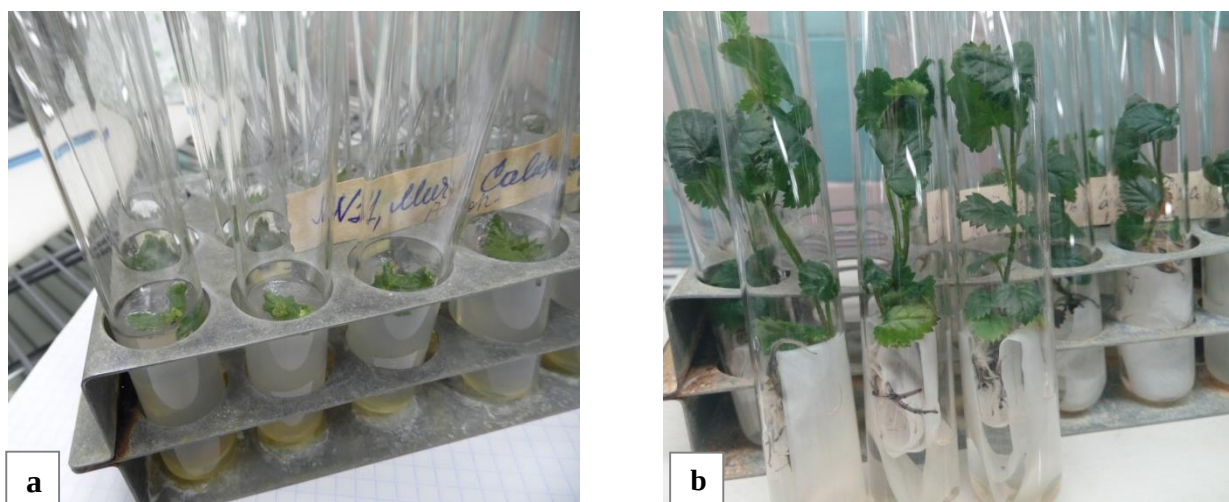


Fig. 3.10. **a** – Dezvoltarea calusului pe mediul Nr. 1; **b** – Plante obținute din masa calusală a limbului foliar ('Smoothstem')

Aceste date confirmă faptul că, plantule inițiate din masă calusară sunt avirotice și au un potențial mai mare de creștere și dezvoltare la primele pasări, comparativ cu plantulele obținute din țesut meristematic (Figura A. 4.1.). În urma studiului s-a constatat că, formarea meristemoizilor pe suprafața calusului este un proces de durată limitată (Figura 3.11.).

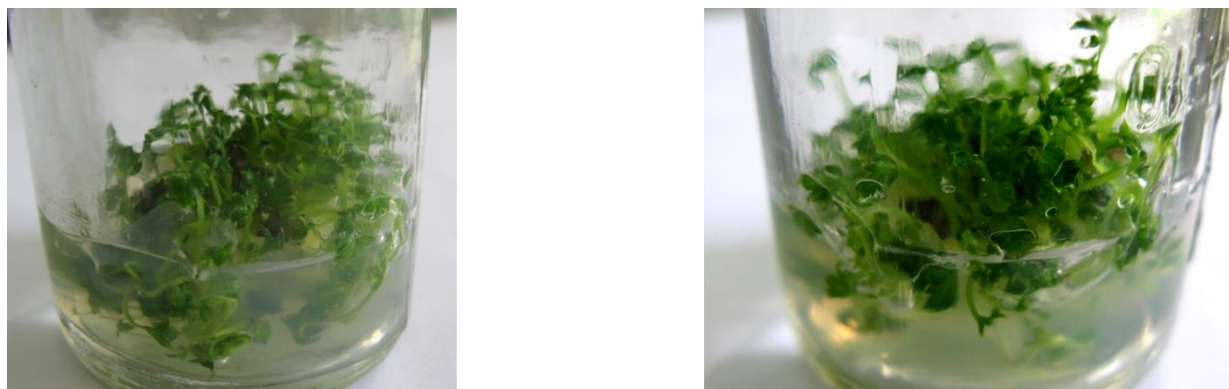


Fig. 3.11. Plantule ale soiului 'Thornless Evergreen' obținute din masă calusară, ulterior microclonate.

Este cert faptul că, formarea minilăstarilor din calus are loc până la un moment dat, după care, dacă nu sunt transferați pe alt mediu nutritiv proaspăt pentru dezvoltarea în continuare (micropropagare sau microclonare), ei necrozează.

În rezultatul cercetărilor s-a observat: meristemoizii generați din limbul foliar își pot pierde din viabilitate, după 2-3 săptămâni dacă nu sunt transferați pe un mediu nutritiv (MS modificat+BAP 0,5 mg/l) – calusul devine alb și fragil, iar meristemoizii capătă o culoare brună-închisă, și ulterior necrozează.

3.3. Micropropagarea și multiplicarea *in vitro*

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

Înmulțirea *in vitro* a plantelor poartă denumirea de micropropagare sau microînmulțire, fiind o formă de multiplicare vegetativă, care asigură obținerea unui randament superior, în comparație cu alte procedee tradiționale practicate până în prezent [3, 7, 59].

Pentru multiplicarea *in vitro* sunt utilizate trei căi diferite: a) embriogeneza somatică; b) formarea lăstarilor adventivi; c) lăstărirea axilară multiplă.

a) Embrionii somatici, identici cu cei zigotici, se pot forma direct pe explant sau, mai frecvent, în masă calusală sau în suspensii celulare.

b) Lăstarii adventivi *in vitro* se formează pe alte țesuturi decât *in vivo*. Mai precis, în asemenea condiții lăstarii pot fi obținuți direct pe explant prin *organogeneză directă*, sau în calusul derivat din explantul primar, prin *organogeneză indirectă*.

c) Lăstărirea adventivă multiplă se produce la nivelul vârfurilor tulpinii sau al mugurilor laterali. De obicei, procesul de calusare este limitat iar proliferarea lăstarilor, odată începută, poate fi stimulată prin subcultivări succesive. Absența aproape totală a anomaliilor genetice constituie un avantaj major al multiplicării clonale pe această cale [120].

În favoarea multiplicării vegetative *in vitro* pledează în mod foarte convingător trei aspecte principale: faptul că este o metodă de înmulțire, caracterizată printr-o excepțională productivitate; posibilitatea de a obține plante libere de maladii; faptul că permite readucerea și menținerea materialului vegetal în stadiul juvenil. Aceste aspecte marchează superioritatea netă a micropropagării comparativ cu metodele clasice de înmulțire vegetativă (butășire, altoire etc.), care necesită obținerea prealabilă de plante-mamă, sursă de butași sau altoi. Ori, acest proces este frecvent îndelungat (câteva luni în horticultură, mai mulți ani în cazul plantelor lemnoase), iar întreținerea plantei-mamă este costisitoare. Mai mult, fragmentele prelevate de pe asemenea surse sunt mai mult sau mai puțin adulte, ceea ce face uneori ca evoluția către plante întregi, cu rădăcini și tulpini, să fie dificilă și mai mult sau mai puțin contaminate de diferiți agenți patogeni [52, 74].

Micropropagarea aplicată la mur a fost studiată de diferiți cercetători în diferite școli biotehnologice [18, 86, 89, 91, 120, 121, 137]. Cercetătorul Bobrowschi și colaboratorii în anul 1996 au testat diferite variante ale mediului MS cu 1,0 și 2,0 mg/l BAP. Prezența auxinelor ANA și AG₃ a inhibat proliferarea *in vitro*, la toate soiurile testate de ei. Variantele de mediu MS cu o concentrație de săruri redusă de 3 ori cu diferite concentrații de AIB (0,3; 0,5 și 0,8 mg/l) a

provocat 100% procesul de rizogeneză [66]. Un alt grup de cercetători din România [89, 91] au experimentat culturile de mur, cu concentrații diferite de BAP (0,45; 0,90; 1,35; 1,80; și 2,25 mg/l) și AIB (0,1 și 0,2 mg/l). Cel mai bun rezultat a fost pe mediul suplinit cu 0,45 mg/l BAP, fără AIB, ultimul având un efect inhibitor, mai ales la concentrația de 0,5 μ M, 6,8 μ M BAP.

Pentru inițierea și dezvoltarea proceselor organogene ale plantei, în cultura *in vitro*, mai întâi, s-a efectuat selectarea și evidențierea cantității regulatorilor de creștere și a mediilor de cultură. Pentru dezvoltarea proceselor organogene a fost selectat mediul MS 100% modificat, care a fost suplinit cu regulatori de creștere. Este cunoscut că regulatorii de creștere, selectați pentru inițierea calusogenezei, au efecte pozitive asupra organogenezei. Totodată este important de menționat că, procesele regenerative sunt condiționate de un anumit raport de auxine-citochinine, citochinină-citochinină caracteristice pentru fiecare specie, soi de plante în parte [10]. Scopul și obiectivele urmărite în experiențele noastre au fost elaborarea mediilor de cultură favorabile pentru inițierea, creșterea și dezvoltarea culturii *in vitro* la soiurile luate în studiu. În acest scop au fost testate următoarele tipuri de medii nutritive: mediu pentru inițierea culturii (Tabelul 3.6.), mediu pentru micropropagare și multiplicare, și mediul pentru inițierea rizogenezei. Procesele de dezvoltare *in vitro* au fost dirijate în special de fitohormonii utilizați în mediu. În dependență de concentrația auxinelor și a citochininelor precum și de raportul dintre aceste categorii de hormoni a fost provocat tipul de morfogeneză [52-55].

Tabelul 3.6.
Mediu modificat pentru microclonarea, murului *in vitro* după MS

Nr. d/o	Componentul	Concentrația (mg/l)
1.	Mio-inositol	1,0
2.	Glicina	1,0
3.	Zaharoză	30000
4.	Agar	5000
5.	BAP	0,3; 0,5; 0,7
Valoarea pH		5,8

În experiențele noastre, inițial fost elaborate 35 de variante de medii de cultură, care au fost testate. În rezultatul observațiilor și analizelor experimentale au fost selectate 11 variante de medii de cultură optime și eficiente (Tabel 3.7.). Medii cu diferite concentrații de citochinine (0,3; 0,5; 0,7 mg/l); suplimentate cu auxine, medii combinate cu citochinine, auxine, gibereline. S-a luat în studiu și mediile MS 100% modificat și MS 50% (este înjumătățită cantitatea de vitamine, micro-, macroelemente) lipsite de regulatori de creștere. Pentru rizogeneza

micropropagulelor a fost testat mediul lichid MS în două variante experimentale: 100% și 50% (Tabel 3.7).

Tabelul 3.7.
Variantele de medii nutritive elaborate pentru stabilirea potențialului morfogenic
la soiurile de mur

Nr. d/o	Mediul nutritiv	MS (%)	Regulatorii de creștere (doze)				
			BAP (mg/l)	AIB (mg/l)	ANA (mg/l)	AIA (mg/l)	AG ₃ (mg/l)
1.	Nr. 1	100	0,3	0	0	0	0
2.	Nr. 2	100	0,5	0	0	0	0
3.	Nr. 3	100	0,7	0	0	0	0
4.	Nr. 4	100	0,3	0,2	0	0	0,1
5.	Nr. 5	100	0,3	0	0	0,2	0,1
6.	Nr. 6	100	0,3	0	0,2	0	0,1
7.	Nr. 7	100	0	0,2	0	0	0
8.	Nr. 8	100	0	0	0,2	0	0
9.	Nr. 9	100	0	0	0	0,2	0
10.	Nr. 10	100	0	0	0	0	0
11.	Nr. 11	50	0	0	0	0	0

Favorizarea procesului de organogeneză fie directă sau indirectă a avut loc în cazul conținutului scăzut de auxine, rizogeneza s-a obținut prin mărirea conținutului de auxine și micșorarea de citochinine. Pornind de la faptul menționat mai sus, au fost testate un șir de medii nutritive care se deosebeau după conținutul de micro-, macroelemente și raportul auxină/citochinină. Astfel, în dependență de scopul propus au fost utilizate următoarele medii: 1. Pentru inițierea culturii *in vitro* la soiurile aflate în studiu; 2. Medii pentru microclonare (proliferarea lăstarilor); 3) Medii pentru rizogeneză.

3.3.2. Influența regulatorilor de creștere asupra procesului de multiplicare

Au fost testate un șir de medii nutritive în scopul optimizării lor pentru declanșarea procesului de morfogeneză. Mediul de bază pentru inducerea morfogenetică este mediul MS, adăugat cu 30 g/l zaharoză, BAP 0,5 mg/l, agar 5 g/l și pH-ul 5,8. Pentru creștere și multiplicare eficientă s-a folosit MS cu adaos de regulatori de creștere.

Cele mai optime rezultate pentru multiplicare s-au obținut pe mediul MS de bază cu regulatorul de creștere BAP în diferite concentrații. La plasarea pe mediile de cultură adăugate cu BAP, se mărește considerabil inducerea mugurilor laterali pe axul plantulei, ceea ce favorizează

o lăstărire multiplă (Figura 3.12), care mai apoi servește drept sursă de material biologic pentru micropropagare și sporirea masei vegetative [26-31].

Toate soiurile de mur studiate au fost testate privind micropropagarea pe mediul de bază MS 100% cu adaos de regulatori de creștere BAP, AIB, ANA, AIA, AG₃ [112-117].

Pentru testarea potențialului de înrădăcinare la soiurile luate în studiu s-au folosit metodele:

1. înrădăcinarea în condiții aseptice pe medii nutritive, fără regulatori de creștere (Tabelul 3.7, Nr.10, Nr.11);
2. utilizarea mediului MS, suplimentat cu regulatori de creștere (Tabelul 3.7, mediul Nr. 4, Nr. 5, Nr. 6, Nr. 7, Nr. 8, Nr. 9).
3. în calitate de suport, pentru plantulele din eprubetă, explantele se amplasează pe punți din hârtie de filtru, astfel încât, partea bazală a tulpinii, să fie încorporată în soluție maxim 1,0 cm (Figura 3.12).

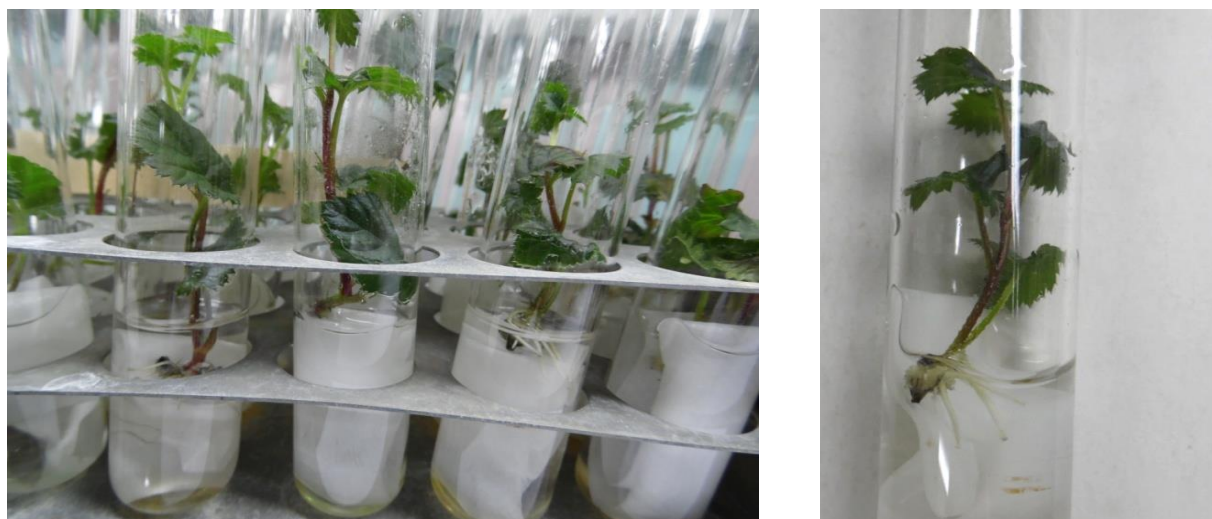


Fig. 3.12. Vitroplantule de mur pe suporturi de hârtie de filtru.

Pentru menținerea explantelor în cultura *in vitro* s-au creat condiții necesare pentru înrădăcinare, și anume: fotoperiodismul 16 ore lumină/8 ore obscuritate; temperatura aerului de 23±2°C și intensitatea luminii de 2500 lucși, umiditatea aerului 70%.

3.3.3. Microclonarea

Microclonarea este faza în care se urmărește dezvoltarea mugurilor laterali, adventivi și creșterea rapidă din ei a lăstarilor [2, 3]. În acest mod are loc sporirea gradului de multiplicare. Lăstarii de mur care ajung la dimensiuni de 2,0-2,5 cm, pot fi utilizați pentru:

- trecerea la faza de înrădăcinare;
- în calitate de sursă de explant pentru alte subculturi [54, 55].

Raportul dintre numărul de lăstari supuși multiplicării și cei obținuți la sfârșitul fazei poartă numele de coeficient de multiplicare sau rată de multiplicare. Rata de multiplicare este dependentă de o serie de factori.

Substratul de cultură. În Laboratorul de Biotehnologie și Embriologie s-au testat un șir de medii nutritive în scopul optimizării lor pentru declanșarea procesului de morfogeneză. Mediul de bază pentru inducerea morfogenică este mediul MS, suplimentat cu 30 g/l zahăr alimentară, 5 g/l de agar și pH 5,6-5,8.

Regulatori de creștere. Mediul MS modificat, lichid (lipsit de agar) cu adaos de regulatori de creștere, s-a dovedit a fi eficient în procesul de multiplicare la mur. Cele mai bune rezultate s-au obținut pe mediul MS cu citochinina BAP în concentrații de 0,3; 0,5; 0,7 mg/l [112-117]. S-au testat și cantități mai sporite de citochinină (0,9; 1,0 mg/l), dar ele provoacă creșteri neregulate ale lăstarului, cantitatea optimă dovedindu-se a fi 0,5 mg/l (Tabelul 3.7.). La plasarea pe mediile de cultură adiționate cu BAP, se mărește considerabil inducerea mugurilor laterali pe axul plantulei, ceea ce favorizează o lăstărire multiplă. Această lăstărire mai apoi servește drept sursă de material biologic pentru micropropagare și sporirea masei vegetative (Figura 3.13).

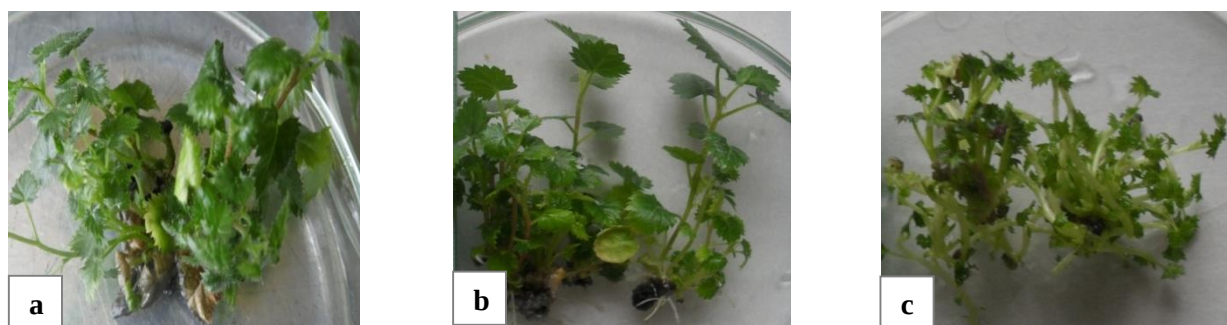


Fig. 3.13. Plantule de mur cultivate pe medii suplimentate cu diferite doze de BAP.

Notă: **a** – 0,3 mg/l; **b** – 0,5; mg/l; **c** – 0,7 mg/l)

Concomitent cu mărirea concentrației de BAP obținem un număr sporit de lăstari adventivi care atingând lungimea de 4-6 cm sunt supuși fragmentării și micropropagării ulterioare păstrându-și potențialul morfogenetic. Pe mediile cu adaos de BAP au fost micropropagate toate soiurile de plante. Rezultate eficiente s-au obținut la toate soiurile de mur, deosebirea constând doar în numărul de lăstari obținuți și vigurozitatea acestora. Cu cât numărul de explanți per eprubetă este mai mare, cu atât și vigurozitatea explantului este mai mică, din această cauză sau selectat pentru microclonare variantele optime de BAP – 0,3; 0,5; 0,7 mg/l. Pe mediul cu o concentrație diminuată de citochinine, adică de BAP (0,3 mg/l) numărul cel mai sporit de lăstari s-a evidențiat la soiul ‘Loch Ness’, cu 16 lăstari generați pe inocul (Figura 3.13. c). Soiurile ‘Triple Crown’ și

‘Polar’ proliferază pe acest mediu 15 lăstari per explant, fiind urmate de soiul ‘Smoothstem’ cu 14 lăstari generați. Soiurile ‘Chester’ și ‘Arapaho’ generează în mediu 14 lăstari pe mediul Nr. 1 cu BAP 0,3 mg/l (Tabelul 3.8.). Tot pe acest mediu soiurile ‘Thornless Evergreen’ și ‘Thornfree’ generează 12 lăstari per explant (Tabelul 3.8.). ‘Black Satin’ – 13 (Figura A 1.1.).

Tabelul 3.8.

Creșterea și dezvoltarea plantelor pe mediu MS cu diferite concentrații de BAP

Nr. d/o	Denumirea soiului	Concentrația BAP, (mg/l)	Durata de creștere (zile)	Nr. de lăstari (m±n)	Lungimea lăstarilor, cm (m±n)
1.	‘Arapaho’	0,3	55-60	13±0,19	7,5±0,19
		0,5		20±0,19	6,1±0,08
		0,7		26±0,09	3,5±0,08
2.	‘Triple Crown’	0,3	55-60	15±0,35	5,33±0,71
		0,5		21±0,35	4,2±0,33
		0,7		27±0,24	4,66±0,61
3.	‘Loch Ness’	0,3	55-60	16±0,15	9,7±1,49
		0,5		29±0,17	6,3±0,94
		0,7		34±0,14	4,8±1,31
4.	‘Polar’	0,3	55-60	15±0,16	8,0±0,15
		0,5		24±0,20	6,5±0,25
		0,7		29±0,17	4,5±0,37
5.	‘Black Satin’	0,3	55-60	13±0,23	8,33±0,15
		0,5		21±0,35	6,66±1,37
		0,7		25±0,15	5,33±0,33
6.	‘Thornless Evergreen’	0,3	55-60	12±0,20	8,0±1,05
		0,5		19±0,13	6,9±1,19
		0,7		24±0,12	4,9±1,37
7.	‘Reuben’	0,3	55-60	12±0,02	4,7±1,41
		0,5		20±0,09	4,2±0,91
		0,7		24±0,20	2,7±1,05
8.	‘Chester’	0,3	55-60	13±0,19	10,2±1,87
		0,5		22±0,24	7,9±1,37
		0,7		30±0,16	6,9±1,37
9.	‘Thornfree’	0,3	55-60	12±0,11	8,9±0,19
		0,5		18±0,13	6,7±0,08
		0,7		25±0,09	4,2±0,15
10.	‘Smoothstem’	0,3	55-60	14±0,17	9,1±1,19
		0,5		23±0,10	4,9±0,87
		0,7		26±0,09	3,9±1,10

Notă: m – media, n – abaterea

Pe mediul pentru multiplicare adăugat cu BAP 0,5 mg/l cele mai bune rezultate au fost evidențiate la soiurile ‘Loch Ness’ cu 29 lăstari proliferați și 24 la soiul ‘Polar’ (Figura A 1.2.).

Soiul de mur ‘Smoothstem’ generează în mediu 23 lăstari adventivi, fiind urmat de soiul ‘Chester’ cu 22 lăstari per explant. Soiurile ‘Arapaho’ și ‘Thornless Evergreen’ generează în mediu 19 lăstari adventivi (Figura A 1.4.), pe când soiul ‘Triple Crown’ 21 de lăstari (Figura A 1.3.). Soiul ‘Thornfree’ a proliferat în mediu 18 lăstari adventivi pe mediul nutritiv suplimentat cu BAP 0,5 mg/l (Tabelul 3.8.) ‘Reuben’ (Figura A 1.7., 3,14.).

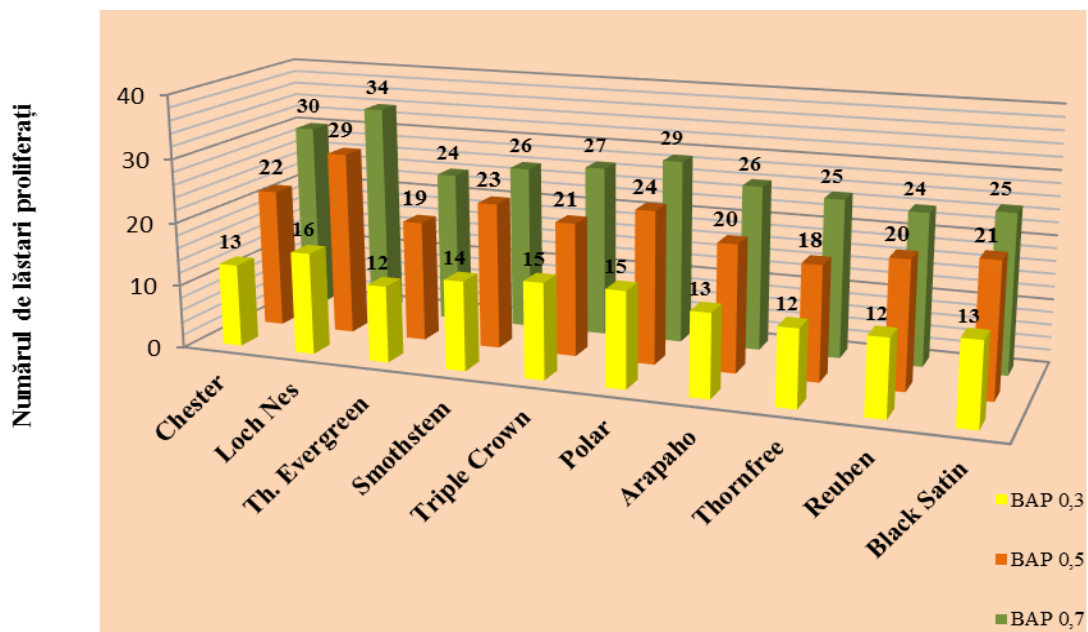


Fig. 3.14. Proliferarea lăstarilor de mur pe mediul nutritiv MS cu diferite concentrații de BAP (mg/l).

Pe mediul pentru multiplicare adăugat cu BAP 0,7 mg/l cele mai ample rezultate s-au remarcat la soiul ‘Loch Ness’ cu 34 lăstari adventivi generați, fiind urmat de soiurile ‘Chester’ cu 30 lăstari generați (Figura A 1.5.) și soiul ‘Polar’ cu un număr de 29 lăstari adventivi. Soiul de mur ‘Triple Crown’ generează 27 lăstari adventivi (Figura A 1.8.), fiind urmat de soiurile ‘Smoothstem’ și ‘Arapaho’ cu 26 lăstari generați per explant. Soiurile ‘Thornfree’ și ‘Black Satin’ au proliferat câte 25 de explanți pe mediul pentru multiplicare adăugat cu BAP 0,7 mg/l iar ‘Thornless Evergreen’ – 24 de lăstari adventivi formați (Figura A 1.9.), (Figura 3.15.).

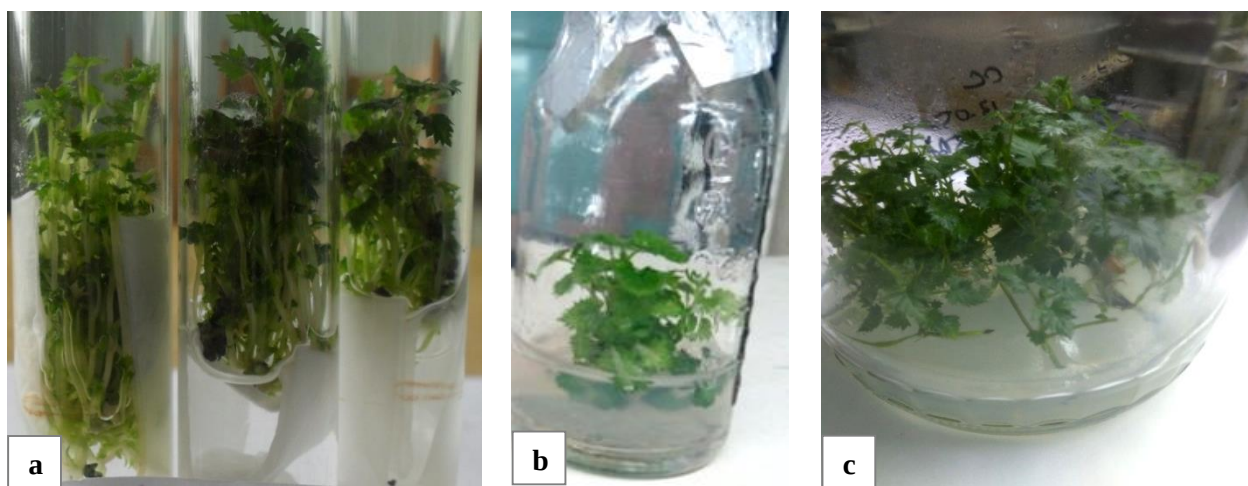


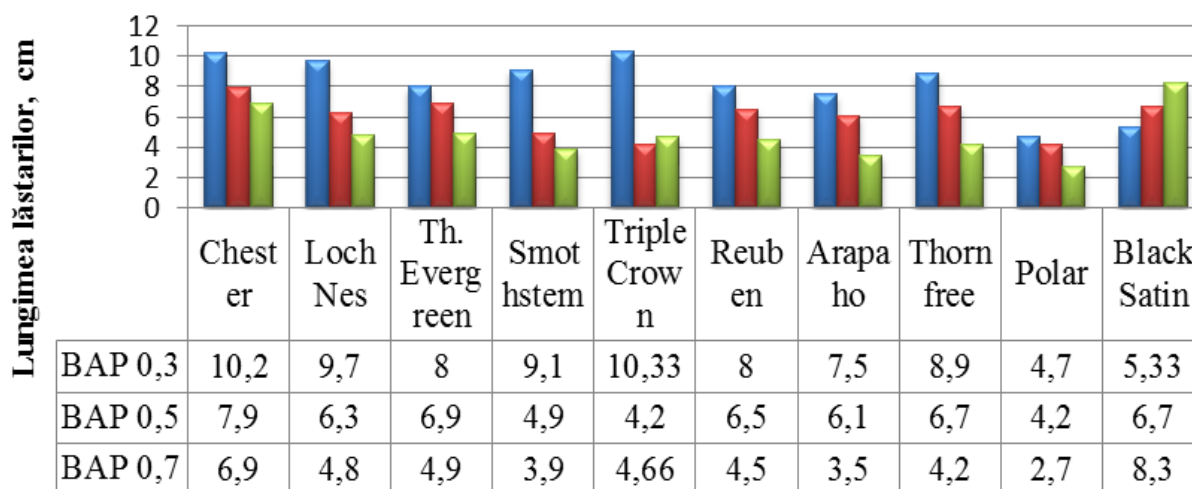
Fig. 3.15. Multiplicarea soiurilor de mur.

Notă: **a** – ‘Chester’, **b** – ‘Loch Ness’, **c** – ‘Triple Crown’

La mur microclonarea s-a efectuat pe medii nutritive MS agarizate și lipsite de agar. În cazul celor lipsite de agar mediul nutritiv s-a turnat în eprubete iar pentru menținerea lăstarului

plasat pentru proliferarea lăstarilor s-au plasat punți din hârtie de filtru. Mediile nutritive agrizate s-au turnat în borcane de diferit volum (50, 150, 250, 750 ml).

Analizând datele din Tabelul 3.8. și Figura 3.14. observăm că odată cu sporirea concentrației de citochinină scade lungimea lăstarului, iar cu diminuarea concentrației BAP-ului lungimea lăstarului se extinde. La concentrația de 0,7 mg/l de BAP lungimea maximală a lăstarului a atins 6,9 cm, iar la o concentrație de 0,3 mg/l lungimea maximală a lăstarului măsura 10 cm (Figura 3.16.).



Soiurile de mur

Figura 3.16. Lungimea (cm) a lăstarilor pe medii suplinite cu BAP.

Acest fapt demonstrează provocarea dezvoltării mugurilor, majorarea concentrației de BAP ce sporește considerabil proliferarea numărului de lăstari adventivi. La soiurile respective de mur proliferarea lăstarilor a fost reglată prin schimbarea concentrației de BAP (0,3; 0,5; 0,7 mg/l) prezent în substratul de cultură. Citochinina BAP în doza de 0,3 mg/l declanșează lăstărirea multiplă la soiurile de mur din muguri adventivi.

Citochininele stimulează creșterea meristemelor, mai ales în cazul în care ele se află în latență, precum și generarea de mugurași [3, 7, 9, 10]. Rezultatele obținute au permis elaborarea schemei subcultivărilor în cadrul multiplicării in vitro a plantelor de mur (Figura 3.17.). Conform acesteia odată ce culturile sunt inițiate, următoarea subcultivare este cea cu supliment de BAP în 3 concentrații diferite (0,3 mg/l, 0,5 mg/l, 0,7 mg/l) în dependență de scopul propus și numărul de plante necesar de obținut, urmată de subcultivare rizogenică.

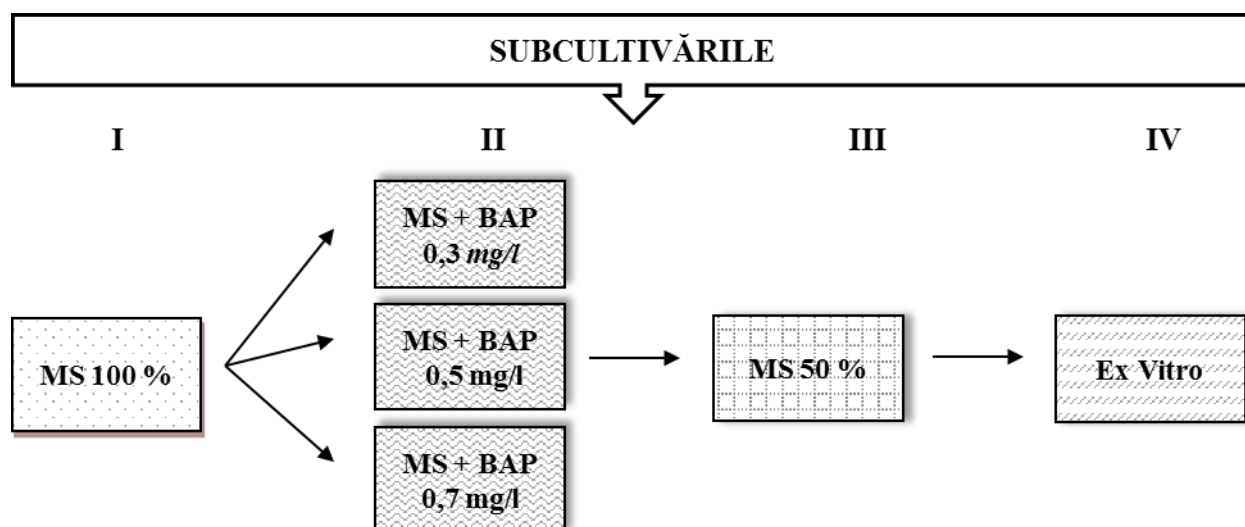


Fig. 3.17. Schema subcultivărilor în procesul microclonării.

Notă: Inițierea culturilor – ; multiplicarea lăstarilor – ; rizogeneza lăstarilor obținuți – ; aclimatizarea –

După a III-a subcultivare plantele cu certitudine pot fi transferate *ex vitro*. În funcție de concentrație BAP-ul favorizează și stimulează la soiurile de mur formarea de mugurași și tulpinițe (caulogeneza) fapt ce constituie o modalitate de obținere rapidă a unui număr sporit de minibutași de o uniformitate genetică, multiplicați prin biotehnici *in vitro*.

3.3.4. Influența balanțelor hormonale asupra creșterii și multiplicării vitroculturilor de mur

Toate soiurile de mur au fost micropropagate pe mediul de bază MS 100%, suplimentat cu formule hormonale din grupul citochininelor (BAP), auxinelor AIB, ANA, AIA, și giberilinelor (AG₃).

Tehnicile de cultivare *in vitro* pot fi controlate de echilibrul fitohormonal, asigurat de auxine și citochinine. Raportul citochinină/auxină influențează procesele fiziologice din explante, determinând evoluția acestora în diferite cazuri, prin diminuarea concentrației celor doi fitohormoni [53, 56]. Astfel, după Skoog, comportamentul fiziologic al explantelor va fi: dacă raportul auxine/citochinină este mare, se induce rizogeneza, dacă raportul este subunitar se induce lăstărirea, pot genera formațiuni calusale [109]. Această schemă generală este întotdeauna valabilă, chiar dacă există variații în funcție de tipul de explant și mai ales în funcție de speciile luate în cultură. Acești fitoregulatori principali în mai multe cazuri au avut doar rol stimulator sau favorizant și rareori esențial [7, 6, 52-54].

Studiul efectuat asupra soiurilor de mur cu combinația de trei tipuri de regulatori de creștere din grupul auxinelor, citochininelor, giberilinelor (BAP+AIB+GA₃, BAP+AIA+ GA₃,

BAP+ANA+AG₃) în doze 0,3+0,2+0,1 mg/l au evidențiat rezultate optime însă mai eficiente sunt pe medii adiționate doar cu BAP (Tabelul 3.9.). Auxinele selectate (ANA, AIB, AIA) pe lângă rolul de stimulare a rizogenezei, favorizează și dezvoltarea plantei în ansamblu. Toate tipurile de auxine s-au luat în concentrație mai diminuată de 0,2 mg/l. Giberilina în doză de 0,1 mg/l, este un regulator, care favorizează creșterea în lungime a internodurilor [7, 9, 10, 51].

Pentru soiul ‘Arapaho’ rezultatul optim s-a constatat pe mediul Nr. 6, proliferând circa 3 lăstari, cu lungime maximală de 10 cm, pe mediul Nr. 5 soiul ‘Arapaho’ a generat 2,66 lăstari cu 9,0 cm în lungime, pe mediul Nr. 4, 3 lăstari și 8,0 cm lungimea fiecărui lăstar (Tabelul 3.8.).

Tabelul 3.9.
Rolul balanțelor hormonale în micromultiplicarea *in vitro* la mur

Nr. d/o	SOIUL	Combinăția regulatorilor de creștere					
		BAP +AIB+ GA ₃ — Nr. 4 0,3 + 0,2 +0,1 mg/l		BAP +AIA+ GA ₃ — Nr. 5 0,3 + 0,2 +0,1 mg/l		BAP +ANA+ GA ₃ — Nr. 6 0,3 + 0,2 +0,1 mg/l	
		Lungimea lăstarului, cm m±n	Nr. de lăstari m±n	Lungimea lăstarului, cm m±n	Nr. de lăstari m±n	Lungimea lăstarului, cm m±n	Nr. de lăstari m±n
1.	‘Arapaho’	8 ± 0,62	3,0±1,52	9,0 ± 0,27	2,66±1,54	10 ±0,24	3,0±0,0
2.	‘Triple Crown’	8,66±0,97	3,0±1,0	7,0±0,61	2,0±1,0	9,0±0,73	2,0±1,0
3.	‘Loch Ness’	8,0±1,73	3,0±1,52	6,33±0,57	1,66±1,54	7,66±0,57	2,33±1,52
4.	‘Polar’	7,66 ±0,49	2,66±1,0	8,33 ± 0,62	1,66±1,54	8,33 ±0,62	2,0±0,0
5.	‘Black Satin’	7,33±0,51	3,0±1,0	8,66±0,33	3,0±1,0	9,0±0,27	3,0±0,0
6.	‘Thornless Evergreen’	7±0,35	2,66±1,54	7,33 ± 0,39	3,33±1,52	8,33 ±0,12	4,0±1,0
7.	‘Reuben’	7,66±0,37	2,66±1,54	7,0±0,35	3,33±1,52	8±0,35	3,33±2,08
8.	‘Chester’	9,66±0,64	2,66±1,52	9,66 ± 0,53	3,33±0,57	9,33 ±0,61	4,0±1,0
9.	‘Thornfree’	7,66±0,49	3,0±2,64	9,33 ± 0,30	2,66±0,57	8,33±0,45	3,33±2,08
10.	‘Smoothstem’	5,66±0,67	2,66±1,0	9±0,55	1,33±0,57	10,0 ±0,24	2,83± 1,54

Notă: m – media, n – abaterea

Pentru soiul ‘Triple Crown’ cele mai eficiente medii nutritive s-au dovedit a fi Nr. 4 și Nr. 5, unde lăstarul a atins o creștere de 8,66 și 6,0 cm. Pentru soiul ‘Polar’ lăstărirea a reușit pe mediul Nr.4, cu 2,66 lăstari generați și 7,66 cm în lungime. Soiul ‘Loch Ness’ formează 3,0 lăstari pe mediul Nr. 4 cu o lungime de 8,0 cm, pe mediul Nr. 5 – 1,66 lăstari, lungimea de 6,33 cm, pentru ‘Loch Ness’, dar cea mai efektivă balanță hormonală este Nr. 6 unde formează 2,33 lăstari per explant cu o lungime de 7,66 cm. Iar pentru soiul ‘Triple Crown’ cele mai eficiente medii de

creștere s-au dovedit a fi Nr. 4 și Nr. 5 unde lăstarul a atins o creștere maximală de 9,0 cm și 8,66 cm.

Pentru soiul ‘Thornfree’ cele mai reprezentative rezultate s-au obținut pe mediul Nr. 5, iar pentru soiul ‘Triple Crown’ cele mai eficiente medii nutritive s-au dovedit a fi Nr. 4 și Nr. 5 unde lăstarul a atins o creștere de 8,66 cm și 6,0 cm (Tabelul 3.8.).

Pentru soiul ‘Smoothstem’, lungimea maximă a lăstarului, circa 10 cm, s-a obținut pe mediul Nr. 6. La soiul ‘Chester’ lungimea lăstarului a atins pe mediul Nr. 4 și Nr. 5 de 9,66 cm, pe mediul Nr. 6 de 9,33 cm în lungime. Pentru soiul ‘Thornless Evergreen’ cel mai bun rezultat s-a stabilit pe mediul Nr. 6 iar pe substratul de cultivare Nr. 4 lăstarul a atins lungimea de 7,0 cm. (Tabelul 3.8.). Pe balanța hormonală Nr. 4 mediul MS100% suplinat cu 0,3 mg/l BAP și 0,2 mg/l AIB și 0,1 mg/l AG₃ prevalează cu circa 3,0 lăstari proliferați soiurile ‘Arapaho’, ‘Loch Ness’, ‘Triple Crown’, ‘Black Satin’, ‘Thornfree’, un număr mai mic de lăstari de circa 2,66 se formează la soiurile ‘Polar’, ‘Smoothstem’, ‘Chester’, ‘Thornless Evergreen’ și ‘Reuben’.

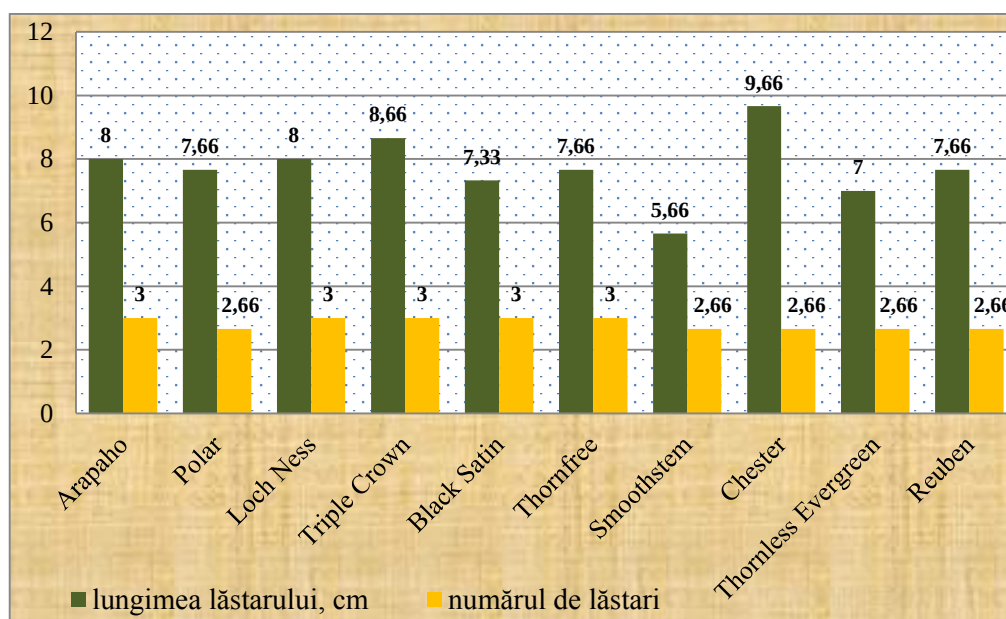


Fig. 3.18. Influența combinațiilor regulatorilor de creștere asupra lungimii și numărului de lăstari pe mediul nutritiv Nr. 4.

Cea mai mare lungime o atinge soiul ‘Chester’ pe mediul Nr. 4, de 9,66 cm, urmează ‘Triple Crown’ de 8,66 cm. Soiurile ‘Arapaho’ și ‘Loch Ness’ dezvoltă lăstari de 8 cm, soiurile ‘Polar’, ‘Thornfree’, ‘Reuben’ înregistrează o lungime a lăstarilor de circa 7,66 cm. Pentru soiul ‘Black Satin’ lungimea lăstarilor dezvoltați este de 7,33 cm și ‘Thornless Evergreen’ – 7,00 cm. Cea mai redusă creștere pe mediul Nr. 4 este la soiul ‘Smoothstem’ (Figura 3.18.).

Pe mediul de cultivare Nr. 5, suplinat cu BAP – 0,3 mg/l, AIA – 0,2 mg /l, AG₃ – 0,1 mg/l cea mai sporită proliferare se evidențiază la soiurile ‘Chester’, ‘Thornless Evergreen’, ‘Reuben’

de 3,33 lăstari. O pondere mai scăzută este la soiul ‘Black Satin’ – 3 lăstari, iar câte 2,66 lăstari se dezvoltă la soiurile ‘Arapaho’ și ‘Thornfree’. Soiul ‘Triple Crown’ generează 2 lăstari pe mediul Nr. 5. Soiurile ‘Polar’ și ‘Loch Ness’ dezvoltă circa 1,66 lăstari, iar soiul ‘Smoothstem’ – 1,33 lăstari. Cea mai evoluată lungime s-a constatat la soiurile ‘Chester’ de 9,66 cm per explant și soiul ‘Thornfree’ cu o lungime de 9,33 cm. Soiurile ‘Arapaho’ și ‘Smoothstem’ au dezvoltat o creștere a lăstarului de 9,0 cm pentru ambele soiuri. Soiul ‘Black Satin’ s-a manifestat cu o creștere de 8,66 cm iar ‘Polar’ de 8,33 cm. Pentru soiurile ‘Triple Crown’ și ‘Black Satin’ revine o creștere medie de 7,0 cm a lăstarului. Cea mai diminuată valoare a creșterii lăstarului se atestă la soiul ‘Loch Ness’ de 6,33 cm (Figura 3.19.).

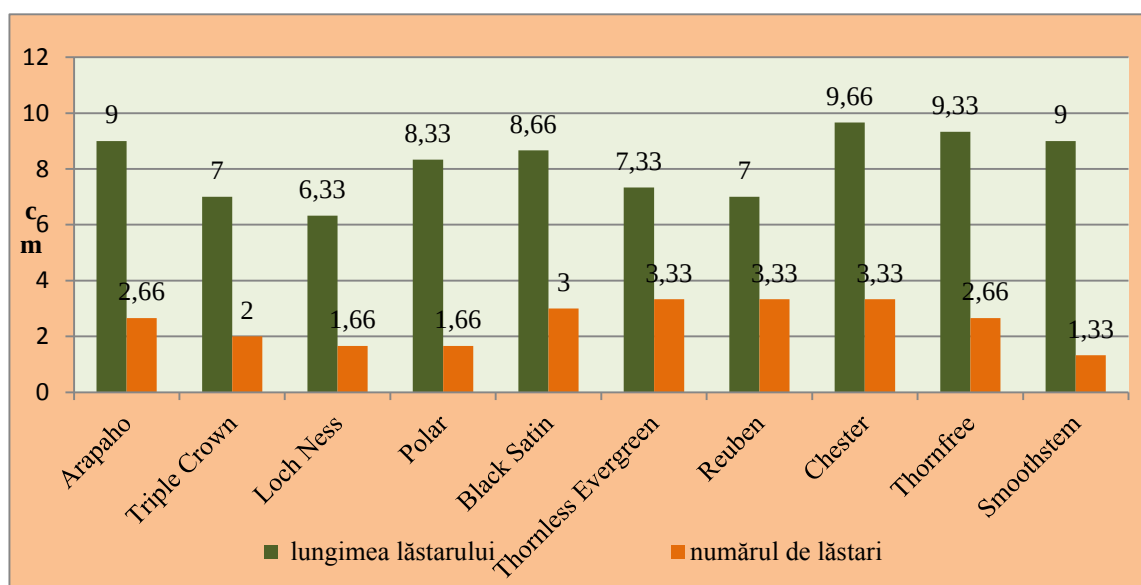


Fig. 3.19. Influența combinațiilor regulatorilor de creștere asupra lungimii și numărului de lăstari pe mediul nutritiv Nr. 5.

Formare mai diminuată de lăstari se evidențiază la soiurile ‘Polar’ și ‘Loch Ness’ 1,66 lăstari per explant și 1,33 pentru soiul ‘Smoothstem’. Pe mediul Nr. 6 combinația BAP – 0,3 mg/l, ANA – 0,2 mg /l, AG₃ – 0,1 mg/l a emis următoarele rezultate: un număr mai mare de lăstari de circa 4, a proliferat soiurile ‘Thornless Evergreen’ și ‘Chester’; Soiurile ‘Thornfree’ și ‘Reuben’ au dezvoltat 3,33 lăstari.

Soiul ‘Arapaho’ a produs 3 lăstari (Figura 3.21.), iar soiul ‘Smoothstem’ a proliferat 2,83 lăstari, mai puțin soiul ‘Loch Ness’ – 2,33 lăstari, iar soiurile ‘Polar’ și ‘Triple Crown’ câte 2 lăstari pentru fiecare soi în parte. Tot pe combinația BAP – 0,3 mg/l, ANA – 0,2 mg/l, AG₃ – 0,1 mg/l (mediul Nr. 6) cea mai evoluată înălțime au atins soiurile ‘Arapaho’ și ‘Smoothstem’ de circa 10 cm, urmate de soiul ‘Chester’ – de 9,33 cm. Cu o lungime de 9 cm se evidențiază soiurile ‘Triple Crown’ și ‘Black Satin’. Soiurile ‘Polar’, ‘Chester’ și ‘Smoothstem’ dezvoltă o lungime

de 8,33 cm o rată de creștere mai scăzută s-a constatat la soiurile ‘Reuben’ (Figura 3.20.) de 8 cm și ‘Loch Ness’ de 7,66 cm.

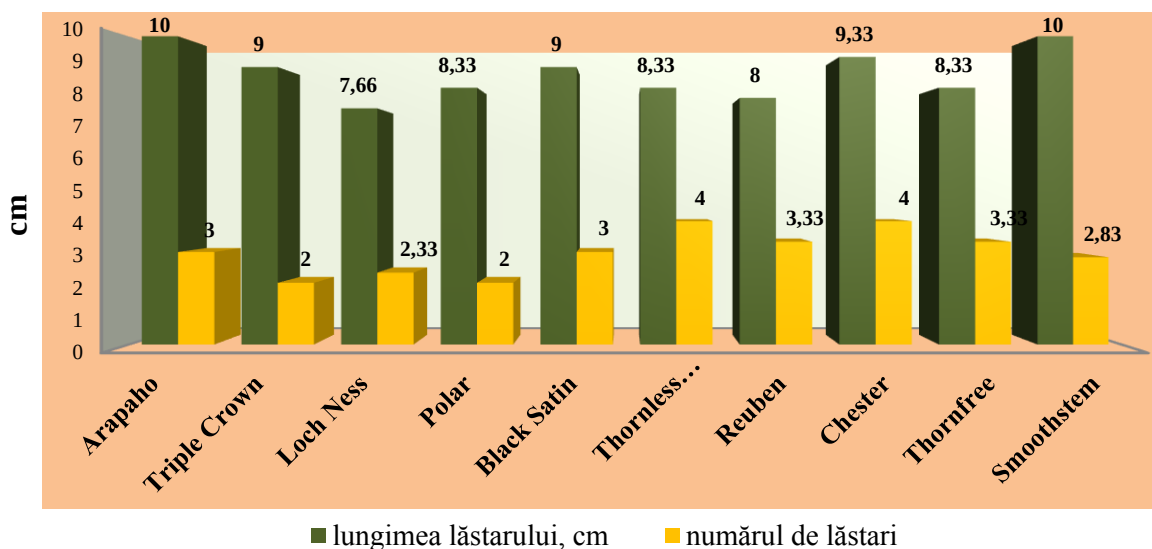


Fig. 3.20. Influența combinațiilor regulatorilor de creștere asupra lungimii și numărului de lăstari pe mediul nutritiv Nr. 6.



Fig. 3.21. Plantule de mur crescute pe mediul nutritive Nr. 6.

Notă: a – ‘Arapaho’, b – ‘Reuben’

În dependență de scopul propus – pentru sporirea materialului biologic se respectă toate etapele. În lipsa producerii cantității mai masive de material săditor etapele II și III pot fi omise (Figura 3.22.).

Analiza datelor obținute ne permite să afirmăm că prin experimentele efectuate cu variația celor 3 tipuri de regulatori din grupul citochininelor, auxinelor, giberelinelor, a fost creată o balanță hormonală în raport de 3:2:1. Astfel s-a demonstrat că, prezența în mediul de cultură a unei citochinine, alături de o auxină, stimulează atât procesul de proliferare a lăstarilor, dezvoltarea lor,

cât și procesul de rizogeneză. Suplinirea mediilor cercetate cu giberelină s-a efectuat cu scopul de a contribui la alungirea internodurilor și creșterea în lungimea a plantulelor de mur.

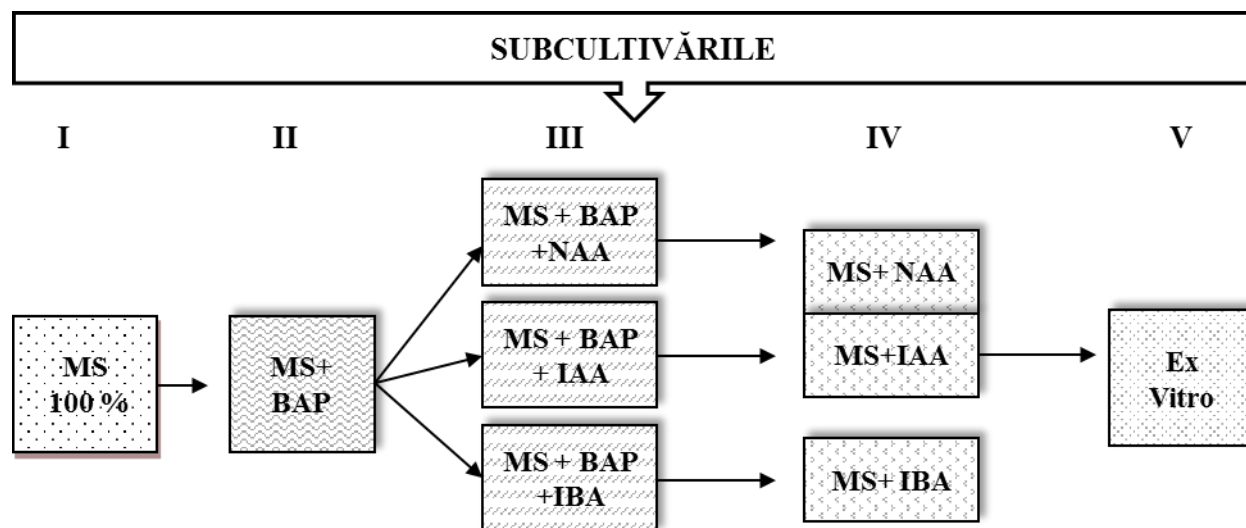


Fig. 3.22. Schema subcultivărilor pentru micropropagarea *in vitro* a soiurilor de mur.

Notă: Inițiere – , multiplicare – , creștere și rizogeneză – , transplantare *ex vitro* – 

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

Denumirea de auxine provine din greacă *auxein* – a crește, bazat pe nucleul indolic cu formula $C_{10}H_9O_2$ [9-11, 52].

Auxinele dețin proprietatea de a interveni în multe fenomene fizice, iar acțiunile lor depind de concentrații și de interacțiunile cu alți reglatori de creștere. Studiind câteva din efectele lor se poate concluziona că; exercită o acțiune asupra elongării celulare, aceste efecte de urmărire a plasticității peretelui celular și penetrării apei în celulă [52, 56]. Aproximativ 50% din celulele ale membranei plasmactice, care conduc la deplasarea ionilor de H^+ , determinând o creștere a acidității responsabile pentru diminuarea rezistenței peretelui celular și o absorbție a ionilor de K^+ , influențează în general metabolismul celular în special, sinteza ribozomului ARN (ribozomii participă la sinteza proteinelor), stimulează diviziunea celulelor cu origine cambială [51, 52].

Prelucrarea și analizarea datelor statistice ne permit afirmarea datelor obținute ce țin de lungimea plantulelor de mur micropropagate pe medii suplinite cu auxine (Tabelul 3.9.).

Pentru soiul ‘Arapaho’ cea mai efectivă creștere a fost pe mediul Nr. 7, unde lăstarul atinge 13,0 cm lungime cu formațiuni calusale verzi, iar pe mediul Nr. 9 înregistrează o scădere în creșterea lăstarului de 9,66 cm, la baza rădăcinii prezentând formațiuni calusare albe, iar pe mediul Nr. 8, lungimea lăstarului atinge 9,0 cm, planta fiind viguroasă, fără formațiuni calusare la bază.

Tabelul 3.9.

Influența auxinelor asupra lungimii plantulelor la soiurile de mur (cm)

Nr. d/o	SOIUL	Lungimea plantulelor ($m \pm n$) pe mediile nutritive suplinite		
		ANA – 0,2 mg/l Nr. 7	AIA – 0,2 mg/l Nr. 8	AIB – 0,2 mg/l Nr. 9
1.	‘Arapaho’,	13,0 cm $\pm$ 0,19	9,0 cm $\pm$ 0,27	9,66 cm $\pm$ 0,55
2.	‘Triple Crown’,	11,33cm $\pm$ 0,12	10,33 cm $\pm$ 0,36	12,33 cm $\pm$ 0,30
3.	‘Loch Ness’	10,0 cm $\pm$ 0,26	9,6 cm $\pm$ 0,55	10,2 cm $\pm$ 0,84
4.	‘Polar’	7,66 cm $\pm$ 0,37	5,33 cm $\pm$ 0,26	6,66 cm $\pm$ 0,21
5.	‘Black Satin’	10,66 cm $\pm$ 0,27	9,66 cm $\pm$ 0,29	10,33 cm $\pm$ 0,36
6.	‘Thornless Evergreen’	12,33 cm $\pm$ 0,32	11,33 cm $\pm$ 0,33	11,33 cm $\pm$ 0,12
7.	‘Reuben’	10,0 cm $\pm$ 0,33	9,33 cm $\pm$ 0,55	9,66 cm $\pm$ 0,37
8.	‘Chester’	12,66 cm $\pm$ 0,3	12,0 cm $\pm$ 0,11	10,66 cm $\pm$ 0,27
9.	‘Thornfree’	9,33 cm $\pm$ 0,40	8,33 cm $\pm$ 0,45	9,33 cm $\pm$ 0,33
10.	‘Smoothstem’	9,0 cm $\pm$ 0,27	10,33 cm $\pm$ 0,13	8,66 cm $\pm$ 0,17

Nota: **m** – media, **n** – abaterea.

Pentru soiul ‘Polar’ cea mai mare înălțime a lăstarului a fost cea pe mediul Nr. 7 de 7,66 cm, cu masă calusară verde la bază, pe mediul Nr. 9, lăstarul a atins lungimea de 6,66 cm cu formațiune calusară albă în rădăcini, iar pe mediul Nr. 8 planta a atins în mediu 5,66 cm fără formațiuni calusare ceea ce v-a permite o mai bună aclimatizare în paletele cu substrat destinate fazei *ex vitro* (Figura A. 3.2.). Pentru soiul ‘Thornless Evergreen’ este specifică o mai bună creștere pe mediul Nr. 7 unde atinge o înălțime de 12,33 cm, iar pe mediile Nr. 8 și Nr. 9 de 11,33 cm.

Pentru soiul ‘Thornfree’ cea mai bună creștere se constată pe mediile Nr. 4, Nr. 6 unde lăstarul atinge aceleași valori medii de 9,33 cm, și o scădere pe mediul Nr. 5, până la 8,33 cm (Figura A. 3.2 a, b).

Pentru soiul ‘Smoothstem’ cea mai bună creștere se constată pe mediul Nr. 8 unde lăstarul a crescut de 10,33 cm pe mediul Nr. 7 lungimea lăstarului 9 cm, iar pe mediul Nr. 9 – 8,33 cm (Figura 3.23.). Pentru soiul ‘Chester’ cea mai pronunțată creștere se remarcă pe mediile Nr. 7, Nr. 8, de 12,66 cm, respectiv 12,33 cm, și o scădere se atestă pe mediul Nr. 9 de 10,66 (Figura 3.22.), lungimea lăstarului (Figura A. 3.4.).

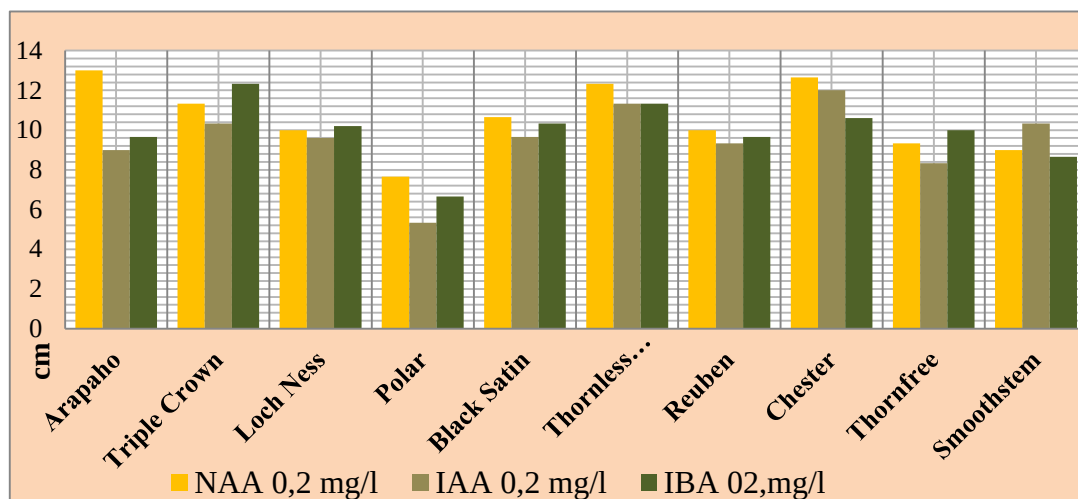


Fig. 3.22. Influența regulatorilor auxinici în procesul de creștere în lungime a lăstarilor.

Pentru soiul ‘Loch Ness’ cea mai prielnică creștere se observă pe mediile Nr. 7, Nr. 9 de 10 cm și puțin în diminuare pe mediul Nr. 8 cu o lungime a lăstarului de 9,6 cm (Figura A. 3.1).

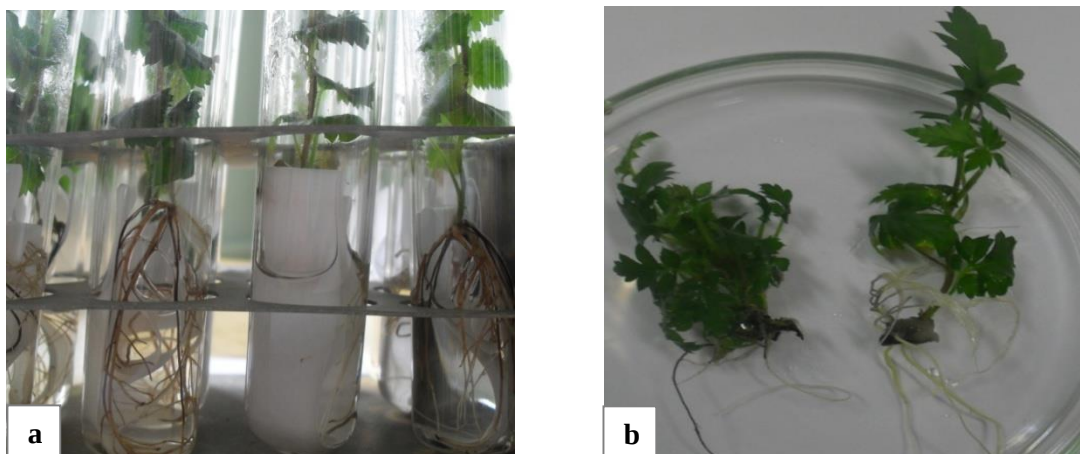


Fig. 3.23. Înradăcinarea plantulelor pe medii nutritive suplinite cu auxine.

Notă: **a** – ‘Smoothstem’, **b** – ‘Thornless Evergreen’

Pentru soiul ‘Triple Crown’ cea mai evoluată creștere a lăstarului a fost pe mediul Nr. 9 de 12,33 cm, cu masă calusală albă la baza rădăcinuțelor, pe mediul Nr. 7, lăstarul a atins lungimea de 11,33 cm cu formațiune calusală verde în rădăcini, iar pe mediul Nr. 8 planta a dezvoltat un lăstar în mediu 10,33 cm fără formațiuni calusale ceea ce v-a permite o mai bună aclimatizare în paletele cu substrat, destinate *ex vitro*.

În urma studiului efectuat pe medii nutritive suplinite cu trei tipuri de regulatori de creștere din grupul auxinelor AIB, AIA, ANA, soiurile cercetate au avut un răspuns morfogenic pozitiv și eficient în ceea ce privește creșterea lăstarului, formarea frunzelor, vigurozitatea lăstarului, formarea procesului de rizogeneză (Figura 3.24.).



Fig. 3.24. Plantule de mur înrădăcinate pe medii cu diferite tipuri de auxine.

Aceste caracteristici s-au manifestat bine la toate soiurile, abateri înregistrându-se la înălțimea lăstarului și formarea masei calusare la baza lăstarului. Cel mai frecvent a fost înregistrată dezvoltarea masei calusare pe mediile suplimentate cu AIB, iar pe cele suplimentate cu ANA s-a constatat calus verde (Figura 3.24.). Iar pe mediile suplimentate cu AIA nu s-au observat formațiuni calusare, procesul rizogenetic fiind bine dezvoltat.

Pentru micropropagarea mini-lăstarilor a fost testat mediul lichid MS în două variante experimentale: 100% și 50%. Prima variantă de mediu s-a utilizat pentru a obține cantități mai sporite de material vegetal. Varianta MS 50% este utilizată ca mediu de înrădăcinare dar și ca mediu pentru conservare pe o anumită perioadă. S-a testat mediul MS cu diferite adaosuri, însă cel mai rentabil și eficient pentru inițierea morfogenetică la plantulele de mur este MS 100%, cu pH 5,8-6,0 până la autoclavare. Pe acest mediu s-a observat inițierea rădăcinuțelor în decurs de 14 zile de la transferul *in vitro*, iar peste 20-30 de zile se remarcă o creștere considerabilă a plantulei care deja poate fi folosit ca material de butășire pentru o pasare ulterioară, iar partea inferioară a plantulei o transferăm la *ex vitro* (Figura A. 4.1., A. 2.1., A. 2.2.). Pentru micropropagare în calitate de butaș folosim un segment alcătuit din unul, două internoduri, segmentul de explant trebuie să fie cât mai viguros și sănătos, astfel, obținem un material săditor calitativ (Figura 3.25.). Lungimea butașului pentru micropropagare este cu lungimea de 2,0-2,5 cm. Este foarte important ca lăstarul să fie viguros, atunci procesul de micropropagare va fi efectuat cu succes. Odată ce lăstarul a atins lungimea de 12,0-14,0 cm este supus butășirii și transferat pe alte medii nutritive pentru microînmulțirea ulterioară. În acest mod în intervalul de 30-40 zile randamentul de material biologic se mărește de 4-5 ori (Figura 3.25.).



Fig. 3.25. Butășirea plantei de mur la soiul ‘Triple Crown’.

Plantulele sunt crescute în încăperi cu fotoperiodismul de 16 ore lumină și 8 ore obscuritate, cu temperatura medie de $23 \pm 2^\circ\text{C}$. Pentru înrădăcinarea soiurilor ‘Arapaho’, ‘Triple Crown’, ‘Loch Ness’, ‘Black Satin’, ‘Polar’, ‘Chester’, ‘Reuben’, ‘Thornless Evergreen’, ‘Thornfree’, ‘Smoothstem’, s-au testat mediile nutritive MS 50% lichid cu supliment de 30 g/l și 15 g/l zaharoză (Figura 3.26.).



Fig. 3.26. Soiul ‘Polar’ pe mediu de cultură MS 50%.

Mediul nutritiv optim pentru inducerea rizogenezei este MS 50%, lichid, suplimentat cu 30 g de zaharoză. Apariția primelor rădăcinuțe s-a observat la a 10 zi după transfer pe acest mediu. În perioada de 21 zile planta formează rădăcinuțe de culoare albă și atinge o lungime de 4 cm, cu un sistem radicular alcătuit din 5-6 rădăcinuțe și o lungime de 2,0-2,5 cm (Figura 3.27.).

Partea apicală a plantei este transferată pe mediu nutritiv pentru inducerea morfogenică în cultura *in vitro* în continuare, iar partea bazală alcătuită din 2-3 internoduri este transferată *ex vitro* pentru a fi aclimatizată ulterior pentru o dezvoltare complexă.

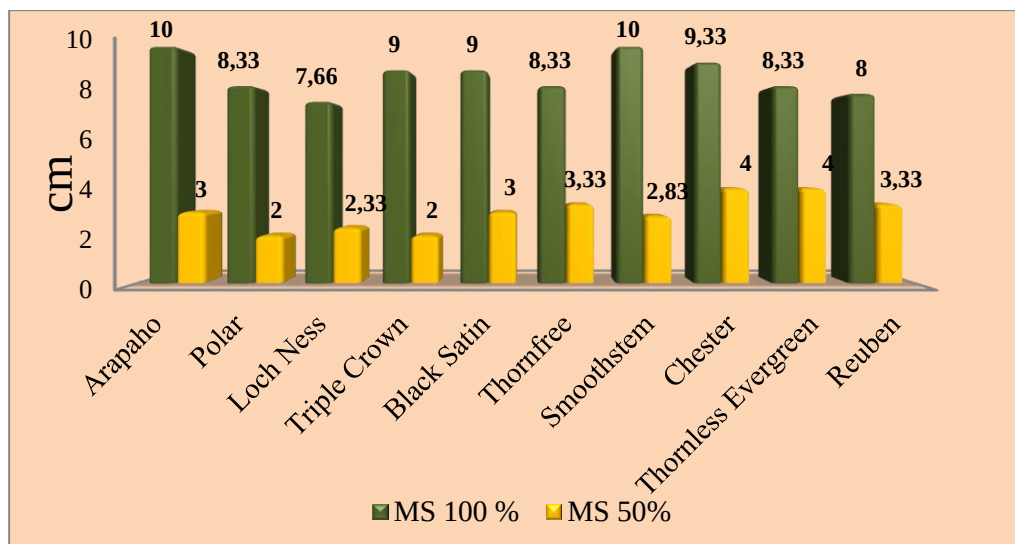


Fig. 3.27. Lungimea la diferite soiuri de mur (cm) cultivate pe MS (50%, 100%).

Pentru toate soiurile rizogeneza apare relativ concomitent, însă, rădăcinile diferă de la un soi la altul. S-a observat că, la soiurile ‘Chester’ și ‘Loch Ness’ rădăcinuțele sunt în număr de 5-7 neramificate, lungi, cu diametru de 0,8 mm, pe când la soiurile ‘Smoothstem’ și ‘Triple Cown’, ‘Black Satin’ rădăcinuțele sunt mai rugoase și au un diametru de 1,0 mm. La soiurile ‘Thornless Evergreen’ rădăcinuțele sunt în număr de 6-7 cu un diametru de 0,8- 0,9 mm (Figura 3.26).

Mediul MS 100% s-a selectat ca cel mai optimal, rentabil și adecvat mediu pentru rizogeneza soiurilor de mur. Plantula obținută pe mediul nutritiv 100% se butășește 4 lăstari cu câte 3 internoduri, partea de jos a lăstarului (înrădăcinată) este transferată *ex vitro*. Pe mediul nutritiv MS 50%, lipsit de regulatori de creștere plantulele crescute sunt mai mici din ele pot fi obținute doi butași, din partea apicală transferată în procesul de micropropagare, partea bazală fiind bine înrădăcinată este transferată *ex vitro* (Figura 3.27.).

3.4. Aclimatizarea materialului multiplicat *in vitro*

Transplantarea *ex vitro* reprezintă faza de pregătire a plantulelor pentru trecerea la cultura *ex vitro* (seră și câmp).

La trecerea plantulelor multiplicare *in vitro*, în procesul de acomodare *ex vitro*, se ține cont în mare măsură de substrat și de respectarea condițiilor optime (gradul de umiditate și afânare a substratului, valoarea pH, compoziția substratului, expoziția și gradul de luminozitate) [90, 91, 110]. Plantulele de mur care nu au dezvoltat sistem radicular, se plantează în substrat de perlit pentru dezvoltarea acestuia. La transferul plantulelor la condițiile de aclimatizare sistemul radicular al plantulelor din eprubetele de cultivare a fost spălat cu apă de temperatura 25-30°C pentru a înlătura mediul de cultură iar apexul rădăcinilor este tăiat, cu scopul stimulării procesului

de înrădăcinare [54, 55, 110]. Plantulele anterior trecute prin soluție slab roz de KMnO_4 s-au transferat pe un substrat solid, steril, în prealabil autoclavat la 2 atm. timp de 30 minute [114-116]. Au fost testate și utilizate trei tipuri de substrat: 1) substrat steril alcătuit din sol de gazon, turbă, perlit, nisip, în proporții de 1:1:0,25:0,25; 2) substrat steril din sol de gazon și turbă comercială în raport (1:1:3); 3) substrat alcătuit doar din turbă comercială.

Plantulele de mur care nu au dezvoltat sistem radicular, s-au plantat în substrat de perlit pentru dezvoltarea sistemului radicular (Figura 3.29., a). Transferul vitroculturilor s-a efectuat în palete celulare (ghivece mici unite în module). Celulele paletelor preventiv s-au umplut cu substrat. Astfel, butașii de mur cu o lungime de 2,5 cm s-au plantat în palete alcătuite din 104 celule, volumul celulei 25-30 ml, materialul vegetal destinat procesului de adaptare la *ex vitro*, care se acoperă cu folii transparente pentru a menține umiditatea de 85-90%. Pentru transplantare a fost utilizarea substratului cât mai poros pentru aer și apă, cu o masă specifică mică pentru a fi ușor suportat de rădăcini, în caz contrar procentul de supraviețuire a plantelor este minim.

Observațiile fenologice și analiza rezultatelor înregistrate au arătat că substratul alcătuit doar din turbă comercială cu pH 5.8-6.5 a fost optim pentru aclimatizarea și dezvoltarea neoplantulelor în prima fază de aclimatizare.

Plantulele *in vitro* sunt crescute la intensitate redusă a luminii (1200-2000 lucș) și temperatura aerului – $23 \pm 2^\circ\text{C}$. Transferarea plantulelor direct la razele solare cu spectru larg (4000-12000 lucș) și temperatura aerului ridicată ($26-36^\circ\text{C}$) ar putea induce carbonizarea frunzelor și ofilirea butașilor. Pentru a evita acest fenomen plantele se aclimatizează în încăperi mai umbrite și mai răcoroase la temperatura aerului de $20-25^\circ\text{C}$. Paletele de cultură pot fi păstrate în seră cu capacele slăbite, transparente, sau acoperite cu folii de polietilenă plantele pot fi lăsate în umbră naturală difuză pentru 3-6 zile, pentru a se adapta la condițiile noi de mediu, în prima săptămână după transplantare. Aclimatizarea eficientă a murului s-a efectuat în 3 etape în decursul a 40-50 de zile: **Etapa a I-a**). Plantulele s-au transferat în paletele cu 104 celule cu un volum de 25-30 ml sub folii timp de 10 zile până apar primele 2 frunzulițe la apexul plantei. Aerisirea se face de 2-3 ori pe zi, se pulverizează cu apă deionizată și se menține temperatura aerului de $23-25^\circ\text{C}$ (Figura 3.28.).

Etapa a II-a). Plantele s-au transferat în containere cu celule mai mari de 125-155 ml, în substrat steril din sol de gazon și turbă comercială în raport 1:1. Pentru o dezvoltare mai eficientă a rădăcinii, tulpinii și frunzelor, paletele nu se acoperă cu peliculă sau capace transparente. Se respectă regimul de temperatură a aerului de $20-25^\circ\text{C}$ și se reduce treptat din umiditate. Această etapă a durat 15-20 de zile în spațiu protejat și umbrit, dar în care s-a ridicat ușor gradul de iluminare (Figura 3.30.).

Etapa a III-a). Paletele cu plantule de mur, care au atins 8-10 cm în lungime cu 6-8 frunze formate, le-am transferat pe un substrat alcătuit din sol de gazon, turbă, nisip, în proporții de 1:1:0,25:0,25, în vase vegetative cu volumul de 500 ml, în condiții de soare, dar cu un carcas de pânză, amplasat în așa mod ca soarele să pătrundă doar dintr-o direcție. Pentru aclimatizarea definitivă, plantele se mențin timp de 15-20 de zile (Figura 3.28.).

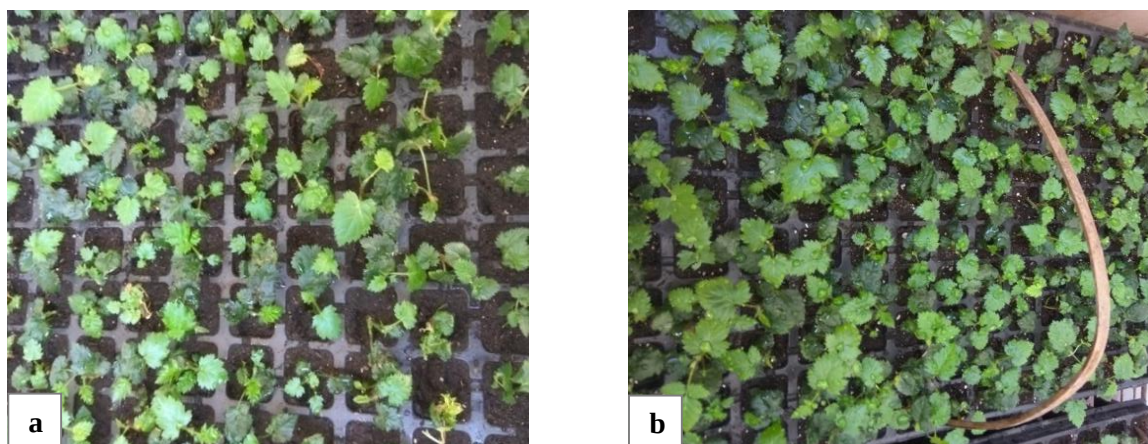


Fig. 3.28. Plantule în I-a și a II-a etapă de aclimatizare.

Notă: **a** – soiul ‘Arapaho’, **b** – soiul ‘Triple Crown’

Pe parcursul etapei a III-a pentru o dezvoltare normală se recomandă administrarea îngrășămintelor organice universale cu un conținut organic de NH_4NO_2 de 7%, P_2O_5 de 10%, K_2O – 12%. Administrarea fertilizanților s-a făcut în zona rădăcinii, o dată la 14 zile, în concentrația de 1%, și foliar odată în lună în concentrația de 0,5 %, tratamentele fitosanitare cu fungicide și tratamente cu soluții nutritive s-au efectuat cu scopul de a favoriza creșterea plantei în ansamblu și dezvoltarea sistemului radicular.



Fig 3.29. Plantule ale soiului ‘Chester’.

Notă: **a** – înrădăcinarea în substrat de perlit, **b** – în etapa a III-a de aclimatizare

Un alt factor important este protejarea de dăunători deoarece plantele după 25 zile de aclimatizare se expun riscului de a fi atacate de dăunători, fiind fragede și atractive. Unul din dăunătorii plantelor tinere de mur este musculița albă de seră (*Trialeuroides vaporariorum*).

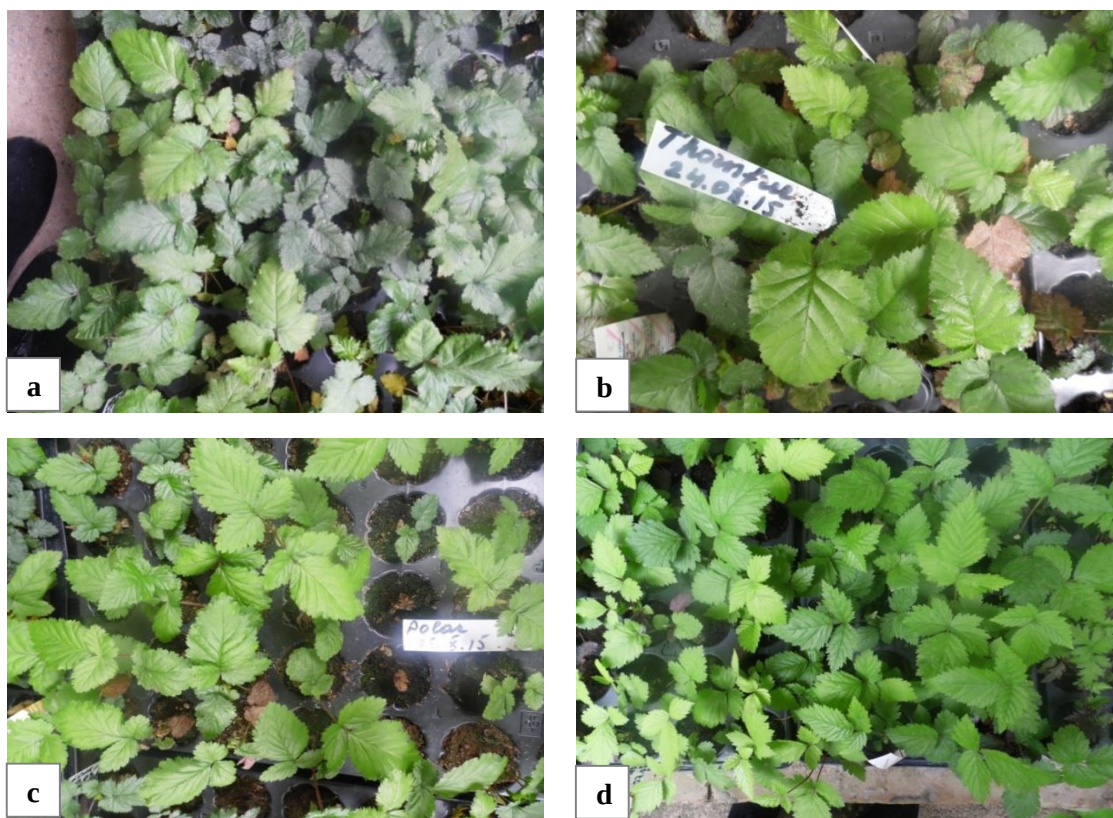


Fig. 3.30. Soiuri de mur în etapa a II-a de aclimatizare.

Notă: a – ‘Black Satin’, b – ‘Thornfree’, c – ‘Polar’, d – ‘Loch Ness’.

Pentru protejarea împotriva dăunătorilor s-a utilizat preparatul „Actara”, însă nu se recomandă udarea plantelor în a doua jumătate a zilei, deoarece, noaptea se multiplică intensiv sporii ciupercii (*Mycosphaerella rubi*) [58, 117, 157].

Menționăm că, aceste soiuri de mur sunt afectate doar în perioada de aclimatizare de unele boli și dăunători pe când la plantele transferate în câmp nu s-au depistat boli și dăunători pe o perioadă de 5 ani (perioada de cercetare a plantulelor).

Conform datelor din tabelul 3.10 putem afirma că adaptabilitatea plantelor prezintă o rată mai scăzută în primele luni ale anului (ianuarie, februarie) variind între 80 și 92 de plante. De menționat că, în luna martie crește viabilitatea plantelor aclimatizate de la 93 până la 97,7 plante. Iar în luna aprilie gradul maxim de viabilitate revine soiului ‘Reuben’ (98,2). În luna mai pentru toate soiurile este caracteristic gradul de viabilitate mai mare de 95 plantule cu excepția soiurilor: ‘Triple Crown’ (93,3) (Figura A. 6.11., ‘Thornfree’ (Figura A.6.4.) și ‘Black Satin’ (Figura A. 6.8.) – fiecare cu 94 (Tabelul 3.10.) (Figura A. 6,3., 6,5., 6,10.).

Tabelul 3.10.
Viabilitatea diferitor soiuri de mur în funcție de luna anului

Nr. d/o	Lunile anului	Denumirea soiului și gradul de viabilitate (%)									
		‘Arapaho’	‘Loch Ness’	‘Triple Crown’	‘Polar’	‘Black Satin’	‘Thornless Evergreen’	‘Reuben’	‘Chester’	‘Thornfree’	‘Smothstem’
		m±n	m±n	m±n	m±n	m±n	m±n	m±n	m±n	m±n	m±n
1.	Ianuarie	83,33±0,09	85,25±1,7	84,33±0,13	81,33±0,07	84±0,5	84,5±2,51	92,5±2,0	80,5±1,29	85±0,13	89,5±1,29
2.	Februarie	90,67±0,167	92,0±1,4	84,67±0,13	88,67±0,09	86±0,33	90,0±1,4	92,5±1,2	89,7±0,5	85,67±0,14	93,5±1,2
3.	Martie	88,67±0,1	91,7±1,7	90,67±0,08	86,67±0,11	92,00±0,5	91,2±1,2	95,2±1,7	89,7±1,7	91,33±0,08	97,7±0,9
4.	Aprilie	93,00±0,07	96,5±1,2	92,00±0,054	92±0,09	94,00±0,9	95,2±1,2	98,2±0,9	95,2±0,9	94±0,05	97,7±1,2
5.	Mai	95,67±0,09	96,7±0,5	93,33±0,08	95±0,05	94,00±0,33	96,7±0,9	98,7±0,5	96,5±0,5	94,00±0,05	98,5±0,5
6.	Iunie	96,33±0,07	98,5±0,5	96,00±0,052	92,33±0,068	96,00±0,29	98,7±0,5	98,2±0,9	98,70±0,5	94,67±0,015	98,2±0,9
7.	Iulie	96,00±0,067	99,5±0,2	96,67±0,03	96,33±0,065	92,00±0,39	99,5±0,5	99,2±0,5	98,5±1,0	95,33±0,06	98,5±0,5
8.	August	99,00±0,025	98,5±0,5	98,33±0,03	97,33±0,039	92,00±0,5	99,5±0,5	98,7±0,5	99,7±0,5	98,33±0,039	99,2±0,5

Notă: m – media, n – abaterea

*Calcululele s-au efectuat pe loturi de o sută de plantule.

De menționat că, în lunile iunie, iulie și august pentru majoritatea soiurilor analizate gradul de viabilitate este maxim (96-99), cu excepția soiului ‘Polar’ (92,33) și ‘Thornfree’ (94,17) în lunile iulie și august. Viabilitate mai mare de 99 plantule a fost stabilită pentru soiurile: ‘Loch Ness’(Figura 3.31, A.6,6), ‘Thornless Evergreen’, ‘Reuben’(Figura A.6,9). (luna iulie) și ‘Chester’(Figura A. 6,7), ‘Smoothstem’, ‘Thornless Evergreen’ (luna august) (Figura A. 6,1).

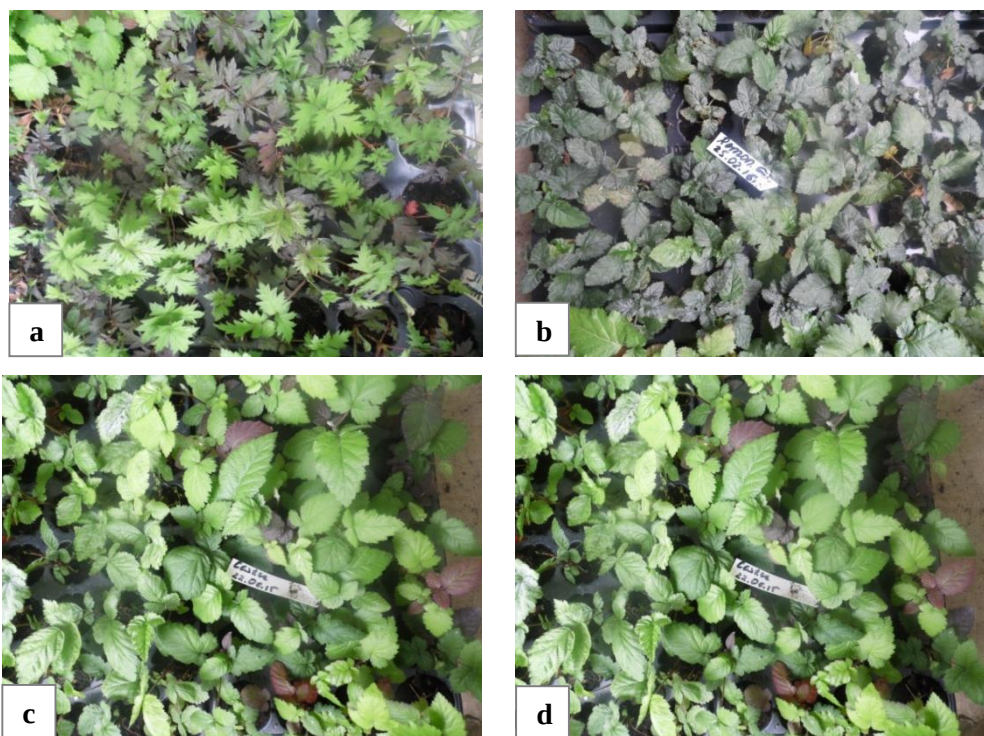


Fig. 3.31. Soiuri de mur în a III-a etapă de aclimatizate.

Notă: **a** – ‘Thornless Evergreen’, **b** – ‘Reuben’, **c** – ‘Loch Ness’, **d** – ‘Chester’.

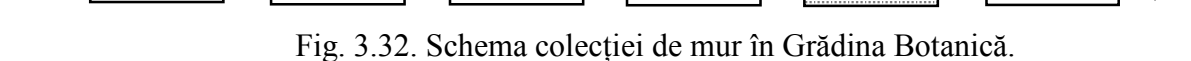
Putem afirma că procesul de aclimatizare la soiurile studiate parcurge în mod normal 3 etape, toate soiurile posedă potențial de aclimatizare (peste 90 de plantule), soiurile ‘Chester’, ‘Loch Ness’, ‘Thornless Evergreen’, ‘Reuben’ s-au evidențiat cu cea mai sporită rată (mai mare de 98 de plantule) în lunile iulie și august (Figura A. 5,1, Figura A. 6,12) .

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

Acțiunea de înființare a unei plantații de mur este de importanță majoră [1, 4, 6, 15]. Pe lotul experimental al GBNI plantația este fondată, cu scopul de a colecționa și diversifica cele mai valoroase și productive soiuri introducente de mur (Figura 3.32). În primăvara și toamna anului 2014 s-au plantat soiurile de mur fără spini luate în cercetare, ulterior completată în anul 2015 [25].

Înființarea colecției de mur în GBNI a fost inițiată cu selectarea terenului. S-a ales un lot adăpostit de vânturi puternice, situat în apropierea unor fâșii de arbori (zizifus, tei, nuci). La fel s-a ținut cont de prezența surselor de apă pentru irigare.

A diagram of a 1D lattice with six sites labeled P_1 to P_6 . P_1 and P_6 are white boxes with upward arrows. P_2, P_3, P_4, P_5 are hatched boxes.



Pregătirea solului și plantarea Este necesar să se testeze pH-ul solului, cu șase luni înainte

Materialul săditor, obținut din vitroculturi, de 1-2 ani, cu 2-3 tulpini de 20-40 cm care ulterior

mraniță, 50 g de superfosfat și 20 g de sare potasică sau 60 g de îngrășămintă chimice complexe (N.P.K.) [33, 40, 48]. Adâncimea plantării se stabilește astfel ca solul să acopere numai partea tulpinii care a fost în sol anterior. După plantare, solul s-a udat cu 5-6 l de apă la fiecare plantă.



Fig. 3.33. Colecția de arbuști de mur din GBNI, 20 iunie 2018

3.6. Particularitățile agrotehnicii cultivării în câmp

Plantarea. Rădăcinile tufei trebuie menținute în umezeală până se plantează, sau se țin înfășurate într-un manșon umed. Coroana (care începe din punctul din care pornesc tulpinile și rădăcinile) trebuie plasată la 3 cm sub nivelul solului. După plantare, solul se bătătorește bine pentru a înlătura eventualele găuri de aer din jurul rădăcinilor. Imediat după plantare se udă bine. O lucrare de întreținere importantă este fertilizarea care se face primăvara devreme, când începe procesul de dezvoltare și din nou vara, imediat după recoltarea fructelor [47, 48, 83].

Pentru ca tufa de mure să fructifice, se aplică fertilizatorul ecologic până cel târziu în iulie, pentru a evita creșterea forțată a lăstarilor târzii care vor fi afectați de frigul iernii. În primii doi ani, perioada în care rădăcinile se dezvoltă complet, fertilizator se distribuie în jurul bazei tufei, pe o rază de 30 cm.

Tufa de mur necesită umiditate abundentă pe perioada de dezvoltare și coacere a fructelor. Dacă nu plouă suficient, este necesar de efectuat irigația. Cantitatea minimă de apă necesară unei plante mature de mur este de 7-8 litri de apă pe zi, în perioada de dezvoltare a fructelor. Acoperirea

bazei plantei cu paie, talaș, resturi de lemne sau coceni de porumb ajută la controlul buruienilor și la păstrarea umidității și a substanțelor nutritive. Tufele de mur necesită afânare, care se efectuează atent și des, sau se acoperă foarte bine cu paie pentru ca să nu fie atacate de buruieni. Odată ce s-a pornit creșterea, buruienile sunt dificil de controlat. Prășitul începe primăvara, imediat ce pământul poate fi lucrat și se face de câte ori e nevoie pentru a preveni apariția buruienilor. Se evită săparea foarte adâncă, pentru a nu afecta rădăcinile. Nu se recomandă de afânat pământul din jurul bazei cam cu o lună înainte de sosirea sezonului rece (mai ales a înghețului).

După plantare se recomandă de executat următoarele lucrări:

- prelucrarea solului pentru distrugerea buruienilor, mecanic între rânduri și manual de-a lungul rândului, prin prășire;
 - fertilizarea anuală cu îngrășăminte organice aplicate pe rigole de-a lungul rândului.
- Dozele de fertilizare se stabilesc în funcție de fertilitatea terenului și starea de aprovizionare a plantelor, respectiv de rezultatele analizelor de sol și ale diagnozei foliare;
- irigarea s-a efectuat prin aspersiune, asigurând la fiecare udare 8-10 litri de apă pentru fiecare tufă, se recomandă 6-10 aplicații în funcție de precipitațiile căzute.

Susținerea plantelor. Susținerea și conducerea plantelor la murul fără spini s-a făcut pe spalieri cu trei rânduri de sârme pentru soiurile repente ('Thornless Evergreen', 'Thornfree') și semierecte ('Loch Ness', 'Chester', 'Triple Crown', 'Black Satin', 'Smoothstem'), și 2 rânduri de sârme pentru soiurile erecte ('Arapaho', 'Polar'). Prima sârmă se fixează la 80 cm față de sol, iar următoarele două la câte 50 cm una de cealaltă. Tulpinile se dispun și se leagă de sârme în evantai, distanțate între ele la minimum 15 – 20 cm. Distanța dintre doi spalieri pe rând este de 6 m.

Tăierile la mur

Prima tăiere. Se efectuează odată cu dezvoltarea primelor ramuri – numită tăiere de formare, decisivă pentru dezvoltarea de mai departe a murului. Operațiunea are un rol selectiv fiind eliminate ramurile fragile și bolnave. Pornind de la baza plantei se aleg unul sau doi lăstari viguroși, care anul următor vor fi de rod, acești lăstari pornesc din mugurii amplasați în rădăcina arbustului [144].

Tăierile succesive. Începând cu anul doi de vegetație planta este mult mai dezvoltată și viguroasă. Tăierile de fructificare au loc similar primului an. Tăierile din anul doi au rol de a contribui semnificativ la creșterea, dezvoltarea plantelor, pregătindu-le pentru fructificare pentru anii 3, 4, 5 etc. Primăvara cât mai timpuriu, se face analiza tufei și în funcție de vigoarea lăstarilor din anul precedent se mărește sau se micșorează încărcătura arbustului. Astfel vor fi aleși un număr suficient, respectiv 4-6 tulpini.

Tăierile de rărire a tufei. Pentru mur este benefică alegerea din vară (iulie) a lăstarilor pentru rodul anului viitor. Din lungime se reduce până la 1/3. Practic se elimină vârfurile nematurizate sau degerate. Iar când se urmărește eşalonarea coacerii, se taie la lungimi diferite. Imediat ce a fost cules şi ultimul fruct, vara, se taie toate ramurile bătrâne. Tot atunci este un moment bun de a înlătura şi lăstarii tineri (de un an) care sunt de prisos şi fragili.

Regula generală de tăiere este de a înlătura toate ramurile care deja au intrat în rod anul curent, acestea fiind uşor de recunoscut după culoarea brună a lemnului. Această operaţiune se efectuează toamna, dacă nu s-a reuşit se poate de efectuat primăvara. Arbuştii de mur cu creştere repentă ('Thornless Evergreen'), semierectă trebuie antrenaţi şi legaţi pe spaliere [93]. Tufele cu ramuri erecte nu au nevoie să fie legate dacă sunt tăiate vara astfel încât să nu depăşească 91-120 cm înălţime; ramurile lungi pot fi antrenate pe spaliere cu sârma. Spalierul se construieşte din doi piloni, înfipti în pământ cu 6 metri distanţa între ei, între care se întinde sârma. Pentru tufele drepte e destul un singur fir de sârma, prins la 70 cm de la nivelul solului. Pentru tufele semi-căţăătoare se folosesc doua sau trei sârme prinse la 90 şi respectiv 150 cm de la sol.

La soiurile de mur cu ramuri drepte ('Arapaho', 'Polar'), se recomandă să fie tăiaţi lăstarii noi care vegetează de la baza tulpinii [75, 76]. În timpul perioadei de vegetaţie este de dorit ca lăstarii să nu aibă mai mult de 30 cm. Când lăstarii noi cresc mai mult de atât, se înlătură vârfurile – acestea vor forţa ramificarea inferioară pe ramuri, lucru care va întări lemnul şi va face tufa să suporte mai uşor greutatea fructelor. Pe timpul iernii, ramurile laterale se scurtează până la 30-35 cm de la pământ, iar iarna târziu se taie ramurile uscate.

Tufele de mur semi-căţăătoare ('Loch Ness', 'Chester', 'Triple Crown', 'Black Satin', 'Thornfree', 'Smoothstem') necesită antrenate pe spalier şi legate cu sfoară moale (Figura 3.34.). În general, în primul sezon recolta este mică. Dacă tufa nu se dezvoltă prea mult în această primă perioadă, se taie ramurile până la 5-10 cm iarna târziu pentru a forţa apariţia unora mai viguroase. Din cel de-al doilea an şi în cei care vor urma, lăstarii creşte mai viguroşi. Ei trebuie legaţi pe spaliere când au 1,2-1,6 metri [145].

Tăierea ramurilor bătrâne este o operaţiune foarte importantă pentru prevenirea bolilor. După recoltare, se recomandă înlăturarea ramurilor fragile sau bolnave, lăsând numai 4-8 lăstari tineri; aceştia se leagă pe spalier în formă de evantai (Figura 3.34). Primăvara se scurtează orice lăstar nou până la 30 de cm. Solul se întreţine ca ogor negru iar la 2 ani se aplică 1 kg gunoi/metru pătrat. Se fertilizează cu must de gunoi 3-4 l/plantă (1 parte must şi 4 părţi apă).

Protejarea împotriva îngheţului. Se efectuează în zonele unde în cursul iernii temperatura minimă absolută coboară sub -15°C în mod frecvent şi pe o durată de timp mai mare de 24 de ore. În acest caz, tulpinile de rod se desfac de pe sârme, se dirijează de-a lungul rândului cât mai

aproape de sol, se fixează din loc în loc cu brazde de pământ, apoi se acoperă cu paie, resturi vegetale sau fâșii de folie de polietilenă termoizolantă. Cu această ocazie se taie de la sol și tulpinile care au rodit în cursul vegetației (în mod automat, acestea se usucă după fructificare). Primăvara devreme, tulpinile protejate se descoperă, se aplică tăierile de rodire și se leagă de sârme



Fig. 3.34. Modelarea murului pe spalier, sub formă de evantai.

Pe lotul experimental s-au plantat pentru cercetare dar și pentru sporirea fondului de germoplasmă 10 soiuri de interes economic, obținute prin vitroculturi.

Dintre soiurile cercetate, necesită legare și atârnare pe spalier mai compact soiurile ‘Arapaho’ și ‘Polar’; sub formă de evantai soiurile ‘Triple Crown’, ‘Loch Ness’, ‘Black Satin’, ‘Chester’, ‘Thornfree’, ‘Thornless Evergreen’, ‘Smoothstem’; nu necesită aceste operațiuni soiul ‘Reuben’. Plantarea în rând: 1,0 m distanță între plantele ce aparțin soiurilor erecte (‘Arapaho’, ‘Polar’, ‘Reuben’); 2,0 m distanță între plantele semierecte și repente (‘Triple Crown’, ‘Loch Ness’, ‘Black Satin’, ‘Chester’, ‘Thornfree’, ‘Thornless Evergreen’, ‘Smoothstem’) (Figura 3.36). Soiurile de mur necesită 5 prășiri (afânare, dezburuienerizare) anuale obligatorii în lunile mai, iunie, iulie, august, septembrie. Irigarea este necesar de efectuat în lunile toride: iulie; august; septembrie (prima decadă). Tăierile se efectuează la toate soiurile conform normelor și cerințelor.

Recoltarea fructelor. Soiurile de mur studiate se caracterizează cu perioade diferite de maturare și înflorire ceea ce permite recoltarea eșalonată, de la diferite soiuri. Recoltările cele mai timpurii sunt caracteristice soiurilor: ‘Arapaho’, ‘Reuben’, semitardive (‘Triple Crown’, ‘Loch Ness’, ‘Polar’, ‘Black Satin’); mai tardive (‘Thornless Evergreen’, ‘Chester’, ‘Smoothstem’, ‘Thornfree’) (Figura 3.35.). Recoltarea murelor cu ramuri drepte începe în a doua decadă a lunii iunie și durează până la sfârșitul lunii octombrie; fructele tufelor semierecte nu încep să se coacă decât în după a doua decadă a lunii iulie (Tabelul 3.11.).



Fig. 3.35. Fructe de mur ('Thornless Evergreen', 21 august 2016).

Fructele de mur se culeg când sunt de culoare negricioasă [48, 77]. Recoltarea fructelor se efectuează din 3 în 3 zile, în momentul când acestea se desprind ușor. Recoltarea se efectuează în prima jumătate a zilei în perioada mai răcoroasă este de dorit dimineața devreme (de la orele 4 până la orele 10). Fructele se plasează în casonete de plastic sau de carton cu volum maxim de 500 ml. Casonetele trebuie să fie prevăzute cu orificii. Imediat sunt transferate într-o încăpere răcoroasă, unde sunt plasate în combine frigorifice. Temperatura de păstrare în stare proaspătă este 1°C, pe o durată de maxim 10 zile, congelate pot fi păstrate pe o durată de câteva luni.

În funcție de zonă, maturarea se declanșează din prima decadă a lunii iulie și durează până la finele lunii octombrie. În condițiile aplicării tuturor verigilor tehnologice prezentate se pot obține 8-16 tone fructe proaspete, în funcție și de potențialul biologic al soiului [49, 151].

Tabelul 3.11.
Calendarul coacerii și recoltării fructelor de mur

Nr. d/o	SOIUL	IUNIE			IULIE			AUGUST			SEPTEMBRIE			OCTOMBRIE		
		Decade														
		I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
1.	‘Arapaho’															
2.	‘Polar’															
3.	‘Loch Ness’															
4.	‘Triple Crown’															
5.	‘Black Satin’															
6.	‘Thornfree’															
7.	‘Smoothstem’															
8.	‘Chester’															
9.	‘Thornless Evergreen’															
10.	‘Reuben’															

Tehnologia de multiplicare a murului *in vitro* presupune parcurgerea următoarelor etape: elaborarea mediilor nutritive optime aplicând formule speciale de nutrienți; aseptizarea; inocularea; micropropagarea; microclonarea vitroplantulelor de mur. Urmează procesul *ex vitro*, care se efectuează pe substraturi testate în 3 etape de aclimatizare. Plantulele aclimatizate cu sistem rizogen bine dezvoltat pot fi transferate în teren deschis. Etapele tehnologice de multiplicare *in vitro* la soiurile de mur fără spini este prezentat în Figura 3.36.

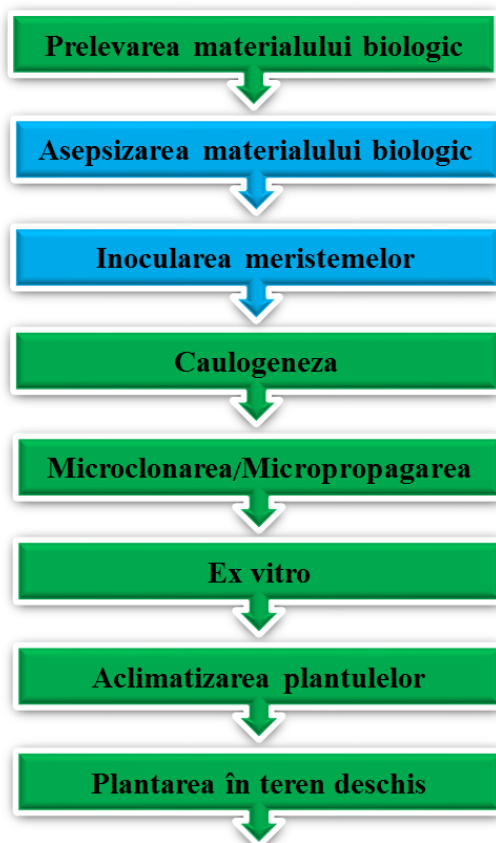


Fig. 3.36. Schema tehnologiei de multiplicare *in vitro* la soiurile de mur fără spini.

3.7. Concluzii la capitolul 3

1. S-au determinat caracteristicile biologice, fizice și chimice pentru cultura *in vitro* la soiurile de mur fără spini. În rezultatul testărilor s-a evidențiat clorura de mercuriu 0,1% ca sterilizant optim, timp de 7 minute pentru toate soiurile.

2. S-a stabilit că inoculii apicali și laterali ai fragmentelor de lăstari au condus la declanșarea proceselor de caulogeneză la soiurile: ‘Arapaho’– 77,8; ‘Triple Crown’– 72,2; ‘Chester’ – 83,33 ‘Loch Ness’ – 80,6, ‘Thornless Evergreen’ – 55,6%; ‘Smoothstem’ – 66,7%; ‘Polar’, ‘Thornfree’ – 61,0%; ‘Reuben’ – 88,9%; ‘Black Satin’ – 77,8%; ulterior fiind utilizate în calitate de material biologic pentru microclonare.

3. Mediul nutritiv de bază a fost MS 100% modificat: agar – 5 g/l, mioinozitol – 50 mg/l, acid ascorbic – 10 mg/l, BAP – 0,5 mg/l, zaharoză – 30 g/l, pH 5,8, care a fost suplinit cu diferiți regulatori de creștere în diferite doze și combinații. Din formulele hormonale testate au fost selectate 11 medii nutritive cu balanță hormonală optimă. Formulele hormonale pentru mediile nutritive Nr. 2 și Nr. 3; utilizate la fiecare etapă (inoculare, calusogeneză, microclonare, micropropagare, rizogeneză) au fost precizate pentru fiecare soi în baza criteriilor de creștere și dezvoltare (numărul de lăstari proliferați, lungimea lăstarilor, rizogeneza lăstarilor). Un rol important în procesul de proliferarea abundentă a lăstarilor laterali, a manifestat regulatorul de creștere BAP în concentrație de 0,5 și 0,7 mg/l.

4. Concentrația de BAP – 2 mg/l, a avut un rol primordial regenerant, eficientă pentru obținerea organogenezei *in vitro* la soiurile studiate. Procesul organogen se inițiază la a 28-30-a zi după inoculare, cu – 10,2 plantule dezvoltate la soiul ‘Chester’ și – 9,4 ‘Black Satin’, cea mai mică rată de proliferare fiind la soiul ‘Polar’ de – 6,2 plantule per explant. Mediul cel mai eficient și optim pentru inducerea organogenezei la soiurile de mur a fost Nr.1 (BAP 2 mg /l).

5. S-a determinat că procesul rizogen poate fi indus pe medii nutritive, precum mediul de bază MS: MS 100% modificat; MS 100% modificat suplimentat cu auxine (AIB– 0,2 mg/l; AIA– 0,2 mg/l; NAA – 0,2 mg/l) și MS-50% modificat. Pe primele două variante de medii are loc dezvoltarea plantei și procesul rizogenetic și în care necesită butășire sporind rata de multiplicare de 4 ori, pe ultimul plantulele se înrădăcinează timp de 14 zile iar creșterea este mai diminuată cu 50 %, dovedindu-se rentabil, optim și eficient.

6. Aclimatizarea *ex vitro* cu succes s-a efectuat în 3 etape. Au fost testate și utilizate 3 tipuri de substrat: 1) substrat steril alcătuit din sol de gazon, turbă, perlit, nisip, în proporții de 1:1:0,25:0,25; 2) substrat steril din sol de gazon și turbă comercială în raport 1:1, 3) substrat alcătuit doar din turbă comercială. Soiurile ‘Chester’, ‘Loch Ness’, ‘Thornless Evergreen’, ‘Smoothstem’, ‘Reuben’, ‘Polar’, ‘Smothstem’, ‘Triple Crown’, ‘Blak Satin’ cu succes pot fi aclimatizate cu o rată de viabilitate de 99%. Cea mai potrivită perioadă de aclimatizare sunt lunile de primăvară-vară.

7. S-a înființat colecția de arbuști fructiferi pe loturile experimentale ale GBNI în baza unor criterii complexe: capacitatea de adaptare, productivitatea sporită și calitatea înaltă a fructelor. Soiurile se deosebesc după habitus (erecte, semierecte, repente); gradul diferit de vigurozitate, perioade eșalonate de coacere a fructelor; calitățile gustative; aspectul comercial atractiv, rezistența la secetă, ger, boli și dăunători. Distanța de plantare 2,0 m×1,5 m (soiurile semierecte și repente) și 2,0×1,0 m (soiurile erecte).

4. PARTICULARITĂȚILE MORFO-ANATOMICE ȘI BIOCHIMICE ALE SOIURILOR DE MUR

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

Soiul ‘Arapaho’

Arbustul – moderat de viguros, fără spini, productiv. Planta prezintă creștere erectă și compactă. Arbust de talie medie. Necesită susținere pe spalier (2 sârme) sau araci (Figura 4.1.).

Fructele – formă conică, dimensiuni mari, masa –6-7g la coacere, de culoare negricios, lucioase, gust dulcișor, ferme la manipulări și la transport, se păstrează bine și au aspect comercial atrăgător, coacere uniformă a bachelor. Este foarte apreciat de fermieri și antreprenori (Figura 4.1.).

Epoca de coacere – a doua decadă a lunii iunie până în prima decadă a lunii iulie (21 zile), este considerat soi timpuriu.

Particularitățile agrobiologice – rezistență sporită la geruri (-24°C), secetă, sensibil la boli [16].

Recomandări – plantații industriale, grădini mici, medii, mari și pentru amenajarea parcurilor.

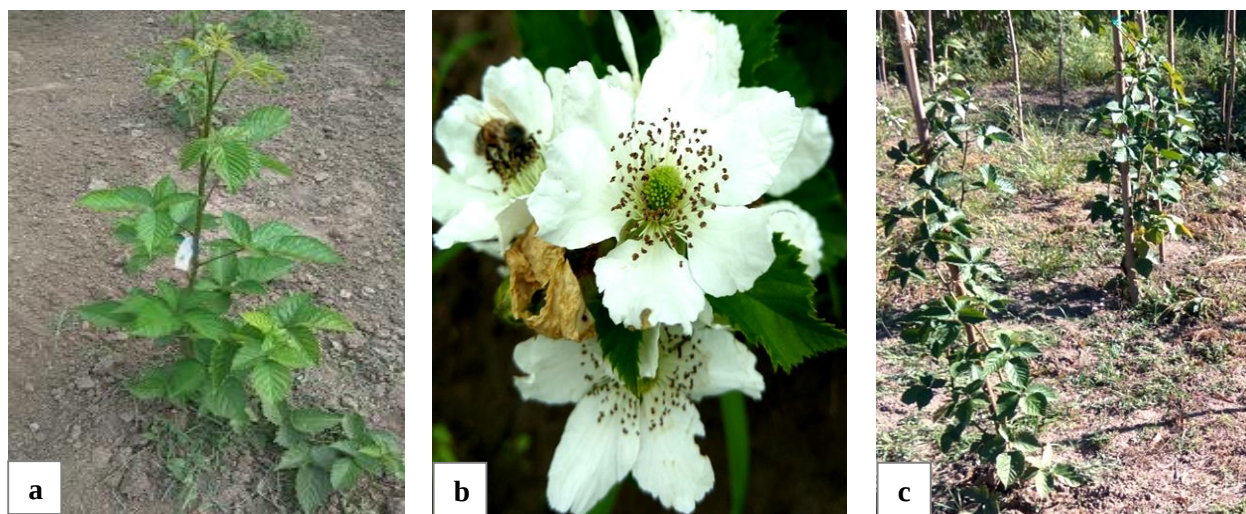


Fig. 4.1. Soiul ‘Arapaho’.

Notă: **a, c** – aspect general, **b** – inflorescență

Soiul ‘Triple Crown’

Arbust –viguros, robust, fără spini, foarte productiv (Figura. 4.2.). Planta prezintă creștere semierectă, necesită atașare pe spalieri, sub formă de evantai, formează lăstari lungi (3-6 m) viguroși. Considerat soi autofertil, rodește și în lipsa polenizării străine.

Fructele – mari, dulci care pot depăși 8-10 g, se caracterizează prin echilibrul bine ajustat al zahărului și acidității. Fructele sunt dulci, aromate, ferme, cu rezistența bună la manipulare și transport. Rodește din abundență (peste 15 t fructe/ha) în fiecare an, cu începere din al 2-a an de la plantare (Figura A 9.11.).

Epoca de coacere – din a doua decadă a lunii iulie până în prima decadă a lunii septembrie (45-50 zile), este considerat un soi semitimpuriu (Tabelul 4.1.).

Particularitățile agrobiologice – rezistență sporită la îngheț (-25°C), secetă, boli. În zonele mai reci este indicată protejarea plantelor cu paie sau folie în primii 2 ani de la plantare.

Recomandări – plantații industriale, grădini mici, medii, mari și pentru amenajarea parcurilor.

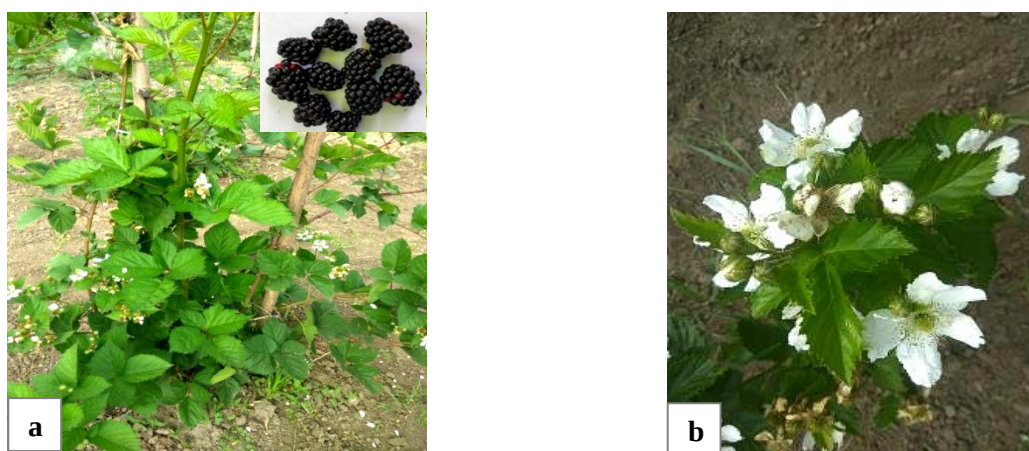


Fig. 4.2. Soiul ‘Triple Crown’: a – aspect general; b – arbust în perioada de înflorire

Soiul ‘Loch Ness’

Arbust – semiviguros, fără spini, productiv, talie medie, cu creștere semierectă, necesită atașare pe spalieri, sub formă de evantai, formează lăstari lungi (3 m), viguroși. Fiind soi autofertil, rodește în lipsa polenizării încrucișate.

Fructele – mijlocii-mari, masă – 8 g, formă cilindrică alungită, de culoare neagră lucioasă, ferme la manipulari și la transport, se păstrează bine și au aspect comercial plăcut, coacere uniformă a bacelor (Figura 4.3.). Foarte aromate, sunt apreciate de consumatori datorită gustului dulceag, ușor astringent (Figura A 9.8.).

Epoca de coacere – începând cu a doua decadă a lunii iulie până la sfârșitul lunii septembrie, este considerat un soi semitimpuriu (60 zile).

Particularitățile agrobiologice – rezistență sporită la îngheț (-27 °C), secetă, sensibilitate la rugină.

Recomandări – plantații industriale, grădini mici, medii, mari, și pentru amenajarea parcurilor.

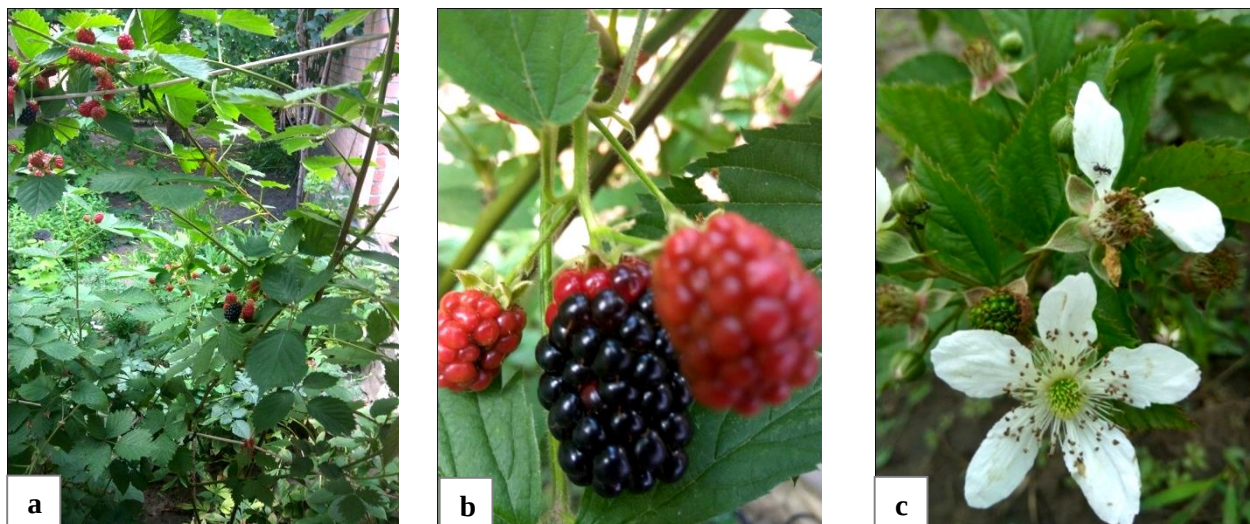


Fig. 4.3. Soiul 'Loch Ness'.

Notă: **a** – aspect general, **b** – fructe, **c** – inflorescență

Soiul 'Polar'

Arbust – creștere compactă, erectă cu lăstari semiviguroși (1,5-2,0 m), se conduce pe spalieri (2 sârme) sau araci. Arbustul este de talie medie. Productivitate sporită, care poate depăși 15-18 t/ha (Figura 4.4.).

Fructele – mari, cu masa de 8-10 g, de calitate înaltă, de culoare neagră lucioasă, ferme, zemoase și aromate. Fructele se coc uniform, sunt ovale, foarte aspectuoase.

Epoca de coacere – soi semitimpuriu, se recoltează începând cu mijlocul lunii iulie până în august, eşalonat (50 zile) (Figura A 9.9.).

Particularitățile agrobiologice – rezistență sporită la îngheț (-27 °C), secetă.



Fig. 4.4. Soiul 'Polar', aspect general.

Recomandări – plantații industriale, grădini mici, medii, mari, și pentru amenajarea parcurilor.

Tabelul 4.1. Caracteristica morfo-tehnologică ale unor specii și soiuri de mur fără spini

Nr. d/o	Soiul	Caractere biologice	Caractere morfo - tehnologice ale fructului	Epoca de maturare (luna)	Gradul de fermitate al fructului	Productivitatea kg/plantă	Adaptabilitatea în condițiile R. Moldova
1.	‘Arapaho’	viguros; tulpină erectă	masa – 6-7g; forma – cilindrică; gustul – dulce - acriu.	VI-VII	+++	3-5	creștere și dezvoltare bună; rezistent la ger, secetă, sensibil la boli.
2.	‘Triple Crown’	viguros; tulpină semierectă	masa fructului – 8-10g; forma ovală; gustul – dulceag	VII-VIII	+++	8-10	creștere și dezvoltare bună; rezistent la secetă și ger, boli.
3.	‘Loch Ness’	viguros; tulpină semierectă	masa fructului – 8g; forma – cilindric-alungită; gustul – dulceag, ușor astringent	VII-VIII	+++	8-10	creștere și dezvoltare bună; rezistent la ger, secetă, sensibil la rugină.
4.	‘Polar’	viguros moderat; tulpină erectă	masa fructului – 8-10g; forma - ovală; gustul – dulceag, ușor astringent	VII-VIII	+++	5-7	creștere și dezvoltare bună; rezistent la ger, secetă.
5.	‘Black Satin’	viguros; tulpină semierectă	masa fructului – 5-7g; forma - ovală; gustul – dulceag, ușor astringent	VII-IX	++	12	creștere și dezvoltare bună; rezistent la ger, secetă, boli.
6.	‘Thornless Evergreen’	viguros; tulpină repentă	masa – 4-5g; forma – sferică; gustul – dulce;	VII-IX	++	4-5	creștere și dezvoltare bună; rezistent la secetă și ger, boli.
7.	‘Reuben’	viguros moderat; tulpină erectă	masa fructului – 10-11g; forma - ovală; gustul – dulce, acrișor.	VI-IX	+	6-8	creștere și dezvoltare bună; rezistent la ger.
8.	‘Chester’	viguros moderat; tulpină semierectă	masa – 5g; forma – oval- sferică; gustul – dulce - acriu.	VIII-IX	+++	8	creștere și dezvoltare moderată; rezistent la ger, sensibil la secetă.
9.	‘Thornfree’	viguros; tulpină semierectă	masa fructului – 5g; forma – ovală; gustul – dulceag-acru	VII-VIII	++	8-10	creștere și dezvoltare bună; rezistent la ger ,secetă, boli.
10.	‘Smoothstem’	viguros; tulpină semierectă	masa fructului – 5g; forma – conic-alungită; gustul – dulce, acrișor	VII-IX	++	3	creștere și dezvoltare bună; rezistent la ger ,secetă, boli.
11.	<i>Rubus candicans</i>	viguros; tulpină repentă.	masa fructului – 4g; forma – ovală; gustul – dulceag, ușor astringent.	VIII	+	0,5-1	creștere și dezvoltare bună; rezistent la secetă și ger.

Notă: gradul de fermitate al fructelor: + – redus; ++ – moderat; +++ – sporit

Soiul ‘Black Satin’

Arbustul – fără spini, cu creștere viguroasă, lăstari lungi (3-4 m). Necesită susținere pe spalieri, se conduce în evantai. Arbustul este de talie mare (Figura 4.5.). Productivitatea per plantă este 12 kg, 20 de tone la ha.

Fructele – mijlocii, de fermitate redusă la transport și manipulări, de culoare neagră, aspect mat, dețin aspect comercial plăcut, coacere uniformă a bachelor. Gust fin, foarte aromat, înalt apreciat de consumator.

Epoca de maturare – fructele se recoltează de la sfârșitul lunii iulie, iar recoltarea durează până la începutul lunii septembrie, este considerat soi cu coacere semitimpurie (50 zile) (Figura A 9.1.).

Particularitățile agrobiologice – rezistent la ger (-25 °C), moderat de rezistent la secetă, necesită irigare.

Recomandări – plantații industriale, grădini mici, medii, mari, și pentru amenajarea parcurilor.



Fig. 4.5. Soiul ‘Black Satin’.

Notă: a – aspect general, b – inflorescență, c – plantă cu fructe

Soiul ‘Thornless Evergreen’

Arbustul – fără spini, viguros, robust, cu port repent, frunzele se mențin verzi și iarna, lăstarii pot crește până la 4,0 m lungime. Necesită susținere pe spalier (3 sârme), în formă de evantai (Figura 4.6.). Productivitatea per plantă este de 4-5 kg, 15 tone la ha. Înflorire abundentă.

Fructele – masa 4-5 g, rezistente la transportat, de formă ovală, cu gust dulce, de culoare neagră lucioasă.

Epoca de coacere – fructele se recoltează de la începutul lunii august, iar recoltarea durează până la sfârșitul lunii septembrie, este considerat soi cu coacere semitardivă (50 zile).

Particularitățile agrobiologice – rezistent la ger (-25°C), rezistent la secetă, necesită irigare (Figura A 9.2., A 9.3.).

Recomandări – plantații industriale, grădini mici, medii, mari și pentru amenajarea parcurilor.

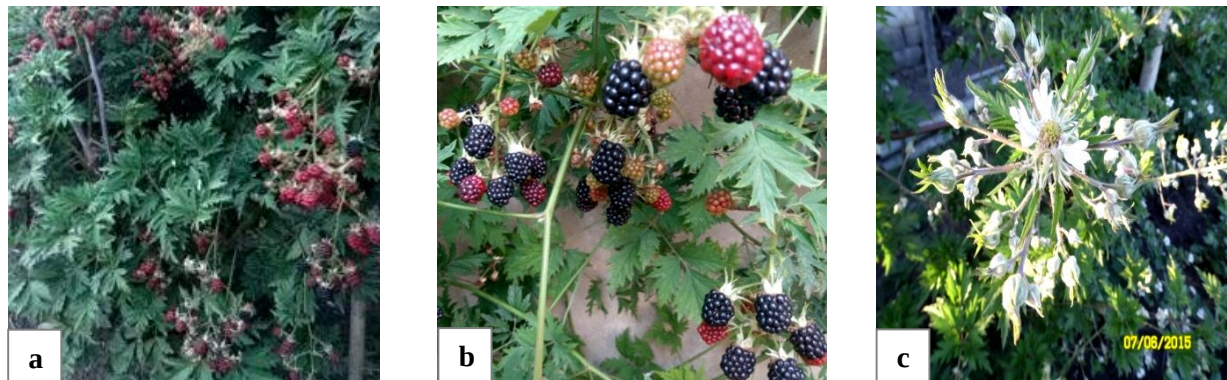


Fig. 4.6. ‘Thornless Evergreen’.

Notă: a – aspect general, b – fructe la diferite stadii de maturare, c – inflorescență

Soiul ‘Reuben’

Arbustul – remontant, moderat de viguros, port erect, cu spini rari, mici, ușor încovoiați, lăstarii pot ajunge la 1,0-1,5 m. Nu necesită susținere pe spalieri. Rodește abundant circa 6-8 kg/plantă (Figura 4.7. a, b).

Fructele – mari, masa 10-11 g, foarte dulci, zemoase, de fermitate scăzută, de culoare neagră, cu aspect mat.

Epoca de coacere – soi cu coacere eșalonată: fructele se recoltează de la începutul lunii iunie, până la sfârșitul lunii octombrie (Figura A. 9.6.).

Particularitățile agrobiologice – rezistent la ger (-25°C), rezistent la secetă, necesită irigare.

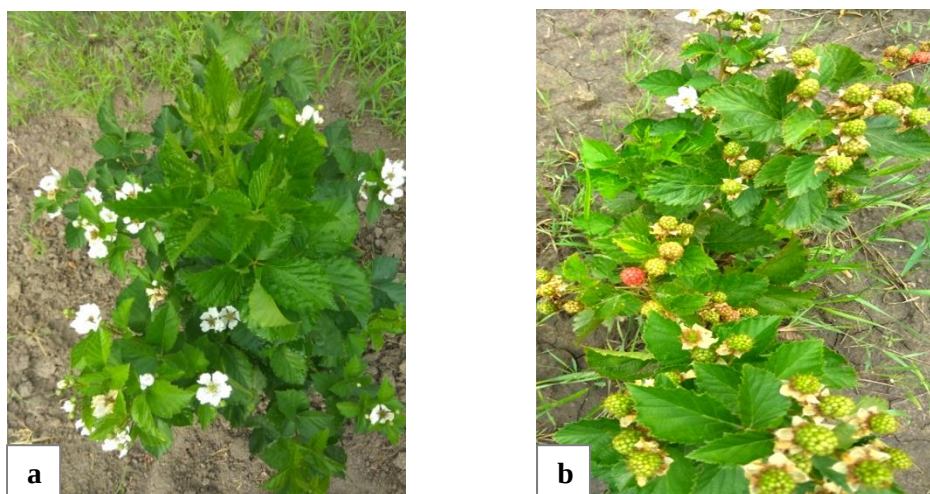


Fig. 4.7. Soiul ‘Reuben’.

Notă: a – aspect general; b – plantă cu fructe

Recomandări – plantații industriale, grădini mici, medii, mari, și pentru amenajarea parcurilor (Figura 4.7. a, b).

Soiul ‘Chester’

Arbustul – de talie medie, moderat de viguros, fără spini, cu creștere semierectă, lăstarii pot ajunge la 3-4 m lungime. Necesită susținere pe spalier (3 sârme) sau araci (fig. A. 9.4.). Productivitatea - 5-6 kg/tufă, 15-18 t/ha (Figura 4.8.).

Fructele – medii-mari, de formă oval-sferică; masa – 5-6g; gustul – dulce-acriu, fermitate pronunțată, foarte aromate, de culoare neagră, cu aspect mat, fiind unul dintre cele mai apreciate soiuri datorită gustului deosebit (Figura 4.8. b).

Epoca de maturare – este un soi semitardiv: coacerea fructelor este eșalonată din prima decadă a lunii august până toamna târziu la venirea înghețurilor (mai mult de 60 zile).

Particularitățile agrobiologice – rezistent la ger, adecvat condițiilor R. Moldova, rezistent la boli, moderat de rezistent la secetă, necesită irigație.

Recomandări – grădini mici, medii, mari și pentru amenajarea parcurilor.



Fig. 4.8. Soiul ‘Chester’.

Notă: **a** – plantă în perioada de înflorire, **b** – fructe, **c** – inflorescență

Soiul ‘Thornfree’

Arbustul – viguros, cu ramuri lungi fără spini, creștere repentă. Arbustul este de talie medie, cu frunze căzătoare, cu ramuri pendente. Necesită susținere pe spalier (3 sârme) sau araci. Înflorire medie (Figura 4.9.).

Fructele – medii, masa – 5 g; forma ovală; gustul – dulce-acriu, plăcut, ușor aromat, de culoare neagră, aspect mat.

Epoca de coacere – decada a II-a a lunii iulie – decada a II-a a lunii august (40 zile), (Figura A 9.7.).

Particularitățile agrobiologice – productivitate mare; rezistența foarte bună la ger, secetă și la atacul principalelor boli și dăunători.

Recomandări – grădini mici, medii, mari, și pentru amenajarea parcurilor.

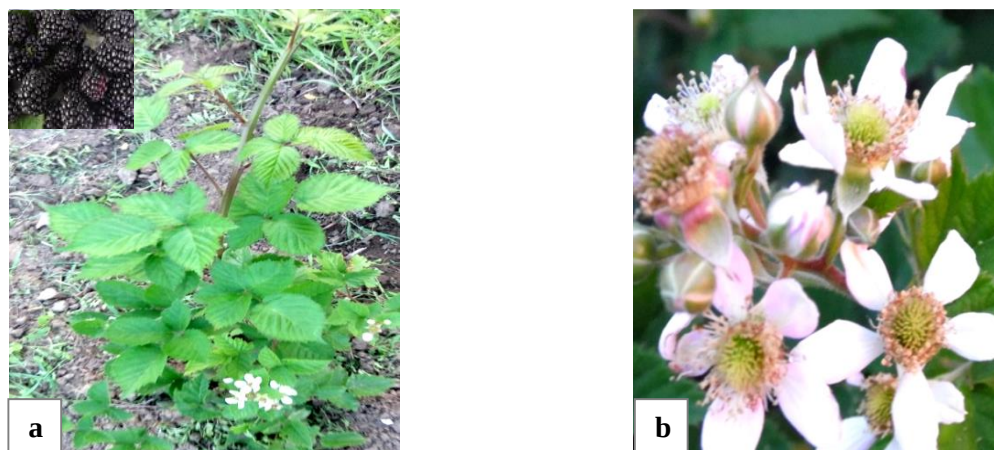


Fig. 4.9. Soiul 'Thornfree'.

Notă: **a** – arbust, fructe, **b** – inflorescență

Soiul 'Smoothstem'

Arbustul – viguros, creștere semierectă, ramuri lungi fără spini. Arbustul este de talie medie (Figura A 9.10, 4.10), înălțime la maturitate – 1,5-2,0 m. Necesită susținere pe spalier (3 sârme) sau araci. Înflorire medie.

Fructele – medii, forma conic – alungită, de culoare neagră, aspect mat, moderat de ferme la transport și manipulări, gust plăcut (Figura 4.10., b).

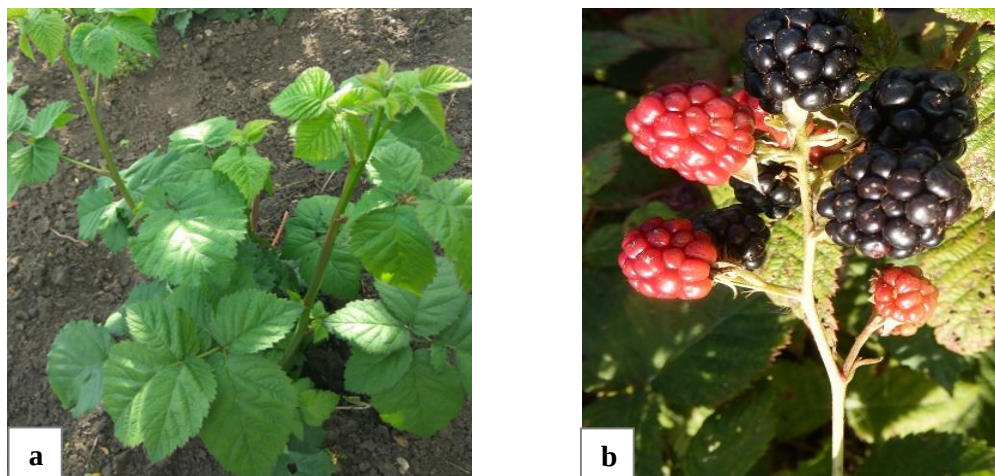


Fig. 4.10. Soiul 'Smoothstem'.

Notă: **a** – aspect general, **b** – fruct

Epoca de coacere – decada a II-a a lunii august – decada I-ea a lui septembrie.

Particularitățile agrobiologice – rezistență foarte bună la ger și la atacul principalelor boli și dăunatori (Figura 4.10., a, b).

Recomandări – grădini mici, medii, mari și pentru amenajarea parcurilor.

Specia *Rubus candicans*

Arbustul – de până la 1,5 m înălțime, neglandulos. Lăstarii arcuit-nutanți, muchiați, canaliculați, glaucescenți, glabrescenți până la tomentoși, cu peri semiadpreși; ghimpi puternici, cu baza lătită, falcați, pubescenti în jumătatea inferioară.

Fructele – negre-purpurii, cu aspect mat, de consistență redusă la manipulare și transport. Înflorește în lunile iunie-iulie.

Epoca de coacere – specie cu coacere semitardivă, fructele se recoltează pe perioada lunii august.

Particularitățile agrobiologice este o specie foarte rezistentă la ger în timpul iernii, se adaptează bine în toate zonele din R. Moldova, rezistentă la boli, slab productiv (Figura 4.11.).



Fig. 4.11. Plante cu flori ale speciei *R. candicans* (Weihe ex Reichenb.) A. et D. Löve

Soiurile de mur implicate în cercetare întrunesc mai multe caracteristici prin care se deosebesc: portul plantei (erect, semierect, repent), habitusul (viguroase, moderat de viguroase), perioada de maturare a fructelor, forma și dimensiunile fructelor, gradul de fermitate, gustul și aroma, productivitatea per plantă și la hectar. Soiurile de mur luate în studiu devin atractive și de interes datorită tipului de creștere: 3 din aceste soiuri sunt erecte ('Polar', 'Arapaho', 'Reuben'), 6 soiuri semierecte ('Loch Ness', 'Chester', 'Triple Crown', 'Black Satin', 'Thornfree', 'Smoothstem'), 1 soi repent ('Thornless Evergreen') (Figura A. 9.12).

Aceste soiuri prezintă diferit habitus și diferite perioade de coacere a fructelor: timpurii ('Arapaho', 'Reuben'); medii ('Triple Crown', 'Black Satin', 'Loch Ness', 'Thornless Evergreen'); moderat de tardive ('Thornfree', 'Polar', 'Chester', 'Smoothstem'). După gradul de fermitate al fructelor, cele cu fermitate sporită ('Arapaho', 'Triple Crown', 'Loch Ness', 'Thornless Evergreen', 'Thornfree', 'Polar', 'Chester') sunt destinate mai mult pentru comercializare în stare proaspătă în piețe și supermarketuri, cele cu fermitate scăzută ('Black Satin', 'Reuben') sunt prelucrate în

industria alimentară: gemuri, dulcețuri, lichioruri, sucuri, vin și utilizate în industria cosmetică și farmaceutică (tincturi, loțiuni, siropuri etc.).

Fructele se deosebesc după formă și masă: dimensiuni mari și medii – 5-6 g ('Chester', 'Thornfree', 'Thornless Evergreen', 'Smoothstem') și fructe cu dimensiuni și masă sporită – 7-10 g ('Triple Crown', 'Arapaho', 'Loch Ness', 'Reuben', 'Polar'). Valoarea soiurilor este apreciată prin prisma productivității per plantă: cele mai productive sunt soiurile 'Triple Crown', 'Loch Ness', 'Thornfree', 'Black Satin', 'Chester' (8-10-12 kg), soiuri de productivitate bună se consideră 'Reuben', 'Polar' cu 5-6 kg per plantă. Soiul 'Thornless Evergreen' prezintă o productivitate de 4-5 kg per plantă, iar 'Arapaho' și 'Smoothstem' – o productivitate per plantă de 3 kg. Soiurile mai atractive sunt cele rezistente la secetă și ger: 'Triple Crown', 'Arapaho', 'Black Satin', 'Loch Ness', 'Thornfree', 'Thornless Evergreen', 'Smoothstem'. Rezistența la atacul bolilor manifestă 'Triple Crown', 'Black Satin', 'Thornfree', 'Thornless Evergreen', 'Smoothstem'.

Soiurile selectate prezintă diferite perioade de coacere, începând cu a II-a decadă a lunii iunie până la sfârșitul lunii octombrie (140 zile), asigurând consumatorul cu fructe proaspete ce dețin diferite caracteristici tehnice și organoleptice (gustul, aroma, dimensiunea fructului, forma fructului, aspectul, fermitatea etc.).

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

Una din direcțiile primordiale de cercetare este mărirea potențialului adaptiv al plantelor de cultură [6, 13, 20, 21] și necesitatea creării soiurilor productive și cu rezistență complexă la maladii, dăunători, factorii nefavorabili ai mediului. În prezent a sporit atenția specialiștilor față de studierea mai multor specii ale genului *Rubus* [85-87, 90, 91], rezistența diferitor cultivaruri. Investigațiile ultrastructurale ale plantelor de cultură [13, 21, 72, 127, 153] denotă un plan de organizare celulară comun și confirmă principiul identității zonalității histologice a organelor cu anumite specificări structurale calitative și cantitative, care corelează cu apartenența sistematică a speciei [72, 101]. Studii științifice privind anatomia frunzelor de mur în literatura de specialitate practic nu se atestă.

A fost studiată anatomia frunzelor (pe secțiuni și preparate superficiale din material javelizat) la următorii taxoni de mur: specia *R. fruticosus*, soiurile de mur 'Arapaho' (soi erect), 'Chester', 'Thornfree' (semierecte) iar soiul 'Thornless Evergreen' (repent), aparține speciei *R. laciniatus* Willd.

Studiul anatomic al frunzelor la soiurile și speciile genului *Rubus*, care se deosebesc după origine, răspândirea geografică și rezistența la secetă și ger, este necesar pentru descrierea anatomiei și evidențierea structurilor anatomice cu caracter diagnostic pentru identificarea lor.

4.2.1. Descrierea anatomică a frunzelor taxonilor de mur studiați

Specia *R. candicans* (Weihe ex Reichenb.) A. et D. Löve. Analiza secțiunilor transversale și preparatelor superficiale (Figura 4.12) ale limbului frunzei arată că epidermele superioară și inferioară sunt unistratificate, alcătuite din celule bine împachetate, poligonale, cu pereții externi ușor îngroșați. Epidermele sunt acoperite de un strat de cuticulă, care ușor pătrunde printre celulele epidermale îndeosebi la cea superioară (Figura A 7.1). Pe preparatul superficial al epidermei superioare se observă celulele parenchimatice, lobate cu pereții celulari ondulați. Grosimea epidermei superioare este mai mare, comparativ cu cea inferioară. Celulele epidermei superioare sunt aplatizate orizontal. Ambele epiderme dezvoltă peri tectori unicelulari acoperiți cu membrană îngroșată, aranjați în mănunchi.

Pe preparatele superficiale ale limbului frunzei (vedere deasupra), perii au un aspect stelat (Figura 4.12., (d)). Pubescența este mai pronunțată pe epiderma inferioară, perii fiind distribuiți atât de-a lungul nervurilor, cât și pe toată suprafața limbului.

Menționăm prezența stomatelor cu 3 celule anexe, de tip anizocitic pe ambele epiderme, dar numeric mai mult pe cea inferioară și de dimensiuni mai mici. Mezofilul frunzei este diferențiat dorso-ventral, țesutul palisadic format din 2 rânduri de celule ușor alungite, bine aranjate sub epiderma superioară. Țesutul lacunos constă din celule parenchimatice lobate, cu spații intercelulare mari.

Mezofilul este străbătut de fascicule colaterale închise, proeminente pe suprafața inferioară a limbului, însoțite de teacă sclerenchimatică. În regiunea fasciculelor este dezvoltat țesut mecanic, care sub epiderma inferioară are configurația unui semi-inel, alcătuit din 2-3 rânduri de celule colenchimatice.

Un caracter specific este prezența celulelor cu druze de oxalat de calciu distribuite atât în lungul nervurilor, cât și dispersate în mezofil. Sub ambele epiderme pe secțiuni transversale în regiunea nervurilor se observă țesut mecanic de tip colenchim.

Soiul ‘Arapaho’. Frunzele acestui soi se caracterizează prin aceeași structură anatomică a limbului ca și ale speciei *R. candicans*, doar cu mici diferențe (Figura 4.13.). Epidermele la fel constau din celule compact aranjate, de formă ușor aplatizată. Menționăm prezența perilor tectori, unicelulari, însă solitari. Deosebim peri tectori scurți, drepți, iar la bază îngroșați și peri tectori lungi, ușor încovoiați incluși în soclu bazal. Celulele cu druze mari de oxalat de calciu din abundență sunt dispersate în limbul frunzei. Țesutul lacunos este bine dezvoltat (Figura A 7.2.).

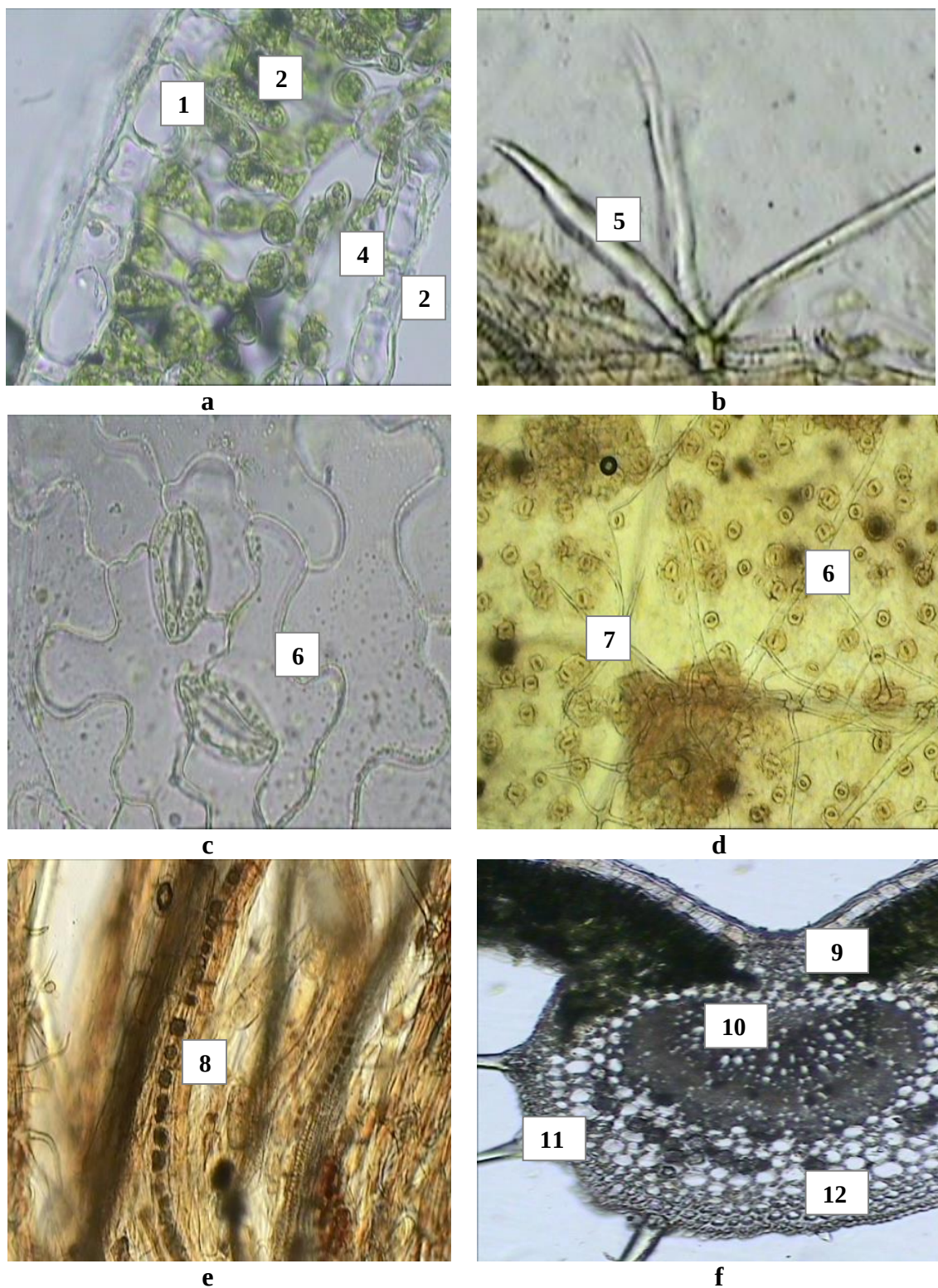


Fig. 4.12. Anatomia frunzei la sp. *R. candicans*.

Notă: **a** (40×) – secțiune transversală a limbului; **b** (40×), **c** (40×) – preparat superficial al epidermei superioare; **d**, **e** (10×) – preparat superficial al epidermei inferioare; **g** (40×) – secțiune transversală prin nervura principală: 1 – epiderma superioară, 2 – epiderma inferioară, 3 – țesut palisadic, 4 – țesut lacunos, 5 – peri unicelulari în mănunchi, 6 – stomate, 7 – peri unicelulari în mănunchi (vedere deasupra), 8 – druze de oxalat de calciu în lungul nervurii, 9 – țesut mecanic, 10 – fascicul conductor, 11 – păr unicelular, 12 – druze de oxalat de calciu în mezofil.

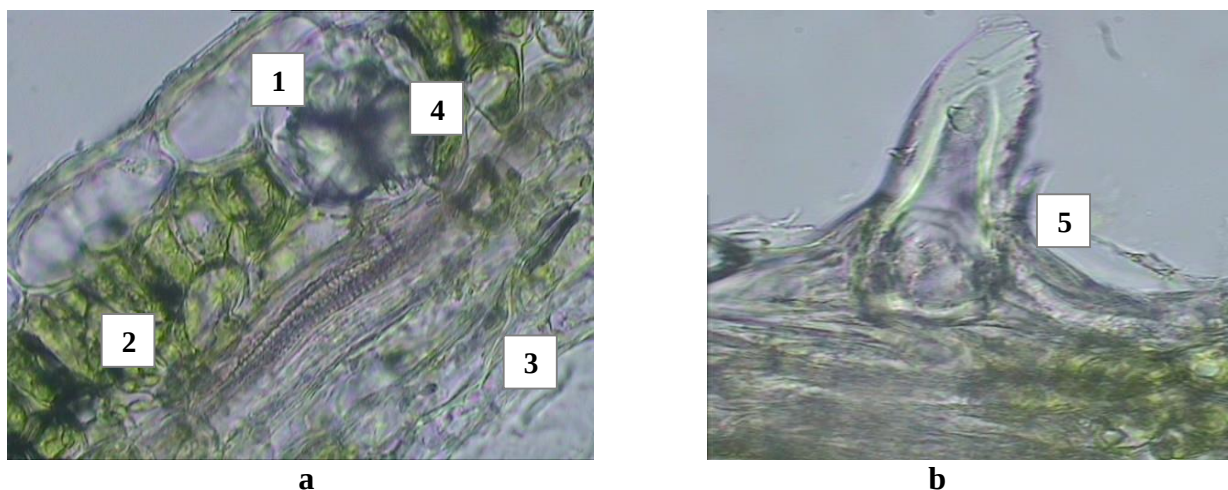


Fig. 4.13. Anatomia frunzei la soiul 'Arapaho'.

Notă: **a** (40×) – secțiune transversală a limbului; **b** (40×) – păr unicelular în secțiune longitudinală: 1 – epiderma superioară, 2 – țesutul palisadic, 3 – țesutul lacunos, 4 – druză oxalică, 5 – perete celular îngroșat al părului.

Soiul 'Chester'. Analiza multiplelor preparate microscopice (Figura 4.14.) denotă că frunzele acestui soi dezvoltă același tip anatomic al frunzei ca și pentru sp. *R. candicans* cu unele specificări: cuticula nu pătrunde printre celulele epidermei, iar celulele epidermale sunt de formă ovală.



Fig. 4.14. Anatomia frunzei la soiul 'Chester'.

Notă: **a** (40×), **b** (10×) – secțiune transversală a limbului: 1 – epiderma superioară, 2 – țesutul palisadic, 3 – țesutul lacunos, 4 – epiderma inferioară, 5 – păr unicelular solitar.

Pubescența este mai redusă, perii sunt tectori, unicelulari, solitari, dar lungi și rari, încolăciți, fixați în soclu bazal, druzele oxalatului de calciu sunt dispersate și aranjate preponderent în teaca fascicului conducător. Celulele țesutului palisadic sunt alungite, aranjate în 2 rânduri cu mici spații intercelulare, celulele parenchimului lacunar sunt lobate cu spații intercelulare mari (Figura A 7.3.).

Soiul ‘Thornfree’. Anatomia frunzei acestui soi (Figura 4.15) se caracterizează prin prezența perilor tectori aranjați în mănunchi dar și solitari, lungi, unicelulari, ascuțiți la vârf, de dimensiuni relativ mari. Perii tectori solitari au baza dilatată, rotunjită inclusă într-un soclu pluricelular cu conținut brunificat. Pubescenta mai pronunțată pe epiderma inferioară, îndeosebi pe nervuri. Celulele epidermale sunt izodiametrice. Sunt prezente cristalele cu oxalat de calciu sub formă de druze (Figura A 7.4).

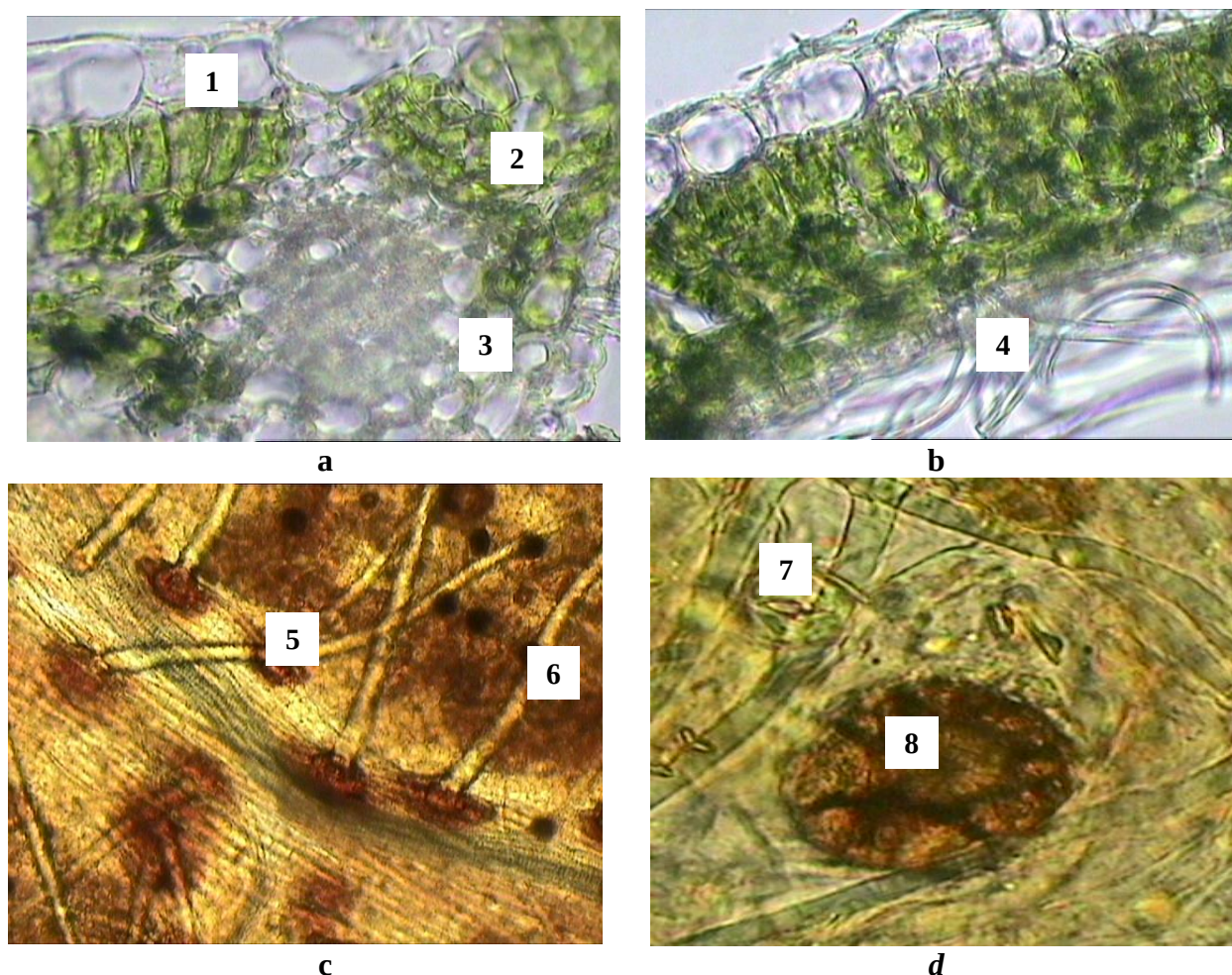


Fig. 4.15. Anatomia frunzei la soiul ‘Thornfree’.

Notă: **a, b** (40×) – secțiune transversală a limbului; **c, d** (40×) – preparat superficial al epidermei inferioare: 1 – epiderma superioară, 2 – țesutul palisadic, 3 – nervură, 4 – peri în mănunchi, 5 – peri unicelulari, solitari, 6 – druze ale oxalatului de calciu, 7 – stomată, 8 – baza părului cu conținut brunificat.

Soiul ‘Thornless Evergreen’ (obținut din sp. *R. laciniatus*). Limbul este de tip dorso-ventral, la care țesutul lacunos se caracterizează prin spații intercelulare mari (Figura 4.16). Celulele atât ale epidermei superioare, cât și ale celei inferioare sunt ușor aplatizate și bine împachetate. Stomatele sunt prezente doar pe epiderma inferioară (Figura A 7.5.). Epiderma superioară este formată din celule cu contur regulat cu pereții laterali aproape drepecți pe epiderma superioară a limbului și vizibil sinuoși pe cea inferioară.

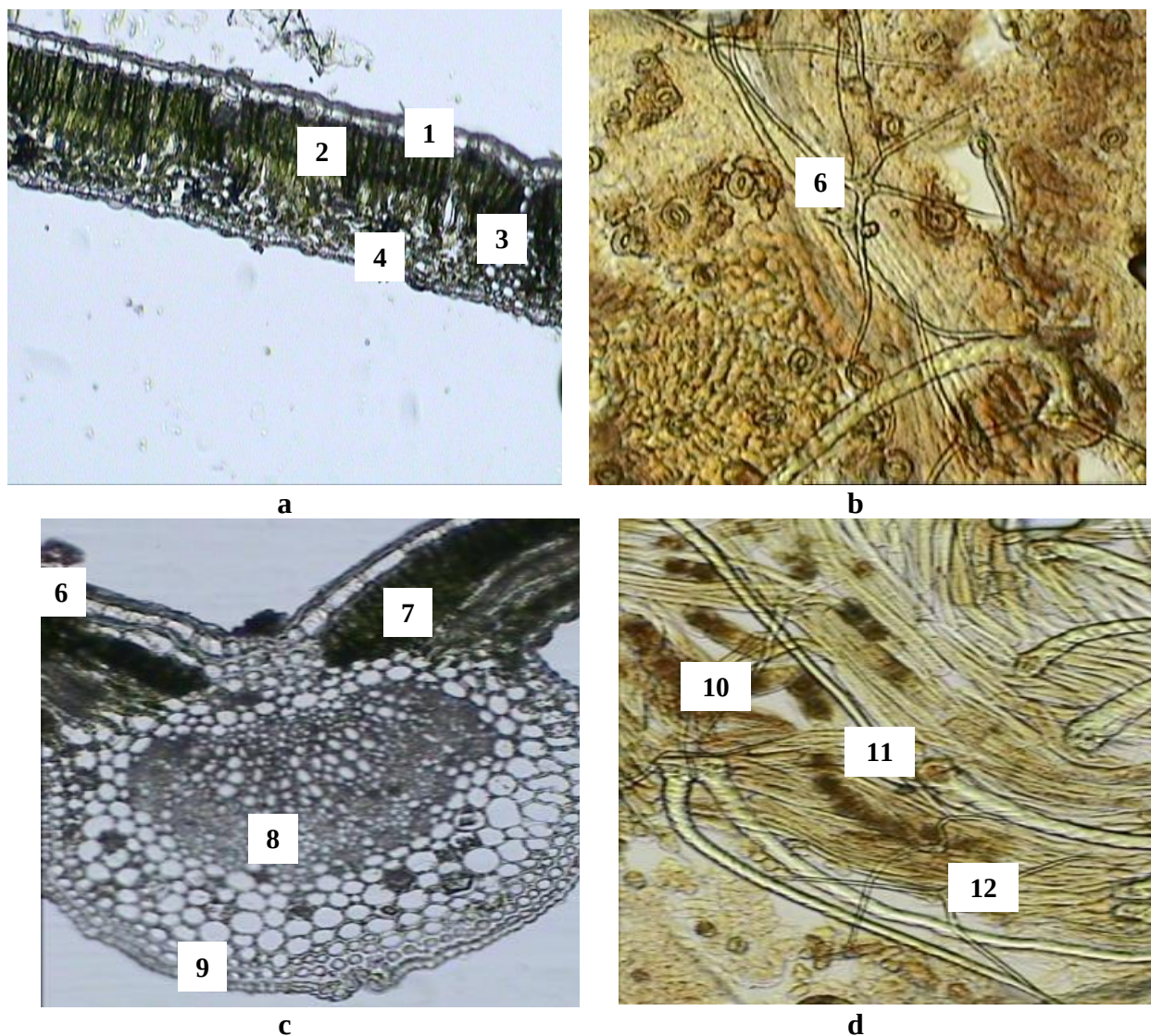


Fig. 4.16. Anatomia frunzei la soiul 'Thornless Evergreen'.

Notă: **a** (10×) – secțiune transversală a limbului; **b, d** (40 ×) – preparat superficial al epidermei inferioare; **c** (40×) – secțiune prin nervura centrală: 1 – epiderma superioară, 2 – țesutul palisadic, 3 – țesutul lacunos, 4 – epiderma inferioară, 5 – peri anomostozați, 6 – epiderma superioară, 7 – mezofil, 8 – fascicul conducător, 9 – țesut mecanic, 10 – peri unicelulari solitari, 11 – peri anomostozați câte 3, 12 – druze de oxalat de calciu

Se disting peri tectori, unicelulari solitari sau (anastomozăți) câte 2-5, deseori localizați pe nervuri. Nervurile sunt proeminente pe partea inferioară a limbului. Celulele țesutului palisadic sunt alungite și compact împachetate iar ale celui lacunos cu spații intercelulare relativ mici. Limbul se caracterizează prin prezența druzelor de oxalat de calciu din abundență, atât în teaca fasciculului, cât și în celulele mezofilului.

Soiurile de mur implicate în cercetare întrunesc mai multe caracteristici prin care se deosebesc: portul plantei (erect, semierect, repent), habitusul (viguroase, moderat de viguroase), perioada de maturare a fructelor, forma și dimensiunile fructelor, gradul de fermitate, gustul și aroma, productivitatea per plantă și la hectar. Soiurile de mur luate în studiu devin atractive și de

interes datorită tipului de creștere: 3 din aceste soiuri sunt erecte ('Polar', 'Arapaho', 'Reuben'), 6 soiuri semierecte ('Loch Ness', 'Chester', 'Triple Crown', 'Black Satin', 'Thornfree', 'Smoothstem'), 1 soi repent ('Thornless Evergreen') (Figura A. 9.12).

4.2.2. Anatomia comparată a frunzelor unor taxoni studiați (condiții de seră și teren)

Studiul anatomic comparativ s-a efectuat în baza următorilor indicatori: grosimea limbului, epidermelor (superioară și inferioară), mezofilului și coraportul acestora; tipul cuticulei (gradul de pătrundere a cuticulei printre celulele epidermale); prezența, tipul și modul de aranjare și distribuire al perilor; prezența și modul de distribuire al stomatelor; tipul anatomic al mezofilului și caracteristicile specifice, tipul fasciculului conducător, prezența și modul de localizare al druzelor oxalatului de calciu, indicele coraportului grosimii epidermelor, epidermă/limb, mezofil/limb. Frunzele tuturor taxonilor analizați sunt pubescente, în deosebi pe epiderma inferioară, de-a lungul nervurilor, ce constituie un înveliș de protecție a limbului împotriva insolăției și deshidratării. O caracteristică anatomică comună a taxonilor este prezența perilor tectori unicelulari doar că la sp. *R. candicans* sunt frecvenți și dispuși în mănunchi, la soiul 'Arapaho' și 'Chester' – solitari, scurți cu membrană groasă, la soiul 'Thornfree' – peri solitari sau în mănunchi câte 2-3, cu bază dilatată în soclu din celulele cu conținut brunificat, la soiul 'Thornless Evergreen' – peri solitari sau anamostozați câte 2-5, frecvent pe nervuri. Aceste deosebiri morfologice ale perilor reprezintă cu certitudine un caracter anatomic distinctiv de identificare a taxonilor.

Un alt criteriu anatomic comun taxonilor studiați este dezvoltarea stomatelor de tip anomocitic pe ambele epiderme, numeric prevalează pe epiderma inferioară, excepție constituind doar soiul 'Thornless Evergreen' cu stomate doar pe epiderma inferioară, ce reprezintă un indice anatomic distinctiv. Rezultatele studiului anatomic comparativ sunt prezentate în Tabelul 4.2.

Analiza datelor obținute și *screening-ul* celor mai importanți indicatori denotă, că valorile cele mai mici ale grosimii limbului (114 μm) sunt pentru specia *R. candicans* (spontană). Analiza comparativă a parametrilor anatomici la soiurile, provenite de la specia *R. candicans* și *R. laciniatus* arată că, pentru toate soiurile grosimea limbului este mai mare la plantele crescute în teren deschis, decât la cele din seră. Comparativ, frunzele soiului 'Arapaho' dezvoltă limb cu grosimea cea mai mare (240,0 μm), urmat de soiurile 'Thornfree' (191,5 μm), apoi 'Thornless Evergreen' (170,0 μm) și cea mai mică la 'Chester' (148,0 μm).

O caracteristică comună pentru frunzele la majoritatea taxonilor studiați este epiderma cu cuticulă de tip extern-intern, excepție constituie doar frunzele soiului 'Chester' cu cuticulă de tip extern (Tabelul 4.3.). Gradul de răspândire a cuticulei este un indice structural informativ cu rol

important în determinarea adaptabilității plantelor la condițiile mediului. Prezența cuticulei de tip extern-intern denotă rezistența frunzelor la acțiunea factorilor nefavorabili ai mediului, îndeosebi față de excesul insolației, radiației, temperaturilor sporite, lipsei umidității [69, 70, 72]. Astfel frunzele soiurilor de mur studiate posedă un potențial protector bine dezvoltat, ceea ce va asigura rezistența la acțiunea factorilor nefavorabil în condițiile climatice ale R. Moldova.

Măsurătorile indicilor anatomici s-au efectuat pentru toți taxonii de mur analizați, inclusiv și pentru specia *R. candicans*. Pentru toate genotipurile este caracteristică epiderma superioară e mai groasă decât cea inferioară. Frunzele soiului ‘Arapaho’ se evidențiază prin cele mai mari valori ale epidermelor (respectiv, epiderma superioară și inferioară – 44,3 și 35,4 μm).

În descreștere, menționăm valorile epidermelor frunzelor soiurilor ‘Thornless Evergreen’ (35,0 și 27,7 μm), și ‘Thornfree’ (34,3 și 29,1 μm). Epidermele cele mai subțiri (20,9 și 8,5 μm) revin frunzelor speciei *R. candicans*. Un alt parametru anatomic informativ reprezintă valoarea coraportului dintre grosimea epidermelor superioară și inferioară. Pentru specia *R. candicans* valoarea acestui indice este mai mare, (2,4) și reprezintă o valoare dublă față de soiurile ‘Arapaho’ (1,2) și ‘Chester’(1,22), ‘Thornfree’(1,8), și ‘Thornless Evergreen’(1,26). Acesta este un criteriu anatomic care indică plasticitatea și flexibilitatea epidermelor ca primă barieră de protecție la acțiunea factorilor externi.

Este cunoscut că [20, 42, 50] grosimea epidermelor determină gradul de protecție al mezofilului frunzei, iar valoarea sporită a coraportului grosimii epidermelor superioară/inferioară pentru speciei *R. candicans* reprezintă un indice al adaptabilității la condițiile nefavorabile, în special rezistența la secetă, ger și radiație, foarte pronunțate pe parcursul anilor din ultimele 2 decenii [72, 127].

La toate soiurile analizate epiderma superioară este mai groasă la plantele din teren față de cele din seră, ce reprezintă indici de adaptare a frunzelor la condițiile mediului, care asigură protecția mai eficientă al mezofilului succulent la acțiunea factorilor climatici nefavorabili din perioada estivală și de iarnă.

Exprimarea grafică a măsurătorilor (Tabelul 4.3.) scoate în evidență că frunzele soiurilor de mur cultivate în teren se deosebesc prin grosimea mai mare a mezofilului frunzei, decât la frunzele speciei *R. candicans*. Comparativ, frunzele soiurilor din teren ‘Arapaho’ (168,2 μm), ‘Thornfree’ (125,0 μm) și ‘Thornless Evergreen’ (107,0 μm) formează un mezofil mai gros decât cele ale soiului ‘Chester’ (98,9 μm). Valorile grosimii epidermelor și mezofilului corelează cu

Tabelul 4.3.
Caracteristicile anatomice ale frunzelor unor specii spontane și soiuri noi de mur

Nr. d/o	Specia Soiul	Grosimea limbului ($\mu\text{m}\pm\text{n}$)	Grosimea epidermelor ($\mu\text{m}\pm\text{n}$)		Grosimea mezofilului ($\mu\text{m}\pm\text{n}$)	Indicele coraportului grosimii		
			superioară	inferioară		Epiderma superioară/inferioară	Epiderma/limb	Mezofil/limb
1.	<i>R. candicans</i> (teren)	114,0 $\pm$ 4,1	20,95 $\pm$ 1,51	8,53 $\pm$ 1,19	83.74 $\pm$ 4.23	2,45	3,87	0,73
2.	‘Arapaho’ (teren)	240,0 $\pm$ 14,01	44,3 $\pm$ 2,73	35,4 $\pm$ 2,03	168,2 $\pm$ 11,0	1,2	3,0	0,67
3.	‘Arapaho’ (seră)	121,0 $\pm$ 7,72	29,7 $\pm$ 4,39	21,14 $\pm$ 2,62	71,4 $\pm$ 3,0	1,33	2,32	0,58
4.	‘Chester’ (teren)	148,0 $\pm$ 3,84	27,4 $\pm$ 0,87	22,3 $\pm$ 1,13	98,9 $\pm$ 3,50	1,22	2,97	0,66
5.	‘Chester’ (seră)	130,0 $\pm$ 6,23	26,6 $\pm$ 1,73	22,63 $\pm$ 1,34	77,5 $\pm$ 3,80	1,17	2,64	0,59
6.	‘Thornfree’ (teren)	191,5 $\pm$ 2,62	34,3 $\pm$ 1,35	29,1 $\pm$ 0,87	125,0 $\pm$ 2,41	1,17	3,01	0,65
7.	‘Thornfree’ (seră)	117,0 $\pm$ 2,03	21,4 $\pm$ 1,16	11,88 $\pm$ 0,41	80,0 $\pm$ 5,20	1,8	3,51	0,68
8.	‘Thornless Evergreen’ (teren)	170,0 $\pm$ 7,71	35,0 $\pm$ 1,6	27,7 $\pm$ 0,7	107,0 $\pm$ 7,43	1,26	2,7	0,62
9.	Thornless Evergreen (seră)	142,0 $\pm$ 5,4	25 $\pm$ 1,5	18,95 $\pm$ 1,5	96,0 $\pm$ 4,54	1,31	3,23	0,67

Notă: **m** – media, **n** – abaterea

valorile coraportului grosimii mezofilului față de limb. Astfel, cea mai mare valoare revine frunzelor speciei *R. candicans* (0,73), urmată de soiurile (în descreștere): ‘Arapaho’ (0,67), ‘Chester’ (0,66) și ‘Thornfree’ (0,65), ceea ce denotă un înalt randament asimilator fotosintetic. Conform datelor experimentale al unui grup de autori [109, 116] frunzele cu mezofilul bine dezvoltat, au și un potențial fotosintetic mai mare a plantei. Astfel, soiurile de mur cultivate au o capacitate asimilatoare a aparatului foliar mai eficientă, ceea ce reprezintă o sursă importantă de nutrienți pentru dezvoltarea organelor reproductive, care la rândul lor asigură productivitatea mai înaltă a plantelor, exprimată prin fructe mai mari și indici de roadă mai ridicați (Figura 4.17.).

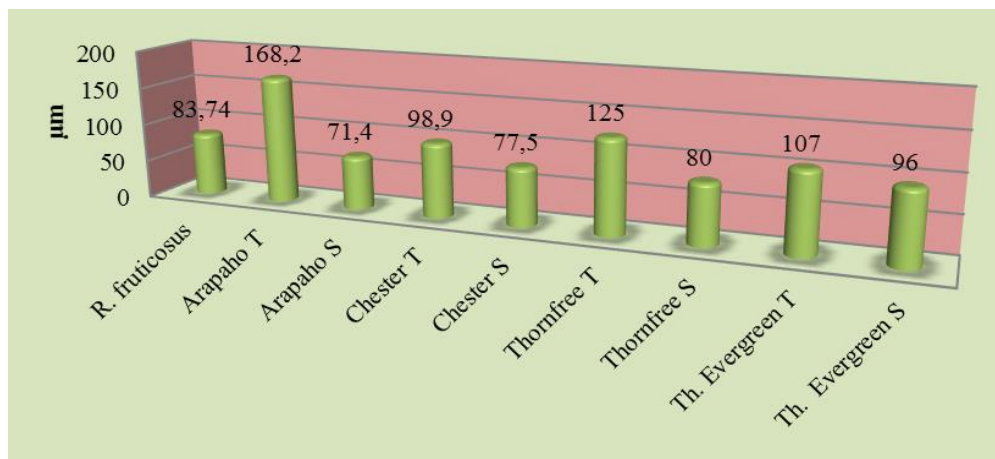


Fig. 4.17. Variațiile grosimii mezofilului limbului frunzei în funcție de taxon.

Pentru speciile de mur și soiurile derivate de la ele este specifică elaborarea sărurilor și formarea druzelor de oxalat de calciu, iar deosebiri se referă la modul de distribuire: în teaca fasciculelor conducătoare și în mezofil (specia *R. candicans*, soiul ‘Thornfree’), doar în mezofil (soiul ‘Arapaho’) și doar în teaca conducătoare (soiul ‘Chester’).

Pe lângă rolul diagnostic al druzelor de calciu ele au și un rol important fiziologic, demonstrat în ultimele decenii [12, 13, 42, 92], atribuindu-le rol în sporirea potențialului de protecție al frunzei în condiții nefavorabile și îndeosebi, ca reacție de răspuns la acțiunea condițiilor de stres. Astfel, putem evidenția specia *R. candicans* și soiul ‘Thornfree’ cu o capacitate de adaptare mai pronunțată la acțiunea condițiilor nefavorabile de creștere față de ceilalți taxoni de mur studiați.

Reeșind din datele anatomice cantitative și calitative, descrise mai sus, studiul anatomic comparativ al frunzelor taxonilor studiați printr-un complex de indicatori anatomici demonstrează că, toți taxonii dezvoltă un potențial structural adaptiv la acțiunea condițiilor mediului, suplinind atât de structuri externe: cuticula groasă de tip extern-intern, peri tectori, dimensiunile și gradul de împachetare al celulelor epidermei, cât și celor interne: gradul de dezvoltare a mezofilului, prezența și modul de distribuire a druzelor oxalatului de calciu, gradul de dezvoltare al țesutului mecanic.

Aceste structuri funcționează sinergic și alcătuiesc un complex histoanatomic compensator protector al limbului la acțiunea factorilor externi (deficit de umiditate, temperaturi sporite ale solului și aerului pe parcursul perioadei estivale și de iarnă).

Gradul de dezvoltare al pubescenței (numărul și modul de distribuire a perilor pe epiderme) și a druzelor de oxalat de calciu (numărul și localizarea) în funcție de taxoni și de condițiile de creștere (teren sau seră) denotă plasticitatea structural-adaptivă a aparatului foliar la condițiile mediului.

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

În ultimii ani atenția cercetărilor științifice este orientată tot mai frecvent spre studiul compușilor chimici naturali din fructe de aronie, afin, căpșun, cătină albă, zmeur, mur, agude [67, 68, 69, 75]. Analiza lucrărilor științifice [84, 85, 94, 95, 130] denotă că fructele de mur sunt bogate în compuși naturali ca: flavonozide (inclusiv antociani), taninuri, vitamine (C, A, K), minerale, fibre [156, 186]. Acești compuși chimici contribuie la fortificarea sistemului imun [165, 167], detoxifierea ficatului [140], ajută la reglarea tranzitului intestinal și buna funcționare a sistemului nervos [170, 171], posedă acțiune antioxidantă [160-162]. În scopul protejării organismului de consecințele stresului oxidativ se recomandă consumul de fructe de mur cu potențial antioxidant determinat de conținutul polifenolic și vitaminic [97, 99, 100, 102, 103, 104]. Cercetările științifice efectuate în acest sens au demonstrat că acțiunea sinergică a unui spectru larg de antioxidanți este mai semnificativă, comparativ cu acțiunea unui singur antioxidant. Fructele de mur sunt considerate cu activitate antioxidantă mai mare, comparativ cu cele de căpșun și zmeur [105, 106, 107, 129, 130, 133].

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

4.3.1. Studiul calitativ și cantitativ al flavonozidelor

Proprietățile fizico-chimice. Flavonozidele reprezintă un grup de substanțe chimice de origine vegetală înrudite, derivați ai 2-fenilbenzopiranului (flavonului) sau 3-fenilbenzopiranului (izoflavonului), având la bază scheletul C₆-C₃-C₆. Ei constituie o mare parte din pigmenții naturali, care dau organelor plantei culoare galbenă, brună, albastră, roșie în funcție de valoarea pH-ului [140, 141, 147].

Majoritatea derivaților au nucleul A, la C₅ și C₇ grupări hidroxil alcoolice provenite din funcția carbonilică a malonil-Co-A și grupării OH fenolice în 4' sau 3' - 4', 3' - 4' - 5' provenite din

compuși fenilpropanici. Aceste grupări hidroxile pot fi metoxilate, glicozidate sau prenilate. După gradul de oxidare al ciclului piranic, flavonoidele se împart în mai multe grupe, care includ derivații: flavonei, flavanonei, izoflavonei, flavonului, flavanonolului, flavanului (catehinele), calconei, antocianidolului. Până în prezent, se cunosc aproximativ 3000 de astfel de compuși în plantele superioare, dintre care circa 500 se găsesc în stare liberă [13, 79, 155, 159].

În lumina UV, flavonozidele prezintă fluorescență caracteristică: agliconii flavonoidelor sau cele, care posedă un OH liber în poziția 3 – galben-aurie până la galben-verzuie; când grupa OH din poziția 3 lipsește sau este blocat prin glicozidare – fluorescență de culoare brună. În cazul OH metilat, cu cât gradul de metilare crește nuanța fluorescenței trece în albastru luminos. În soluții acide au fluorescență – galben-verzui în acid clorhidric și albastru în soluție de acid sulfuric concentrat, ca urmare a formării sărurilor de flaviu în lumina vizibilă. Flavonozidele prezintă spectre de absorbție caracteristice în UV și infraroșu [12, 13, 44].

Flavonozidele posedă proprietăți terapeutice valoroase: mențin integritatea capilarelor, contribuie la potențarea acidului ascorbic, reduc acțiunea histaminei prin inactivare și protejează organismul împotriva acțiunii nocive a radiațiilor UV și X, posedă acțiune antibacteriană și antivirotică [159, 160, 161].

Studiul calitativ al flavonozidelor. Inițial, a fost obținut extractul hidro-alcoolic. Într-un balon cotat de 100 ml s-a luat 1g de PV mărunțit și s-a adăugat 100 ml de alcool etilic 50%, aducându-se la cotă. S-a fiert pe baie de apă timp de 30 minute, apoi s-a obținut extractul de analizat prin filtrare cu filtru de hârtie, (Figura A. 8.1., 8.2.).

Reacții specifice de identificare (colorare și sedimentare) au fost aplicate în extractele hidro-alcoolice din frunze și fructe la soiurile: ‘Arapaho’, ‘Thornless Evergreen’, ‘Chester’, ‘Thornfree’ și specia *R. candicans* din flora spontană [11-13, 44]. Efectele reacțiilor analitice cum ar fi: culoarea, opalescența, sedimentul și gradul de persistență au scos în evidență prezența diferitor constituenți flavonoidici.

Reacția cianidolului (reacția Shinoda). Efectul exprimat al acestei reacții rezultă din aplicarea HCl concentrat și a Zn metalic, ce determină formarea antocianidelor, cu apariția colorației roșii în mediul acid. Reacția are loc în mediu alcoolic prin reducerea hidrogenului eliberat în reacția dintre Zn și HCl. Flavonolii, flavanonele și flavonele la reducerea cu Zn în prezența HCl dau culoare roșie sau portocalie determinând formarea antocianidinelor. Rezultatele efectelor analitice sunt prezentate în Tabelul 4.4., figura A.8.3. Analiza rezultatelor reacției aplicate arată că intensitatea efectelor analitice este diferită: cele mai pronunțate fiind în extractul de fructe ale soiului ‘Thornless Evergreen’ și frunzele speciei *R. candicans*; urmate de cele din fructele soiului ‘Chester’ și frunzele soiului ‘Thornless Evergreen’. Efecte analitice

Tabelul 4.4.

Efectele reacțiilor chimice specifice (colorare și sedimentare) de identificare a flavonozidelor

Nr. d/o	Reacții chimice specifice aplicate (constituenții flavonoidici indentificați)						
	Taxonul	Cianidolului (HCl+Zn) (flavone, flavonone, antociani)	Acetat bazic de Pb (flavone, calcone, aurone, antociani)	Soluție de vanilină + HCl (catechine)	Amoniac 5% (flavone, flavonone, flavonoli, flavononoli, antociani)	Soluție alcoolică 2% FeCl ₃ (flavone)	Constituenții flavonoidici
1.	‘Thornless Evergreen’	Colorație roșie-zmeurie ++++	Colorație galben-albastru ++++ ↓	Colorație roz +++	Opalescență Colorație albastră ++++	Colorație galben-verde ++++	Flavone, flavonone, flavonoli, catechine, aurone, antociani
		Colorație galben-oranj +++	Colorație galben-intens ++++ ↓	Colorație zmeurie ++++	Opalescență Colorație galben-verzuie +++	Colorație galben-verzuie ++++	Flavone, flavonone, flavonoli, catechine
2.	‘Chester’	Colorație roșiatică +++	Colorație galben-albastru +++ ↓	Colorație zmeurie +++	Opalescență Colorație albastru-violet +++	Colorație galben-verzuie ++++	Flavone, antociani, flavonone, flavonoli
		Colorație verzuie ++	Colorație galben-verzuie +++ ↓	Colorație zmeurie +++	Opalescență Colorație verde- gălbui +++	Colorație verde-brun ++++	Flavone, flavonone, flavonoli, catechine
3.	‘Thornfree’	Colorație roșiatică ++	Colorație galben-albastru +++ ↓	Colorație zmeurie +++	Opalescență albastră +++	Colorație galben +++	Flavone, catechine flavonone, flavonoli, antociani
		Colorație verde-brun ++	Colorație galben-verzuie +++ ↓	Colorație roz +++	Colorație verde gălbuie +++	Colorație verde +++	Flavone, flavonone, flavonoli, catechine
4.	<i>R. candicans</i>	Colorație albastru-brun ++++	Colorație galben – brun ++++ ↓	Colorație zmeurie ++++	Colorație galben-verzuie	Colorație galben-verzuie ++++	Flavone, flavonone, flavonoli, catechine
5.	‘Arapaho’	Colorație galben-brun +++	Colorație galben-verzuie +++ ↓	Colorație zmeurie ++	Colorație galben-verzuie ++++	Colorație galben-verzuie ++++	Flavone, flavonone, flavonoli, catechine

Notă: gradul de expresie al efectului analitic: +++++ – pronunțat; +++ – bun; ++ – moderat; + – slab;

– extracte din fructe; – extracte din fructe.

moderate s-a constatat în extractele frunzelor și fructelor soiului ‘Thornless Evergreen’, frunzele soiurilor ‘Chester’ și ‘Arapaho’. Colorațiile extractelor demonstrează prezența antocianilor, flavononelor și flavonelor în fructele soiurilor ‘Thornless Evergreen’, ‘Chester’, ‘Thornfree’ și a speciei *R. candicans*.

Reacția cu soluția de acetat de plumb bazic. În prezența acetatului de plumb flavonele, calcone, auronele cu conținut de hidroxile libere în inelul B formează sediment colorat în galben intens, galben-aprins sau roșu, iar antocianii formează precipitate colorate în roșu sau albastru [44]. Rezultatele din Tabelul 4.4. și Figura A.8.4. demonstrează că în toate mostrele analizate sunt prezenți acești constituenți flavonoidici, doar că gradul de exprimare a colorației sedimentului este diferit. Cel mai pronunțat în fructele și frunzele soiului ‘Thornless Evergreen’ (+++++) și în fructele speciei *R. candicans*, cu efect bun (+++) în toate celelalte extracte analizate. Nuanța verzuie a colorației, probabil, este indusă de prezența în extract al clorofilelor și a altor compuși fenolici (Figura A. 8.4.).

Reacția cu soluție de vanilină 1% în acid clorhidric concentrat. Colorarea în roșu-zmeuriu (figura A 8.5.) demonstrează prezența catehinelor (derivații floroglucinei și rezorcinei) în toate probele analizate.

Reacția cu soluție de amoniac 5%. La aplicarea acestei reacții flavonele, flavononele, flavonolii și flavononolii dau culoare galbenă, care trece apoi în oranj sau roșie, iar calcone și auronele au culoare roșie. Antocianii în prezența amoniacului formează o colorație albastră sau violet. În toate extractele analizate au fost înregistrate colorații cu diferite intensități, mai pronunțată a fost cea albastră în extractele fructelor.

Reacția cu soluție de $FeCl_3$ 2%. Gruparea OH fenolică din structura flavonoidelor are caracter reducător, intensificat prin prezența grupei carbonil. Colorarea poate fi de la verde, albastru-închis până la brună în funcție de poziția și numărul de grupe hidroxil a flavonei [44]. Rezultatele aplicării reacției în extractele analizate au fost în majoritatea probelor pronunțate (+++++) și doar în frunzele soiului ‘Thornfree’ cu efect bun (+++).

În toate extractele analizate au fost înregistrate diferite efecte exprimate prin colorare, opalescență și sedimentare, dar cu diferite intensități (Tabelul 4.4).

Reacțiile calitative aplicate în extracte din frunze și fructe ale soiurilor ‘Thornless Evergreen’, ‘Chester’, ‘Thornfree’ și în frunzele soiului ‘Arapaho’ și speciei *R. candicans* scot în evidență următorii constituenți flavonoidici: flavone, flavonone, flavonoli, antociani și catehine.

De menționat, că efectele reacțiilor analitice au un caracter gradual (redus, moderat, bun, pronunțat), ce corelează cu organul (fructe sau frunze) și taxonul analizat. *Screening-ul* efectelor reacțiilor analitice denotă gradul de expresie mai pronunțat pentru extractele din fructele și frunzele

soiurilor ‘Thornless Evergreen’, ‘Arapaho’, ‘Chester’, speciei *R. candicans*, urmate de soiul ‘Thornfree’. Efectele analitice au fost mai evidente în extractele din frunzele speciei *R. candicans* și din fructele și frunzele soiului ‘Thornless Evergreen’, comparativ cu celelalte soiuri analizate. În extractele din fructe au fost evidente efectele analitice pentru antociani, pe lângă cele pentru flavone, flavonone, flavonoli și catehine, care au fost prezenți, atât în fructele, cât și frunzele taxonilor analizați.

Identificarea flavonozidelor prin cromatografie pe strat subțire. Au fost obținute extractele pentru analizat: 1g de produs vegetal s-a adus într-o colbă de 100 ml cu 50 ml alcool etilic de 60% și s-a extras timp de 30 minute pe baia de apă. Soluție de referință: soluții de 0,1% rutozidă, cverceto, cvercetoizidă, izocvercetoizidă, acidul cafeic și clorogenic (acizi fenilpropanici de tip C₆-C₃). Faza staționară: plăci de silicagel. Faza mobilă: butanol: acid acetic: apă (2:5:5). Pe placa cromatografică au fost aplicate mostre ale substanțelor de referință și ale extractelor de analizat. Placa a fost introdusă în camera de cromatografiat (Figura A 8.6.).

Analizele cromatogramelor în strat subțire ale extractelor din fructele și frunzele de la diferite soiuri denotă că distanța de parcurgere a sistemului mobil a fost de 12,3 cm. Uscarea plăcilor la temperatura de 105C°, timp de 7-10 minute, a fost urmată de pulverizarea cu soluție de FeCl₃ 3%. Cromatogramele au fost pulverizate cu soluție etanolică de AlCl₃ 3% și examinate în lumina UV (365 nm).

Ca rezultat al examinării cromatogramelor s-a observat prezența mai multor spoturi, cu diferite valori ale R_f, și diferite după culoare, atât în lumina zilei, cât și în raze ultraviolete. Conform spoturilor detectate (Figura A.8.7.) și martorilor aplicați pe cromatogramă, au fost identificați următorii constituenți: rutozidă (R_f = 0,71) – în extractele din frunzele soiurilor ‘Thornless Evergreen’ și ‘Thornfree’; querceto (R_f = 0,89) – în extractele din frunzele soiurilor ‘Thornless Evergreen’ și din fructele soiului ‘Chester’; quercetoizidă (R_f = 0,77) – în extractul din frunzele soiurilor ‘Arapaho’ și ‘Thornless Evergreen’; izoquercetoizidă (R_f = 0,86) – în extractele din frunzele soiurilor ‘Thornless Evergreen’, ‘Chester’, ‘Thornfree’; acid clorogenic (R_f = 0,79) – în extractul din fructele soiurilor ‘Thornfree’ și ‘Thornless Evergreen’; acid cafeic (R_f = 0,71) – în extractele din frunzele soiurilor ‘Arapaho’, ‘Chester’, ‘Thornless Evergreen’, al fructelor soiurilor ‘Thornless Evergreen’ și ‘Chester’. În afară de acestea pe cromatogramele dezvoltate, examinate în lumina zilei/UV au fost remarcate spoturi culoare roșie, ce indică prezența clorofilei și de culoare gri cu diferite valori ale R_f – dovadă, că mai sunt și alți constituenți flavonoidici neidentificați în aceste extracte.

Astfel, în extractul din frunze de soiul ‘Arapaho’ a fost observat un spot cu R_f = 0,80, în extractul din fructe la soiul ‘Thornfree’ – R_f = 0,81, iar extractul din frunzele sp. *R. candicans* – un spot cu R_f = 0,69. Studiile calitative ale flavonozidelor în extractele taxonilor studiați au

demonstrat prezența diferitor grupe de flavonoide (rutozidă, quercetrina și quercetina) și acizi fenil-propanici (clorogenic și cafeic).

Spoturile cu diferite valori ale Rf-lor și de diferite culori denotă prezența și altor compuși fenolici și flavonoidici. Existența diferitor acizi fenolici (galic, protocatehic, vanilic, p-cumaric, ferulic, elagic) și diferitor grupe flavonoidice (flavone, flavonoli, flavanoli, antocianidine), au fost demonstrate și prin alte metode, atât la taxoni din genul *Rubus*, cât și la genul *Vaccinium* și genul *Fragaria* [97, 103, 104, 165]. Toate acestea demonstrează, că fructele și frunzele taxonilor de mur studiați elaborează un larg spectru de compuși fenolici și flavonoidici.

Studiul cantitativ al flavonozidelor a fost efectuat prin metoda spectrofotometrică [44] în frunzele și fructele la soiurile ‘Arapaho’, Thornless Evergreen, ‘Chester’, ‘Thornfree’ și speciei *R. candicans* din flora spontană. Pentru aceasta a fost obținut extractul hidro-alcoolic din frunzele și fructele analizate conform recomandărilor metodice de specialitate [11,12, 44].

Într-un balon cotat de 100 ml s-a luat 1g de produs mărunțit și s-a adăugat 100 ml de alcool etilic 50%, aducându-se la cotă. S-a fiert pe baia de apă timp de 30 minute după care extractul s-a filtrat printr-un filtru de hârtie, obținându-se soluția A. Ulterior, 10 ml soluția A s-a luat într-un balon cotat de 25 ml cu alcool etilic 50%. S-a agitat 2-3 minute și s-a lăsat în repaus 10 minute. Soluția obținută s-a filtrat și s-a obținut soluția. Într-un balon cotat de 25 ml s-a luat 5 ml de soluție B obținută, la care s-a adăugat 5 ml de acetat de sodiu (100 g/l) și 3 ml clorură de aluminiu (2 g/l). S-a adus la cotă cu alcool etilic de 50%, obținându-se soluția C (Figura A.8.8.).

S-a măsurat absorbanta soluția C obținute la spectrofotometru (Fig. A.8.9.), la lungimea de undă 430 nm. În calitate de lichid de compensare s-au utilizat 5 ml de soluție B, 8 ml de apă distilată și alcool etilic de 50% (Figura 4.18.).

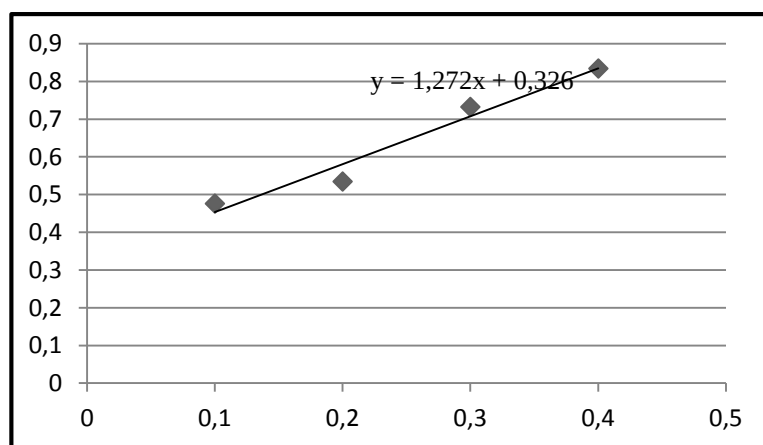


Fig. 4.18. Linia etalon pentru rutozidă

Linia etalon pentru rutozidă 0,1 g/l s-a construit folosind diferite concentrații: 1, 2, 3, 4 ml de rutozidă, la care s-au adăugat 5 ml acid sulfuric și 3 ml clorură de aluminiu. Absorbanta soluției

de rutozidă s-a măsurat la spectrofotometru, lungimea de undă 430 nm, folosind ca lichid de compensare 8 ml de apă distilată și alcool etilic de 50% până la cota de 25 ml (Fig. A.8.10.).

Conținutul total flavonoidic a fost calculat în baza ecuației obținute prin linia etalon pentru rutozidă.

Calculule și rezultatele comparative privind conținutul de flavonozide în extractele de mur analizate sunt reprezentate în Figura 4.19.

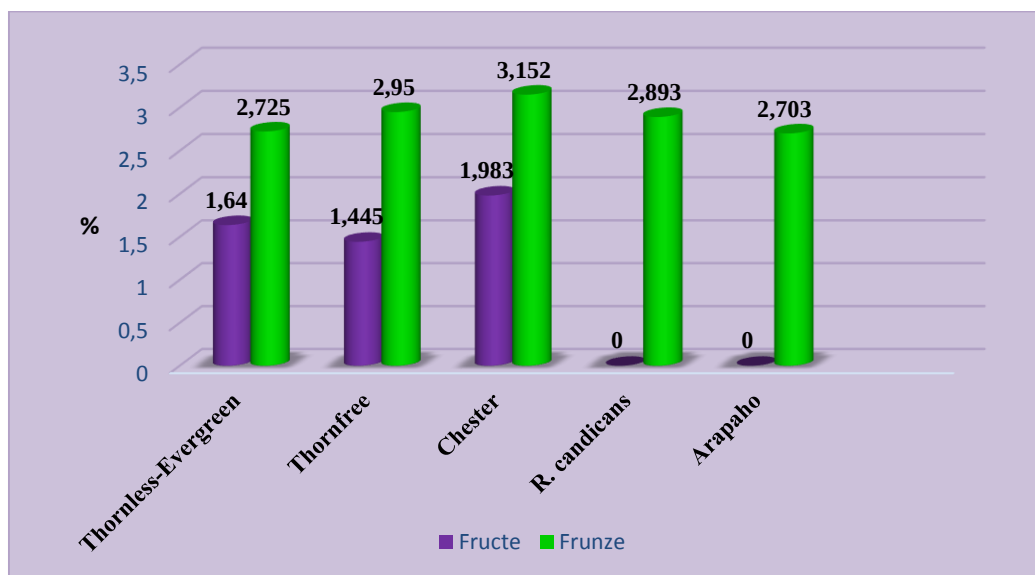


Fig. 4.19. Conținutul total de flavonozide (%) în extractele frunzelor și fructelor la diferiți taxoni de mur.

Analiza rezultatelor arată că, conținutul de flavonozide în fructe corelează cu taxonul: maxim în soiul ‘Chester’ (1,983%), urmat de soiurile ‘Thornless-Evergreen’ (1,640%) și ‘Thornfree’ (1,445%). La compararea rezultatelor privind conținutul de flavonozide în fructe și în frunze (Figura 4.19.), observăm că valorile sunt mai mari în frunze, decât în fructe la toți taxonii studiați. Cea mai mare cantitate a fost determinată în frunzele soiului ‘Chester’ (3,152%), urmată de soiul ‘Thornfree’ (2,950 %) și specia *R. candicans* din flora spontană (2,893 %). În frunzele soiurilor ‘Thornless-Evergreen’ și ‘Arapaho’ aproape valori egale (respectiv 2,725 și 2,703%). Astfel, atât frunzele, cât și fructele taxonilor de mur analizați pot servi în calitate de sursă de materie primă cu conținut flavonozidic pentru industria farmaceutică.

4.3.2. Studiul calitativ și cantitativ al taninurilor

Taninurile sunt foarte răspândite în lumea vegetală, iar structura lor și cantitatea corelează cu apartenența sistematică a plantei [134, 135]. Taninurile sunt substanțe organice polifenolice cu diferită greutate moleculară, compuși de tip $C_6-C_3-C_6$, din care fac parte cateholii, derivații 3-hidroxi-flavanului, care prin condensare formează taninuri catechice. Proprietăți similare au compuși C_6-C_1 , acidul galic și derivații săi, care sub formă de esteri, constituie taninurile galice.

Se întâlnesc și taninurile mixte, esteri ai acidului galic cu catecholul, epicatecholul și galocatecholul [60-63].

Studiul calitativ al substanțelor tanante. Pentru identificarea taninurilor pe cromatograme în strat subțire au fost obținute extractele apoase din frunzele și fructele soiurilor ‘Arapaho’, Thornless Evergreen, ‘Chester’, ‘Thornfree’ și speciei *R. candicans* conform metodei [44]. Aproximativ 1 g (proba exactă) de produs vegetal s-au pus într-un balon cu capacitatea de 25 ml, s-a turnat toarnă 20 ml de alcool etilic 70% și se lasă 30 min. pe baia de apă. După dizolvarea completă soluția se răcește și se aduce până la cotă cu alcool etilic de 70%.

Într-un balon cotat de 100 ml, s-a luat 1g de PV mărunțit. S-au adăugat 100 ml de apă distilată fierbinte și s-a fiert pe baia de apă timp de 30 de minute. Extractul obținut s-a filtrat printr-un filtru de hârtie, obținându-se soluția de analizat. Soluții de referință: catehină, acid galic, acid galotaninic, pirogalol, tanin de 1%. Faza mobilă: *n*-butanol-acid acetic-apă (40:12:28). Extractele de analizat și soluțiile de referință au fost aplicate pe placi cromatografice și introduse în camera de cromatografiat (Figura A 8.11).

Analizele cromatogramelor în strat subțire ale extractelor din fructele și frunzele taxonilor de mur denotă că distanța de parcurgere a solventului a fost de 9,5 cm. În rezultatul examinării cromatogramelor s-a observat prezența mai multor spoturi, diferite după valoarea R_f și culoare, atât în lumina zilei, cât și la examinare în raze UV. Conform spoturilor detectate pe cromatogramă au fost identificați următorii constituenți (Figura A. 8.12.).

- Catehină ($R_f = 0,85$) în toate extractele, cu excepția celor din fructele soiurilor ‘Chester’ și ‘Thornless Evergreen’;
- Acid galotaninic ($R_f = 0,83$) în extractele din frunzele soiurilor ‘Arapaho’, ‘Thornless Evergreen’, ‘Chester’ și ‘Thornfree’;
- Pirogalol ($R_f = 0,77$) în extractele din frunzele soiurilor ‘Arapaho’, ‘Thornless Evergreen’, și fructelor soiurilor ‘Thornfree’ și ‘Thornless Evergreen’;
- Acid galic ($R_f = 0,86$) în extractele din frunze soiurilor ‘Arapaho’, ‘Thornless Evergreen’, și ‘Chester’.

În afară de aceste spoturi pe cromatogramele dezvoltate, examinate la lumina zilei și UV au fost remarcate spoturi cu diferite valori ale R_f . În extractul din frunzele soiului ‘Thornless Evergreen’ s-a observat un spot cu $R_f = 0,78$. Un spot cu $R_f = 0,66$ și unul cu $R_f = 0,76$ au fost detectate în extractul din fructele soiului ‘Thornfree’, iar în extractul din frunzele soiului ‘Thornfree’, pe lângă acidul galic s-au evidențiat încă doi constituenți cu $R_f = 0,54$ și respectiv $R_f = 0,60$. Analiza cromatogramelor scoate în evidență faptul că, atât fructele, cât și frunzele taxonilor de mur analizați conțin taninuri.

Reacții analitice de colorare și sedimentare. Pentru identificarea taninurilor, în extractele apoase obținute din frunze și fructe ale soiurilor ‘Arapaho’, Thornless Evergreen, ‘Chester’, ‘Thornfree’ și *R. candicans* au fost aplicate tehnici calitative corespunzătoare [13, 42, 44].

Reacția cu gelatină de 1 %. La 2-3 ml de extract se adaugă în picături soluție de 1% de gelatină. Apare opalescența, ce repede dispare la adăugarea excesului de gelatină. Rezultatele indică că efectele analitice foarte intense n-au fost înregistrate. Efecte analitice intense au fost înregistrate în extractele frunzelor ale soiurilor ‘Thornless Evergreen’, ‘Chester’, ‘Arapaho’ și a sp. *R. candicans* (Tabelul 4.5.). În celelalte extracte au fost observate efecte analitice moderate. Conform rezultatelor în toate extractele analizate sunt prezente taninuri (Figura A. 8.13).

Reacția cu alauni de fier și amoniu. La 2-3 ml de extract se adaugă 4-5 picături de soluție alaun de fier și amoniu. În cazul prezenței substanțelor tanante hidrolizabile apare culoarea sau sedimentul negru-albastru, iar a celor condensate – culoare negru-verzui. Reacția cu alauni de fier și amoniu este una foarte expresivă din punct de vedere al efectului analitic. Efectele analitice au fost de diferite intensități, cel mai intens (++++), în extractul de frunze al sp. *R. candicans* (Figura A. 8.14.). Efecte analitice intense (+++), au fost remarcate în extractele frunzelor al soiurilor ‘Chester’ și ‘Arapaho’ și a celui din fructe ale soiului ‘Thornless Evergreen’.

Efectul analitic al acestei reacții chimice demonstrează prezența taninurilor hidrolizabile în toate extractele analizate, doar cu diferit grad de expresie al efectului analitic.

Reacția cu acid acetic și acetat de Pb. La 1 ml de extract se adaugă 2 ml acid acetic de 10% și 1 ml de sare mijlocie a acetatului de Pb 10%.

Aceasta demonstrează prin multitudinea de nuanțe obținute în urma aplicării reactivului în extractele analizate că sunt prezente taninurile. Printr-o intensitate mai pronunțată se remarcă extractele din frunzele soiurilor ‘Cester’ și ‘Thornless Evergreen’ (Figura A. 8.15).

Reacția cu soluție de clorură ferică 1%. La 1 ml de extract se adaugă 4 picături de soluție de clorură ferică 1% și se agită. Rezultatele acestei reacții demonstrează vizibil prezența substanțelor tanante hidrolizabile. Cu clorura ferică substanțele tanante hidrolizabile formează compuși complecși de culoare neagră cu nuanță albăstrie. La agitare, pe pereții tubului se observă culoarea albăstrui-negricioasă (Figura A. 8.16.).

În extractele de mur analizate pot fi prezente ambele categorii de taninuri (hidrolizabile și condensate) doar că prevalează cele hidrolizabile.

Reacția cu cristale de NaNO_3 și HCl de 0,1 N. La 2 ml de extract se adaugă câteva cristale de NaNO_3 și 2 picături de HCl de 0,1 N.

Tabelul 4.5.

Efectele analitice ale reacțiilor chimice specifice de identificare ale substanțelor tanante

Nr.	Taxonul	Reacții chimice specifice aplicate (soluții de)					
		Gelatină 1%	Alauni de fier și amoniu	Acid acetic + acetat bazic de Pb	FeCl ₃	NaNO ₂	Taninuri identificate
1.	‘Arapaho’	Opalescență slabă, colorație gălbuie, (+++)	Sediment albastru (+++)	Opalescență galbuie (+++)	Albastru intens (+++)	Colorație brună (++)	Taninuri hidrolizabile
2.	‘Thornless Evergreen’	Opalescență (++)	Sediment de culoare Albastru intens (+++)	Opalescență roz-zmeurie (++++)	Albastru negricios (+++)	Colorație brună (+)	Taninuri hidrolizabile
		Colorație gălbuie, opalescență (+++)	Sediment albastrui (+)	Opalescență galbuie (+++)	Albastru-negricios, verzui (+++)	Colorație brună (+)	Taninuri hidrolizabile
3.	‘Chester’	Opalescență (++)	Sediment albastru (++)	Opalescență roz-zmeurie (++++)	Albastru intens, verzui (++)	Colorație brună (++)	Taninuri hidrolizabile
		Opalescență (++)	Sediment albastru (+++)	Opalescență Gălbuie (+)	Albastru intens (+++)	Colorație brună (+++)	Taninuri hidrolizabile
4.	‘Thornfree’	Opalescență Galbenă verzuie (+++)	Sediment albastru (+)	Opalescență roz-zmeurie (+++)	Albastru intens (++)	Colorație brună (+)	Taninuri hidrolizabile
		Opalescență (++)	Sediment (++)	Opalescență roză +	Albastru intens (++)	Colorație brună (+++)	Taninuri hidrolizabile
5.	<i>R. candicans</i>	Opalescență (+++)	Sediment albastru (++++)	Opalescență gălbuie (++)	Albastru cu nuanțe de verde negricios (++++)	Colorație brună (+)	Taninuri hidrolizabile

Notă: Gradul de expresie a intensității efectului analitic a reacției chimice: + – slab; ++ – moderat; +++ – intens; ++++ – foarte intens



– extractele din fructe;



– extractele din frunze.

Reacția cu cristale de NaNO_3 și HCl de 0,1N a dat efect analitic ce denotă prezența substanțelor tanante hidrolizabile. În extractul din frunzele soiului ‘Thornless-Evergreen’ se observă o intensitate a efectului analitic minim (Figura A. 8.17.).

Analiza rezultatelor reacțiilor specifice aplicate în extractele frunzelor și fructelor taxonilor de mur din Tabelul 4.5. demonstrează prezența taninurilor în toate mostrele, doar cu diferit grad de expresie a intensității efectului analitic. Toate extractele analizate conțin taninuri, dar prevalează cele hidrolizabile.

Studiul cantitativ al substanțelor tanante a fost efectuat prin metoda permanganatometrică [44]. Pentru realizarea acestei metode, la 10 ml de extract obținut s-au adăugat 750 ml de apă distilată și 25 ml de acid indigosulfonic. Apoi s-a efectuat titrarea cu permanganat de potasiu 0,1 M până la virajul culorii din albastru în galben, colorație stabilă 2-3 minute (Figura A. 8.18.):

Cantitatea procentuală a sumei de taninuri s-a calculat după formula de calcul:

$$X = \frac{(V-V1) \cdot 0,004157 \cdot 100 \cdot 100 \cdot 100}{m \cdot V3 \cdot (100 - \omega)} \quad (4.1.)$$

în care:

V – volumul permanganatului de potasiu de 0.1N luat pentru titrare, *ml*;

V1 – volumul permanganatului de potasiu de 0.1N utilizat pentru titrarea probei de control, *ml*;

0,004157 – corecția la titru (după acidul oxalic);

m – masa exactă a produsului vegetal, *g*;

V3 – volumul extractului luat pentru titrare, *ml*.

Rezultatele calculelor, obținute pentru determinarea cantitativă a substanțelor tanante în extractele analizate, sunt reflectate în Figura 4.20. Analiza datelor arată, că la toți taxonii analizați în frunze conținutul taninic este mult mai mare, decât în fructe, acest coraport este și pentru sp. *R. candicans*, doar că diferența e mult mai mică (6,16% în fructe și 11,24% – frunze).

La analiza rezultatelor conținutului taninic în frunze constatăm, că cea mai mare valoare revine frunzelor sp. *R. candicans* (11,24%), puțin cedează conținutul din frunzele soiurilor ‘Thornfree’ (10,75%) și ‘Arapaho’ (10,51%), urmate de cele ale soiurilor ‘Chester’ (8,79%) și ‘Thornless-Evergreen’ (8,51%). Aceiași consecutivitate a descreșterii conținutului taninic se observă și pentru fructe, doar că valorile sunt mult mai mici: *R. candicans* – 6,16%, ‘Thornfree’ – 1,22%, ‘Arapaho’ – 2,12%, ‘Chester’ – 2,02% și ‘Thornless-Evergreen’ cu 1,19%. Diapazonul valorilor conținutului taninic în frunzele taxonilor de mur studiați nu diferă față de valorile obținute

pentru alți taxoni (*R. caesius*, *R. ulmifolius*, *R. fruticosus* și diferite soiuri) în alte studii [103, 105, 186].

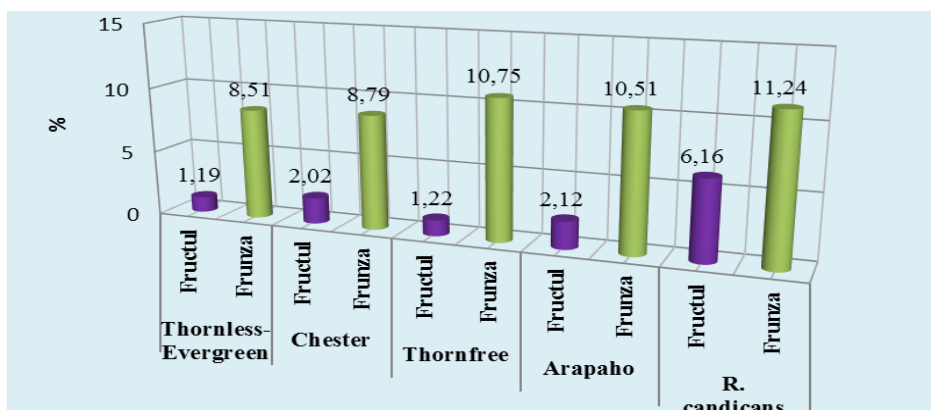


Fig. 4.20. Conținutul de substanțe tanante (%) în extractele de frunze și fructe la diferiți taxoni de mur

Astfel, atât fructele, cât și frunzele pot fi utilizate ca sursă de materie primă cu conținut de substanțe tanante în industria farmaceutică. Deși, mulți consideră, că doar fructele de mur pot fi utilizate în scop terapeutic, empiric, iar în ultimele decenii s-a demonstrat și experimental, că și frunzele de mur prezintă interes în medicina naturistă [60-62, 65, 107, 184]. Anume, datorită conținutului taninic, frunzele de mur sunt recomandate în diferite deranjamente gastro-intestinale provocate de toxicoinfecții, sângerări ale gingiilor și infecții ale cavității bucale, răni cutanante etc. [94, 99, 129]. Fructele și frunzele soiurilor analizate conțin cantități suficiente de taninuri hidrolizabile așa ca galotaninele și elagitaninele, dar în deosebi ale speciei *R. candicans*. Deși se cunosc proprietățile farmacologice ale acestora, totuși produsele vegetale bogate în taninuri trebuie consumate cu precauție, deoarece pot avea efecte negative asupra ficatului [119, 121, 123].

De aceea fructele și frunzele taxonilor de mur studiați necesită cercetări profunde farmacognostice și farmacologice pentru a putea fi valorificate în calitate de produse vegetale oficinale cu conținut taninic.

4.3.3. Analiza cantitativă a acidului ascorbic

Acidul ascorbic se sintetizează doar în celulele vegetale, inclusiv și în fructele de mur [103, 104]. Vitamina C asigură permeabilitatea vaselor sanguine mărește rezistența capilarelor sanguine, diminuează tensiunea arterială, induce imunitate și vitalitate, contribuie la prevenirea și combaterea scorbutului [160]. Grație capacității de captare a radicalilor liberi acidul ascorbic este bine venit în profilaxia și prevenirea unor patogenii cum ar fi diabetul zaharat, herpesul, imunodeficiența, cancerul [12, 13, 103]. Toate acestea au servit drept temei pentru identificarea

acidului ascorbic și în soiurile de mur multiplicare *in vitro* și acclimatizate în condițiile pedo-climatice ale R. Moldova.

Analiza cantitativă a acidului ascorbic a fost efectuată prin metoda titrimetrică [44], bazată pe proprietatea acidului ascorbic de a reduce 2,6-diclorfenolindofenolul. Dozarea s-a efectuat în extractele apoase ale fructelor soiurilor ‘Arapaho’, ‘Chester’ și ‘Thornless-Evergreen’. Astfel, s-au luat 2 g de produs vegetal și s-au pisat în mojar, adăugând treptat 30 ml de apă distilată. S-a macerat 10 minute, apoi s-a amestecat, centrifugat și filtrat. Ulterior, într-un balon conic de 50 ml s-a pus 1 ml soluție HCl 2 %, 1 ml din extractul obținut și 13 ml de apă și s-a titrat cu microbiuretă cu soluție de 2,6-diclorfe-nolindofenolat de sodiu 0,001 N (Figura A.8.19) până la apariția culorii roz, care persistă timp de 0,5-1 minut. Titrarea s-a efectuat cel mult 2 minute. 1 ml soluție 2,6-diclorfenolindofenolat de sodiu 0,04 % (sau 0,001 N) corespunde la 0,000088 g de acid ascorbic.

Conținutul procentual al acidului ascorbic (x) în raport cu produsul vegetal uscat s-a calculat după formula:

$$x = \frac{V \cdot F \cdot 0,000088 \cdot V_1 \cdot 100 \cdot 100}{m \cdot V_2 \cdot (100 - \omega)} \quad (4.2.)$$

în care:

V – volumul (ml) soluției 2,6-diclorfenolindofenolat de sodiu 0,001 N, care s-a consumat la titrare;

F – coeficientul de rectificare a titrului soluției de 2,6-diclorfenolindofenolat de sodiu 0,001 N;

V1- volumul extractului corespunzător probei de produs vegetal, ml;

m – masa probei de produs vegetal, g;

V2 – volumul extractului luat pentru titrare, ml;

ω - pierderea din masa produsului vegetal la uscare, %.

Rezultatele obținute privind conținutul (%) acidului ascorbic în fructele soiurilor ‘Arapaho’, ‘Chester’ și ‘Thornless-Evergreen’ sunt reprezentate în Figura 4.21.

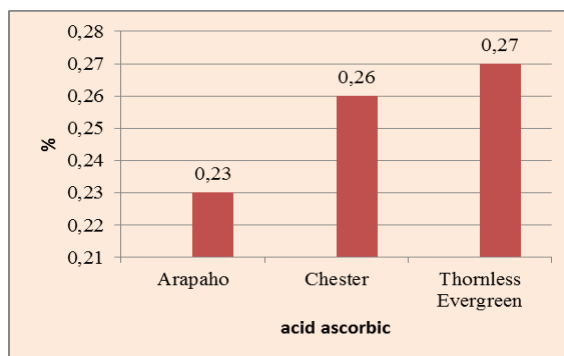


Fig. 4.21. Conținutul acidului ascorbic (%) în fructele soiurilor noi de mur

Datele obținute denotă că diferențe mari în conținutul acidului ascorbic la soiurile analizate nu sunt, dar totuși, cea mai mare cantitate revine fructelor soiului ‘Thornless-Evergreen’ (0,27%), puțin cedează fructele soiului ‘Chester’ (0,26%) și cea mai mică cantitate a fost în fructele soiului ‘Arapaho’ (0,23%). Atât rezultatele obținute la fructele soiurilor de mur cercetate, cât și datele din literatura de specialitate [160, 165, 184] arată că fructele de mur conțin cantități suficiente de acid ascorbic.

4.4. Concluzii la capitolul 4

1. Soiurile de mur ‘Thornless Evergreen’, ‘Chester’, ‘Triple Crown’, ‘Black Satin’, ‘Reuben’, ‘Polar’, ‘Arapaho’, ‘Thornfree’, ‘Smoothstem’ cu caracteristici valoroase: rezistența la îngheț, rezistența la secetă, la acțiunea fitopatogenilor, maturarea eşalonată a fructelor, durata mai mare de păstrare, calitățile noi gustative, fermitatea la manipulări, ar asigura consumatorul din R. Moldova cu fructe proaspete bogate în diverse vitamine, constituenți și alte substanțe biologice active (SBA).

2. Studiul anatomic comparativ al speciei din flora spontană și soiurilor de mur crescute în condiții de teren deschis și seră au pus în evidență indicatorii anatomici cu caracter adaptiv la condițiile nefavorabile așa ca: gradul de pubescență, gradul de dezvoltare al epidermei și derivatelor ei, indicele coraportului grosimii epidermă/limb, epidermă superioară/inferioară, mezofil/limb, gradul de dezvoltare și distribuire a druzelor de oxalat de calciu.

3. *Screening-ul* biochimic calitativ (reacții specifice și CSS) comparativ al flavonozidelor în produsele vegetale de frunze și fructe la soiurile de mur denotă că în toate extractele de produse vegetale analizate sunt prezenți aceiași constituenți flavonoidici: flavone, flavonone, flavonoli, catechine, antocieni, calcone și aurone. Studiul chimic comparativ cantitativ al flavonozidelor prin metoda spectrofotometrică a scos în evidență că cea mai mare cantitate de flavonozide se găsește în frunzele soiului ‘Chester’ (3,152%), urmată de frunzele soiului ‘Thornfree’ (2,950%) și frunzele soiului *R. candicans* din flora spontană 2,893%).

4. Conform rezultatelor studiului efectuat conținutul de taninuri în produsele vegetale variază, cantitatea de substanțe tanante fiind de câteva ori mai mare în extractele din frunze decât din cele din fructe, motiv pentru care și au o largă utilizare în diferite afecțiuni medicale. Prin metode calitative s-au identificat substanțe tanante hidrolizabile, catechine, acid galatonic, pirogalol, acid galic. Comparativ cu datele altor studii, substanțele antioxidante (SBA) identificate la soiurile noi de mur studiate, corespund cantitativ, ceea ce justifică creșterea și dezvoltarea plantelor de mur în R. Moldova

CONCLUZII GENERALE

1. A fost elaborată schema biotehnologică de producere a materialului săditor uniform, omogen, robust, sănătos la soiurile introductive de mur fără spini: ‘Arapaho’, ‘Triple Crown’, ‘Black Satin’, ‘Loch Ness’, ‘Polar’, ‘Thornfree’, ‘Smoothstem’, ‘Thornless Evergreen’, ‘Reuben’, ‘Chester’ prin microtehnici *in vitro*. Multiplicarea *in vitro* a plantulelor prin microbutășire constituie o metodă eficientă și profitabilă în condiții ecologice controlate și cu factori biologici, chimici, fizici determinați și manipulabili [26, 30].

2. Au fost stabilite condițiile optime pentru organogeneza inoculilor, ca sursă de material biologic au servit meristeme ale lăstarilor apicali și laterali. Fortificarea capacității de proliferare a lăstarilor pe mediul nutritiv de bază MS suplinit cu diferite doze ale regulatorilor de creștere BAP (0,3; 0,5; 0,7 mg/l), microclonarea selectivă și creștere a lăstarilor a fost obținută pe combinații ale regulatorilor de creștere (BAP – 0,3; 0,5; 0,7 mg/l; BAP+AIB+AG₃ ; BAP +AIA+GA₃ mg/l; BAP+NAA+GA₃ – cu dozele de 0,3+0,2+0,1 mg/l) [31, 54, 55, 112, 113, 115, 116].

3. Calusogeneza a fost inițiată grație acțiunii selective a regulatorilor de creștere în suplینirea mediului nutritiv de bază MS asupra inoculilor din limb foliar: calusogeneza (BAP – 1,50 mg/l și 1,0 mg/l); BAP 1,0 mg/l+NAA (0,2; 0,5; 1,0 mg/l); BAP 1,0 mg/l+IAA (0,2; 0,5; 1,0); KIN (1,50 mg/l, 1,0 mg/l), KIN 1,0 mg/l +NAA 0,1 mg/l) și inițierea plantulelor din calus (morfogeneza) pe mediul MS suplinit cu (BAP 2,0 mg/l) [111].

4. Rizogeneza a fost indusă, atât pe mediul de bază MS suplinit cu regulatori de creștere AIB, AIA, ANA (0,2 mg/l), cât și pe mediile nutritive MS 100% modificat și MS 50%. Aclimatizarea *ex vitro* a fost efectuată în 3 etape prin testarea a 3 tipuri de substrat și optimizarea condițiilor de adaptare a plantulelor în seră și teren deschis. Soiurile de mur fără spini au fost aclimatizate cu o rată de viabilitate de 99%, iar perioadă mai potrivită revine lunilor de primăvară-vară [114, 154].

5. Studiul anatomic al frunzelor a scos în evidență indicii structurali specifici taxonilor, iar cel comparativ al soiurilor de mur în condiții de teren protejat și deschis a evidențiat indicii anatomici cu caracter adaptiv la acțiunea condițiilor nefavorabile (excesul de temperaturi, secetă, îngheț): cuticula groasă de tip extern-intern, pubescența din peri tectori unicelulari scurți, lungi în soclu bazal brunificat, solitari sau în mănunchi, distribuiți pe nervuri și pe toată suprafața, druze de oxalat de calciu și modul de distribuire [71, 114].

6. Studiul cantitativ al unor clase de compuși chimici arată că conținutul (%) corelează cu organul și taxonul: frunzele acumulează mai multe flavonoide și taninuri, decât fructele la toți taxonii analizați: flavonoide în frunzele soiurilor ‘Chester’ – 3,152 și ‘Arapaho’ – 2,703, iar în

fructele soiurilor ‘Chester’ – 1,983, ‘Thornless-Evergreen’ – 1,640 și ‘Thornfree’ – 1,445; conținutul maxim de taninuri a fost în frunzele speciei *R. candicans* (11,24), urmat de soiurile ‘Thornfree’ (10,75), ‘Arapaho’ (10,51), ‘Chester’ (8,79) și ‘Thornless-Evergreen’ (8,51), iar fructele – 6,16 la specia *R. candicans*, de 3 ori mai puțin la soiurile ‘Arapaho’, ‘Chester’ și de cca 5 ori mai mic la ‘Thornfree’ și ‘Thornless-Evergreen’. Fructele au aproape același conținut (%) de acid ascorbic la soiurile: ‘Thornless-Evergreen’ – 0,27, ‘Chester’ – 0,26 și ‘Arapaho’ – 0,23 [70].

7. Au fost stabilite condițiile și elementele tehnologice primare de plantare și îngrijire a plantelor pentru înființarea colecției cu arbuști de mur în GBNI, destinată extinderii, conservării genofondului și cercetării științifice, care cuprinde 10 soiuri adaptate la condițiile pedoclimatice și sunt de perspectivă pentru ramura agro-industrială a R. Moldova. Au fost stabilite procedeele agrotehnice în corelație cu habitusul și potențialul de plasticitate structural-adaptivă pentru proiectarea, înființarea și întreținerea plantațiilor industriale [75, 76].

8. A fost întocmit calendarul înfloririi și coacerii fructelor soiurilor de mur: ‘Arapaho’ – precoce; medie – ‘Loch Ness’, ‘Polar’, ‘Black Satin’, ‘Triple Crown’; semitardivă – ‘Thornfree’, ‘Smoothstem’, ‘Thornless Evergreen’, ‘Reuben’ – remontant; ce permite recoltarea eşalonată, asigurând consumatorul pe un termen de circa 20 săptămâni (140 zile), cu fructe proaspete bogate în compuși chimici valoroși și calități organoleptice înalt apreciate [117].

RECOMANDĂRI PRACTICE

1. Se recomandă tehnologia de multiplicare *in vitro* a plantelor soiurilor introduse de mur (‘Arapaho’, ‘Triple Crown’, ‘Black Satin’, ‘Loch Ness’, ‘Polar’, ‘Thornfree’, ‘Smoothstem’, ‘Thornless Evergreen’, ‘Reuben’, ‘Chester’) pentru condițiile pedo-climatice ale R. Moldova în scopul obținerii materialului săditor omogen, viguros, avirotic pentru înființarea plantațiilor industriale moderne.

2. Soiurile ‘Arapaho’, ‘Triple Crown’, ‘Black Satin’, ‘Loch Ness’, ‘Polar’, ‘Thornfree’, ‘Smoothstem’ sunt recomandate pentru grădini particulare ca sursă de fructe, iar soiurile ‘Thornless Evergreen’, ‘Reuben’ – în calitate de arbuști decorativi și ca sursă de fructe.

3. Soiurile ‘Arapaho’, ‘Triple Crown’, ‘Black Satin’, ‘Loch Ness’, ‘Polar’, ‘Chester’ sunt recomandate pentru plantații industriale în R. Moldova. Sunt recomandate criteriile de selectare a terenului (expoziția, compoziția solului, pH-ul solului), metodologia de plantare, procedeele agrotehnice (plantarea, lucrările manuale/mecanice de întreținere a plantelor, tipurile de suporturi, modul de amplasare și de sprijin, condițiile și modul de irigare, tehnica și termenii de tăiere pentru formarea arbustului și de rod, tehnica și termenele de recoltare) în plantațiile de mur din R. Moldova.

BIBLIOGRAFIE

1. Achim G. ș.a Ghidul Pepeinieristului pomicultor. Pitești Mărăcineni: INVEL Multimedia 2014. 68 p.
2. Badea E., Raicu P. Culturi de celule și țesuturi vegetale. Aplicații în agricultură, Ceres, 1984. 143 p.
3. Badea E., Săndulescu D. Biotehnologii vegetale. București: Fundația Biotech, 2001, p. 143-156.
4. Balan V. ș.a. Cultura arbuștilor fructiferi și căpșunului, Chișinău: „Bons Offices”, 2017, 434 p.
5. Bojor O., Popescu O. Fitoterapia tradițională și modernă. București: Fiat Lux, Vol. 1-4, 2004, 466 p.
6. Botez M., Badescu G., Botar A. Cultura arbuștilor fructiferi, București: Ceres, 1984, 186 p.
7. Cachiță-Cosma D. Tratat de biotehnologii vegetale. București, 2004.
8. Cachiță-Cosma D., Sand C. Biotehnologie vegetală. vol I: Baze teoretice și practice, Sibiu: Mira Design, 2000, 288 p.
9. Cachiță-Cosma D., ș. a., Tratat de biotehnologie vegetală, Cluj-Napoca: „Dacia”, vol 1, 2004. 433 p.
10. Cachiță-Cosma D. Metode *in vitro* la plantele de cultură. Baze teoretice și practice. București: Ceres, 1987, 276 p.
11. Calalb T. Structura și compoziția biochimică a fructelor de *Aronia Melanocarpa* (Michx.) Elliot *in vivo* și *in vitro*, Teză de dr. hab., Chișinău 2010, 312 p.
12. Calalb T. Structuri anatomice ale fructelor de *Aronia Melanocarpa* (Michx.) Elliot. În: Buletinul AȘM, Științe ale vieții. nr. 2 (305), 2008, p. 54-62.
13. Calalb T. *Aronia Melanocarpa* (Michx.) Elliot: (structura, biotehnologia, biochimia fructelor), Chișinău: Digital Hardware SRL, 2010, 148 p.
14. Calalb T., Gorceag M., Chiru T., Ciorchină N., Studiul comparativ al conținutului polifenolic în frunzele și fructele sp. *Lycium barbarum* L. spontan și cultivat. În: Buletinul AȘM, științe medicale 2 (54), 2017, p. 211-216.
15. Chira L. Cultura arbuștilor Fructiferi. București: M.A.S.T., 2009, 97 p..
16. Ciorchina N. Realizări și perspective privind cercetări biotehnologice în Grădina Botanică (I) a AȘM, În: Materialele Simpozionului Internațional ”Conservarea diversității plantelor”, Chișinău, 2012, p. 89-91.

17. Ciorchină N., Sofroni M., Clapa D. Contribuții privind studierea înmulțirii *in vitro* la *Fresia Klatt* (Hibrios), În: Materialele Simpozionului Internațional "Conservarea diversității plantelor", Chișinău, 2010, p. 31-37.
18. Ciorchină N., Lozinschii M. Înmulțirea *in vitro* a unor noi specii de arbuști fructiferi de interes economic pentru Republica Moldova În: „Știința în Nordul Republicii Moldova: realizări, probleme, perspective”, materialele conferinței naționale cu participare internațională (ediția a doua), Bălți, 2016, p. 50-54.
19. Ciorchina N. Realizări și perspective privind cercetări biotehnologice în Grădina Botanică (I) a AȘM, În: Materialele simpozionului Internațional "Conservarea diversității plantelor", Chișinău, 2012, p. 89-91
20. Ciorchină N. ș.a. Caracteristicile citoembriologice și biomorfologice ale proceselor de regenerare *in vitro* și *ex vitro* a unor culturi noi pentru Republica Moldova. În: Analele Universității din Craiova, vol.VII (XLIII), 2002, Cluj-Napoca, 2004, p. 224-227.
21. Codreanu V. Anatomia comparată a viței de vie. Chișinău: Combin. Poligraf, 2006, 252 p.
22. Cutcovschi-Muștuc A. Particularitățile biomorfologice ale speciei *Withania somnifera* la multiplicarea și dezvoltarea *in vitro*. Teză de dr. în biologie, Chișinău, 2014, 147 p.
23. Gheorghiță G.I., Onisei T. Biotehnologiile și progresul social-economic. Lucrările stațiunii „Stejarul”, Piatra-Neamț Vol. XI, 1990, p. 55-83.
24. Grati V., Begu A., Pulbere E., Nedbaliuc B. Botanică. Chișinău: Evrica, 2005, 394 p.
25. Lozinschii M., Ciorchină N. Înființarea colecției de mur în Grădina Botanică În: Conservarea diversității plantelor *in situ* și *ex situ*., Iași, Ediția a IX-a 2016, p. 46-47.
26. Lozinschii M., Ciorchină N. Microclonarea soiurilor de mur ‘Polar’ și ‘Arapaho’. În: Tendințe Contemporane ale dezvoltării științei: Viziuni ale tinerilor cercetători, Chișinău, 2015, p. 79.
27. Lozinschii M., Ciorchină N., Calalb T. Multiplicarea *in vitro* a varietăților de *Rubus* sp. ca sursă de substanțe biologice active. În: Biotehnologii avansate realizări și perspective, materialele al IV-lea simpozion național cu participare internațională, 2016, p. 37.
28. Lozinschii M. Optimizarea și regenerarea prin metoda vitroculturilor a unor specii de arbuști fructiferi. În: „Viitorul ne aparține”, Conferința masteranzilor și studenților, Chișinău, 2013, p. 41.
29. Lozinschii M. Multiplicarea prin metode biotehnologice ale unor soiuri valoroase de arbuști fructiferi. În: Viziuni ale tinerilor cercetători tendințe contemporane ale dezvoltării științei, Conferința Științifică Internațională a Doctoranzilor, Chișinău, 2014, p. 49.

30. Lozinschii M., Ciorchină N. Particularitățile microclonării soiurilor de mur fără spini 'Chester' și 'Loch Ness'. În: Revista Botanică, Vol.V, Nr.3 Chișinău, 2013, p. 15 - 25.
31. Lozinschii M. Introducerea cultivarelor de mur în cultura *in vitro*. În: Tendințe contemporane ale dezvoltării științei, viziuni ale tinerilor cercetători, materialele Conferinței Internaționale a Doctoranzilor, Chișinău, 2016, p. 200-204.
32. Mărușteri M. Noțiuni fundamentale de biostatistică. Tîrgu-Mureș: Free Software Foundation ,2006, 230 p.
33. Mihalache S. Contribuții la îmbunătățirea tehnologiei de micropropagare *in vitro* a zmeurului și murului fără ghimpi (teză de doctorat). Universitatea de Stiințe Agricole și Medicină Veterinară, Cluj-Napoca, 1996, 280 p.
34. Mircea A., Ovidiu B. Flora medicinala a României, Vol I, București: Ceres, 1988, 221 p.
35. Miron A., Stănescu U. Antioxidanții naturali între medicament și aliment. Iași: Gr. T. Popa, 2003,164 p.
36. Mișcu V. ș.a. Activitatea antiradicalică și antioxidantă a extractului etanolic de astaxantină. p. 127-136
37. Mîrza A. Tayberry – hibrid intrespecific mur zmeur. În: Viziuni ale tinerilor cercetători tendințe contemporane ale dezvoltării științei, conferința științifică internațională a doctoranzilor, Chișinău, 2014, p. 52.
38. Mîrza A, Ciorchină N., Comanici I. Microclonarea și micropropagarea arbuștilor hibrizi de mur×zmeur *Rubus Loganbaccus* L.H. Bailey Hybridberry. Revista „ Studias Universitatis Moldaviae", Nr.1 (101), Chișinău, 2017. p. 69-74.
39. Negru A. Determinator de plante din flora Republica Moldova. Chișinău: Universul, 2007, 391 p.
40. Nicolae Ș. Pomi, arbuști fructiferi, câpșun – Ghid Tehnic Economic. Otopeni: Invel Multimedia, Pitești, 2014, 324 p.
41. Nicolae Ș., Oprea A. Botanică sistematică, Iași: Editura universității „Alexandru Ioan Cuza” 2007, 552 p.
42. Nistoreanu A., Calalb T. Analiza farmacognostică a produselor vegetale medicinale, Chișinău, Medicina, Elan Poligraf, 2016, 316 p.
43. Nyárády E. *Rubus* L. În: Flora Republicii Populare Române. București: Ed. Academiei Republicii Populare Române, 1956, vol. IV, p. 276-580.
44. Oniga I. ș.a Analiza produselor naturale medicinale, Cluj-Napoca: UMF „ Iulia Hațieganu, 2004, 68 p.
45. Palancean A., Comanici I. Dendrologie. Chișinău. 2009. 520 p.

46. Palii A., Comarov G., Lozan A., Scorpan V. Biotehnologii moderne în fitotehnie și biosecuritate. Chișinău: Editura Centrală, 2004. 232 p.
47. Popescu A., Sanda V. Conspectul florei cormofitelor spontane din România. În: Lucrările Grădinii Botanice. București: Ed. Universității din București, 1998. 336 p.
48. Sava P. ș.a Cercetări orientate la dezvoltarea culturilor baciefere. Revista de Știință, Inovare, Cultură, Artă „Academos”, Chișinău, nr.2 (37), 2015, pag. 111-116.
49. Stănică F., Braniște N. Ghid pentru pomicultori. București: Ceres, 2011, 259 p.
50. Toma C., Rugină R. Anatomia plantelor medicinale. Atlas. București: Editura Academiei române, 1998, 320 p.
51. Гейдеман Т. Определитель высши растений МССР, Кишинёв, 1986, 638 с.
52. Дерфлинг К. Ю. Гормоны растений. М.: Мир 1985, 303 с.
53. Калинин Ф. Л., Кушнир Г. П., Сарнацкая В. Технология микроклонального размножения растений. Киев: Наукова Думка, 1992, 232 с.
54. Лозинский М., Чоркинэ Н. Микроклонирование некоторых сортов бесшипной ежевики в культуре *in vitro*. В: Роль ботанических садов в сохранении разнообразия растений. Материалы Юбилейной Международной Научно-Практической Конференции, 2013 с. 295-297.
55. Лозинский М., Чоркинэ Н., Клапа Д. Клонирование *in vitro* некоторых сортов ежевики Материалы Международной Научной Конференции 200 летию НБС. Ялта, Украина 2012, стр. 128.
56. Полевой В. В. Фитогормоны. Ленинград: Изд-во ЛГУ, 1982, 248 стр.
57. Сарнацкая В., Калинин Ф. Л., Полищук В. Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. Киев: Изд-во Наукова Думка, 1980. стр 320.
58. Тодираш В. Практическое руководство. Кишинэу: Изд-во „Bons Offices”, 2017, 295 стр.
59. Abd Alla M., Mostafa R. *In vitro* propagagtion of blakberry (*Rubus fruticosus* L.) Assisut Journal agricultural Sciences, Egypt, (46) No. (3) 2015 p. 88-99
60. Ahmad S. et. al. Ethnobotanical studies on some medicinal plants of Booni Valley, District Chitral, and Pakistan. In : Pak. J. Weed Sci. 2006, v o l . 12, p . 183-190.
61. Ajaib, M., Khan, Z., Khan, N., Wahab M. Ethnobotanical studies on useful shrubs of district Kotli, Azad Jammu and Kashmir, Pakistan. Pak. In: J. Bot. 2010, Vol. 42, p. 1407-1415.
62. Ali N.et al. Acute toxicity, brine shrimp cytotoxicity, anthelmintic and relaxant potentials of fruits of *Rubus fruticosus* Agg. BMC Compl. Alter. Med. vol. 13, 2013, p. 138.

63. Agaoglu Y., Eydurán S., Eydurán, E. Comparison of some pomological characteristics of blackberry cultivars growth in Ayas conditions. In: J. Agric. Sci. 2007, vol.13, 69-74.
64. Arditti J., Krikorian D. Orhid micropropagation: the path of laboratory commercialization and an account of severar unappreciated investigators. In: Botanical Journal of the Linnean Society, 1996, vol. 122, p. 183-241.
65. Bames J., Anderson A., Philipson D. Herbal Medicines, Third Edition, London: Pharmaceutical Press, 2007, 690 p.
66. Bobrowski, V. L., Mello-Farias P. C. and Peters J. A. Micropropagation of blackberries (*Rubus sp.*) cultivars. Rev. Bras. De Agrociencia, 2(1), 1996, p.17-20.
67. Brand-Williams W., Cuelier M., Bereset C. Use of a free radical Method to evaluate Antioxidant Activity. In: Food Science and Tecchnology, 1995, vol. 28, 25-30 p.
68. Buyukbalci A., Sedef N. Determination of *in vitro* anti-diabetic effects, antioxidant activities contents of blackberry genotypes from Turkey. In: Food Chem. 2006, vol. 97, 732-736 p.
69. Calalb T. et al., Macrosscopically and microscopically study of aswagandha plants *Withania somnifera* (L.) Dunal. In: Journal of botany, vol. VII, Nr. 2 (11), Chişinău, 2015, p. 11-16.
70. Calalb T., Ciorchina N., Lozinschii M., Oprea V. Biological and phytochemical study of some new cultivars of blackberry, multiplied by biotechnology *in vitro*. In: The Xth International Congrees of Geneticistis and breeders, Chisinau, 2015, 181 p.
71. Calalb T., Lozinschii M., Ciorchina N. The comparative morfpho-anathomical study of new cultivars and some species of blackberry, In: Journal of botany, vol. IX, Nr. 1 (14), Chişinău, 2017, p. 5-14.
72. Calalb T., Oroian S., Samirhitan M. The structures indicatos in definition of chokeberry fruit resistance to environment factors during storage. Modern Phytomorphology, 2nd International Scientific Conference on Plant Morphology, Lviv, vol. 4, 2013, p. 185-188.
73. Carter P., et al. Chiling Response of ArKansas Blackberry Cultivars. In: Journal of American Pomological Society, Vol. 60(4), 2006, p.187-197.
74. Chen L. et al. Phytochemical properties and antioxidant capacities of various colored berries. In: J Sci Food Agric, 2014, vol. 94(2), p.180- 188.
75. Ciorchină N., Cutcovschi- Muştuc A., Lozinschii M. Features of cultivation of blackberry in the Republic of Moldova. In: Journal of botany vol. IX, nr. 2 (15), Chisinau, 2018, p. 5-14.
76. Ciorchină N. Cutcovschi-Muşţuc A., Lozinschii M. Blackberry – importance, origin and value. In: Journal of botany vol. IX, nr. 2 (15), Chisinau, 2018, p. 15-22.
77. Ciorchina Nina et al. The Biology ot the propagation of species *Shisandra Chinesis* (Turcz) Ball, In: Journal of plant Development vol. 18, Iaşi, 2011, p. 17-23.

78. Clark J. et al. Blackberry breeding and genetics, In: Plant Breeding Reviews, 2007, vol. 29 p. 19-147.
79. Clark J., Changing times for eastern United States blackberries. In: Hort tehnology, 2005 vol. 15, p. 491-494.
80. Clark J., Perkins –Veazie P., APF- 45 primocane fruiting blackberry In: Hort Science vol 46, 2011, p. 670-673.
81. Collins M. Medieval herbs. In: The illustrative traditions. London, 2000, p. 39-105
82. Crespo P. et. al. Characterisation of major taste and health-related compounds of four strawberry genotypes grown at different Swiss production sites. In: Food Chemistry, 2010 vol. 122, p. 16-24.
83. Davik J., Bakken A., Holte K., Blomhoff R. Effects of genotype and environment on total anti-oxidant capacity and the content of sugars and acids in strawberries (*Fragaria X ananassa* Duch.). In: Journal of Horticultural Science & Biotechnology. 2006; vol 81(6), p. 1057-1063.
84. Defraigne J., Dommes J. Cultivars, culture conditions, and harvest time influence phenolic and ascorbic acid contents and antioxidant capacity of strawberry (*Fragaria X ananassa*). In: Journal Food Sci. vol 77(2), 2012, p. 205-210.
85. Denev P. et al. Solid-phase extraction of berries anthocyanins and evaluation of their antioxidative properties. In: Food Chem. 2010, vol. 123, p. 1055-1061.
86. Evans J. 'Systematics of the *Rubus fruticosus* aggregate (Rosaceae) and other exotic *Rubus* taxa in Australia'. In: Australian Systematic Botany, vol. 20, Nr. 3, p. 187-251.
87. Fedriani J., Delibes M. Functional diversity in fruit-frugivore interactions: a field experiment with Mediterranean mammals. Ecography 2009. vol. 32, p. 983-992.
88. Fernandez G., Ballington, J. Growing blackberries in North Carolina. In: North Carolina Cooperative Extension Service, North Carolina University Press. 2015, p. 2.
89. Fira Al., Clapa D., and Plopa C. New Aspects Regarding the Micropropagation of Blackberry Cultivar 'Thornless evergreen'. Bulletin UASVM Horticulture, vol. 67 (1), 2010 p.66-69.
90. Fira A., et al. The application of hidroculture for rooting cuttings in some horticultural species. Materialele Simpozionului Internațional „Conservarea diversității plantelor”. Ediția a II-a. 2012, Chișinău, 2012, p.19-27.
91. Fira, Al., Clapa D. Ex-Vitro Acclimation of some horticultural species in Hydroculture. In: Bulletin UASVM, nr. 66 (1), Horticulture, 2000, p. 44-51.
92. Franceschi V., Nacata P. Calcium oxalate in plants: formation and function. In: Annu Rev Plant Biol, vol. 56, 2005, p. 41-71.

93. Galleta G., et al. 'Triple Crown' Thornless Blackberry. In: Fruit varieties journal, Vol. 52 (3), 1998, p.124-127.
94. Hegedus A. et al. Comparative nutrient element and antioxidant characterization of berry fruit species and cultivars grown in Hungary. Hortscience. 2008, vol. 43(6) p. 1711-1715.
95. Herrmann. et al. Blackberry leaf extract: a multifunctional anti-aging active. In: Int. J. Cosmetic Sci. 2007, vol. 29, p. 411.
96. Heslop-Harrison Y. *Rubus* L. In: Tutin T. G. et al. (Eds.) *Flora Europaea*. Cambridge University Press, 1968, v. 2, p. 15.
97. Huang W., Zhang H., Liu W., Li C. Survey of antioxidant capacity and phenolic composition of blueberry, blackberry, and strawberry in Nanjing. J. Zhejiang In: Univ. Sci. B 2012, vol-13, p. 94-102.
98. Hummer K, Janic J. *Rubus* iconography: antiquity to the renaissance. In: Acta Horticulturae, 2007, vol. 759 p. 89-106. Definition of Chokeberry fruit
99. Ivanovic J. et. al. Antioxidant properties of the anthocyanin-containing ultrasonic extract from blackberry cultivar "Cacanska Bestrna". In: Indust. Crop. Prod. 2014, vol. 53, p. 274-281.
100. Janick J. The origin of fruit, fruit growing, and fruit breeding. In: Plant Breeding Rev, vol. 25, 2005, p. 255-320.
101. Kaplan A., Hasanglu A., Ince I. Morphological, anatomical and palynological proprieties of some turkish *Veronica* species (Scrophulariaceae). In: International Journal of Botany, vol.3 (1), 2007, p. 23-32.
102. Kevers C. et al. Influence of cultivar, harvest time, storage conditions, and peeling on the antioxidant capacity and phenolic and ascorbic acid contents of apples and pears. In: Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2011; vol.59 (11), p. 6165-6171.
103. Kevers C. et al. Evolution of antioxidant capacity during storage of selected fruits and vegetables. In: Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2007, vol. 55 (21), p. 8596-8603.
104. Kevers C. et al. Antioxidant capacity of small dark fruit: Influence of cultivars and harvest time. In: Journal of Berry Research, vol. 4, nr. 2, 2014, p. 97-105.
105. Kolniak-Ostek J. et al. Characterization of phenolic compounds of thorny and thornless blackberries. In: Journal Agriculture Food Chemistry, 2015, vol. 63 (11), p. 3012-3021.
106. Kostecka-Gugała A. et al. Antioxidant properties of fruits of raspberry and blackberry grown in central Europe. In journal: Open Chemistry, vol.13, Issue 1, p.1313-1325.
107. Krisch J. et al. Effect of fruit juices and pomace extracts on the growth of Gram-positive and gram-negative bacteria. In: Acta Biol. Szeged. V o l . 52, 2008, p. 267-270.

108. Lawson T., Oxborought K., Morison J., Baker N., The responses of guard and mesophyll cell photosyntethesis to CO₂ , O₂ , lights and wather stress in a range of species are similar. In: Journal of Experimental Botany, vol. 54 nr. 388, 2003, p. 1743-1752.
109. Lazic T., Ruzic D. Organogenesis *in vitro* from the leaf of blackberry Čačanska Bestrna. In: Genetica, vol 39, nr.1, 2007, p. 69-78.
110. Lepse L., Laugale V. Micropropagation, rooting and acclimatization of blackberry “Agavam”. In: Acta horticulturae, 2008, p. 839.
111. Lozinschii M. *In vitro* morphgenesis of *Rubus* species. In: Journal of botany vol. IX, nr. 2 (15), Chisinau, 2017, p. 23-29.
112. Lozinschii M., Ciorchină N., Calalb T. Micropropagation of blackberry cultivars – perspectives for Republic of Moldova. In: Marisia, Studii și materiale, vol. XXXV, Științele naturii, 2015, p. 9-17.
113. Lozinschii M., Ciorchină N. Growth regulators influence on some varieties of blackberry cultivars during the micro-cloning process. International Symposium 3rd edition ‘Coservation of plant diversity ,` 3rd edition, Chisinau, 2014, p. 20.
114. Lozinschii M., Ciorchină N. Morphological and Biological aspects on blackberry varieties acclimatization in *ex vitro*. In: Journal of botany, nr. 2 (11), vol 7, 2015, p. 27-30.
115. Lozinschii M., Ciorchină N. The Characteristics of the *Evergreen* cultivar multiplication through microcloning. In: International Scientifc Symmposium “Conservation of plant Diversity” dedicated to the 65th anniversary of The Botanical Garden (I), Chisinau 2015, p. 75.
116. Lozinschii M., Ciorchină N. The particularities of microcloning blackberry cultivar ‘Chester’. In: 12th Symposium „Prospects for the 3rd Millenium Agriculture” 2013, p. 149
117. Lozinschii M. Biological Aspects of varieties of blackberry ‘Chester’ and ‘Thornless Evergreen’. In: International Scientifc Symmposium “Conservation of plant Diversity” Chisinau, 2017, p. 74 .
118. Magalhaes M., et al. Methodological aspects about *in vitro* evaluation of antioxidant properties. In: Analytica chimica acta, 2008, vol. 613, p. 1-19.
119. Mcnicol R. J., Graham J. In: Plant cell, tissue and organ culture, *in vitro* regeneration of *Rubus* from leaf and stem segments, 1990, vol. 21, p. 45-50.
120. Meng R., Chen T., Fin C., Li Y., Improving *in vitro* plant regeneration from leaf and petiol explants of *Marion* blackberry. In: HortScience, vol. 39(2), 2004,p. 316-320.
121. Milosevic T. et. al. Segregation of blackberry cultivars based on the fruit physico-Chemical attributes. In: Tar. Bil. Der. vol. 18, 2012, p. 100-109.

122. Morin L., Evans K. *Rubus fruticosus* L. aggregate - European blackberry. In: Mic Julien, Rachel McFadyen and Jim Cullen, editor/s. *Biological control of weeds in Australia*. Melbourne, Vic.: CSIRO Publishing, 2012. p. 499-509
123. Moyer R., Hummer K., Finn C., Frei B, Wrolstad R. Anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity in diverse small fruits: *Vaccinium*, *Rubus*, and *Ribes*. In: *Journal Agric Food Chem*. 2002, vol. 50(5) p. 19-25.
124. Murashige T. and Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. In: *Physiologia Plantarum*, 1962, vol. 15, p. 473-497.
125. Olsson M. et al. A antioxidants, low molecular weight carbohydrates, and total antioxidant capacity in strawberries (*Fragaria x ananassa*): Effects of cultivar, ripening, and storage. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, vol. 52(9) p. 2490-2498.
126. Ombrello T. "Crown of thorns". Union County College, Department of Biology, Cranford, NJ, 2015 p. 10.
127. Onica E. Comparative anatomy of the petioles of different genomic *cydonia*×*malus* hybrids. In: *Modern phytomorfology, 2nd International Scientific Conference on Plant Morphology*, Lviv, Vol. 4, 2013, p. 209-212.
128. Ozgen M, et al. Antioxidant capacity and phenolic antioxidants of midwestern black raspberries grown for direct markets are influenced by production site. In: *Hortscience*. 2008, vol. 43(7), p. 2039-2047.
129. Pantelidis G. et al. Antioxidant capacity, phenol, anthocyanin and ascorbic acid contents in raspberries, blackberries, red currants. In: *Pakistan J. of Botany*, vol.45(3), 2013, p. 909-914.
130. Piljac-Žegarac, J. Postharvest stability of antioxidant compounds in hawthorn and cornelian cherries at room and refrigerator temperatures-comparison with blackberries, white and red grapes. In: *Scientia Horti*, vol. 131, 2011, p. 15-21.
131. Pullaiah T. *Encyclopedia of World Medicinal Plants*; Anantapur Regency Publication: AP Nagoor, New Delhi, India, 2003, 480 p.
132. Rameshwar V., Tushar Gangrade, Rakesh Punasiya, and Chetan Ghulaxe, *Rubus fruticosus* (blackberry) use as an herbal medicine. In: *Pharmacogn Rev.* vol.8(16), 2014, p. 101-104.
133. Riaz M., Ahmad M., Rahman N. Antimicrobial screening of fruit, leaves, root and stem of *Rubus fruticosus*. In: *Journal Med Plant Res.*, vol. 5 (Suppl 24), 2011, p. 5920-5924.
134. Ružić D., Lazić T. Micropropagation as means of rapid of newly developed blackberry and black curant cultivars. In: *Agriculture Conspects Science*, vol. 71(4), 2006, p. 149-153.
135. Sangiovanni E., et al. Ellagitannins from *Rubus* berries for the control of gastric

- inflammation: *In vitro* and *in vivo* studies. In: Plos One, , vol. 8, 2013p. 762.
136. Seeram N. et al. Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells *in vitro*. In: Journal Agriculture Food Chemistry , vol. 54(25), 2006, p. 9329-9339.
 137. Sellappan S., Akoh C., Krewer G. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-grown blueberries and blackberries. In: J Agric Food Chem. vol. 50, 2002, p. 2432-2438.
 138. Sher H., Al-Yemeni M., Leonard W., Shah A. Ethnopharmacologically important medicinal plants and its utilization in traditional system of medicine, observation from the northern parts of Pakistan. In: J. Med. Plants Res. vol. 4, 2010, p.1853-1864.
 139. Siriwoharn T., Wrolstad R., Finn C., Pereira C. Influence of cultivar, maturity, and sampling on blackberry (*Rubus* L. hybrids) anthocyanins, polyphenolics, and antioxidant properties. In: J Agric Food Chem. vol. 52, 2004, p. 8021-8030.
 140. Škrovánková S. et.al. Bioactive Compounds and Antioxidant Activity in Different Types of Berries, In: International Journal Mollecular Sciience vol. 16 (10), Czech Republic, 2015, p. 24673-24706.
 141. Stajčić, S. et al . Chemical composition and antioxidant activity of berry fruits. In: Acta Period. Techn. vol. 43, 2012, p. 94-105.
 142. Stapleton P. et al. Obesity and vascular dysfunction. In: Pathophysiology, vol.15(2), 2008, p. 79-85.
 143. Stoner G. et al. Protection study of ternary mixtures and pectic gels of red fruit pulps. In: J. Food Sci. Technol. 2006, vol. 42, p.
 144. Strik B., Clark J., Finn C., Buller G. Managment of primocane fruit in blackberry to maximize yield and extend fruit season. In: Acta Hort, vol 777, 2008, p. 423-428.
 145. Strik B., Finn C. Blackberry Productin Systems – a Worldwide Perspective. In: Acta Hort vol. 946, 2012, 341 p.
 146. Strik B. Review of nitrogen nutrition of *Rubus*. In: Acta Hort, vol. 777, 2008, p. 403-410.
 147. Szajdek A., Borowska E. Bioactive compounds and health-promoting properties of Berry fruits: A review. Plant Food Hum Nutr., 2008, vol. 63(4), pag. 147-153.
 148. Tang H. et al. Plant regeneration from leaves of sweet and sour cheery cultivars. In: Scientia Horticulturae, 2002, vol.93, pag. 235-244.
 149. Takhtajan A. Diversity and classification of flowering plants. Columbia University Press, New York, 1997, 643 p.

150. Terry L., Chope G., Bordonaba J., Effect of water deficit irrigation and inoculation with *Botrytis cinerea* on strawberry (*Fragaria x ananassa*) fruit quality. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, vol.55(26), pag. 10812-10819.
151. Thompson E. et al. High tunnel vs. open field: management of primocane fruiting blackberry using pruning and tipping to increase yield and extend fruiting season. In: HortScience, vol. 44, 2009, pag. 1581-1587.
152. Tofan-Dorofeev E., Contributions to the study of *Rubus* L. (*Rosaceae* Juss.) Genus in the Flora of Republic of Moldova, In: Jour. of Botany, vol. VII, Nr. 2(11), Chisinau, 2015, pag. 73-75.
153. Tomlic-Wyremblewska A., Zielinski J., Curica M. Morphology and anatomy of blackberry pyrenes (*Rubus* L., *Rosaceae*) Elementary studies of the European representatives of the genus *Rubus* L.. In: Flora, vol. 205, 2010, pag. 370-375.
154. Trofim M., Ciorchina N., Lozinschii M., Cuzmin E. Adaptation of cultivars of the genus *Rubus* to *ex vitro* conditions, In: International Scientific symposium “Conservation of plant Diversity” dedicated to the 65th anniversary of the Botanical Garden (I), Chisinau, 2015, p. 111.
155. Tulipani S. et al. Antioxidants in strawberry: From the genotype to the fruit composition. In: Progress in Nutrition, vol. 10 (4), 2008, pag. 224-229.
156. Vdovenko-Martynova N., Kobylchenko N., Blinova T. Pharmacognostic research of bluish blackberry fruits *Rubus caesius* (L.) of the North Caucasus Flora. In: Modern Problems Of Science And Education, Nr. 1, 2014, pag. 103-123.
157. Villa F., et al. *In vitro* multiplication of blackberry (*Rubus* sp) Ebano in different MS medium concentration and BAP. In: Ciênc agrotec. Lavros, 2005, vol 29(3), pag. 582-584.
158. Villa F., Multiplicacao *in vitro* de amoreira-preta cultivar Brazos. In: Ciênc. Agrotec. Lavras, vol. 30(2), 2006, pag. 266-270.
159. Vujovic T. Adventitious regeneration in blackberry (*R. fruticosus* L.) and assessment of genetic stability in regenerants. In: Plant Growth regulators, vol. 61, 2010, pag. 265-275.
160. Wang S., Lin H. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. In: Journal Agric Food Chem. 2000; vol. 48, pag. 140-146.
161. Xu Y., Zhang Y., Chen M., Effective fractions of *Rubus fruticosus* leaf, its pharmaceutical composition and uses for prevention and treatment of diabetes. China Patent, 2006, CN1788755 A.
162. Zabihullah Q., Rashid A., Akhtar N. Ethnobotanical survey of Kot Manzary Baba

- valley, Malakand Agency, Pakistan. In: Pak. J. Pl. Sci. 2006, vol. 12, pag. 115-122.
163. Zawadzka M., Orlikowska T. The influence of FeEDDHA in red raspberry cultures during shoot multiplication and adventitious from leaf explants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, vol. 85, 2006, pag. 145-149.
 164. Zawadzka M., Orlikowska T. Factors modifying regeneration *in vitro* of adventitious shoots in five red raspberry cultivars. In: *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*, 2006, vol. 14, pag. 105-115.
 165. Zhang Y. et al. Phenolic compositions and antioxidant capacities of Chinese wild mandarin (*Citrus reticulata blanco*) fruits. In: *Food Chemistry*, 2014, vol.145, pag. 674-680.
 166. Zheng J. et al. Effects of latitude and weather conditions on contents of sugars, fruit acids, and ascorbic acids in black currant (*Ribes nigrum* L.) juice. In: *Journal of Agricultural and food chemistry*. 2009, vol. 57(7), pag. 2977-2981.
 167. Zia-Ul-Haq M., et al. *Rubus Fruticosus* L.: Constituents, Biological Activities and Health Related Uses, In: *Molecules*, vol 19, 2014, p.10998-11029 (vizitat 5.11. 2016)..
 168. CondeNast;<http://nutritiondata.self.com/facts/fruits-and-fruit-juices/1848/2>
<http://nutritiondata.self.com/facts/fruits-and-fruit-juices/1848/2>(vizitat 15.03. 2016).
 169. Health from nature. <http://health-from-nature.net>, (vizitat 15.03. 2016).
 170. Malcolm P. History of blackberry plants. <http://www.approvedarticles.com/Article/History-Of-Blackberry-Plants/1480> (vizitat 5.11. 2016).
 171. <http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/USDA> National Nutrient Data Base. line (vizitat 7.02.2017).
 172. <http://www.ayushveda.com/dietfitness/benefits-of-blackberry/> (vizitat 18 .11.2017).
 173. <http://www.businesspress.md/>(vizitat 12 .01. 2017).
 174. <http://www.livestrong.com/article/342261-health-benefits-of-raspberries-blackberries/>
(vizitat 2. 03. 2017).
 175. <http://www.multeplante.ro/arbusti-fructiferi/cId-16> (vizitat14 .03. 2017).
 176. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18953766>(vizitat 12.01. 2017).
 177. <http://www.slideshare.net/GherghescuGabriel/cultivarea-arbustilor-fructiferi>(vizitat13.04.2016).
 178. <https://mixfacts.ru/articles>. (vizitat 29.11.2017).
 179. <https://www.cultivatoridemure> (vizitat 29.12.2017).
 180. <https://www.environment.gov.au/biodiversity/invasive/weeds/publications/guidelines/wons/pubs/r-fruticosus.pdf> (vizitat 12.05.2017) Blackberry (*Rubus fruticosus* aggregate).

181. Loghin A., Idei de afaceri. În: Profit, Nr. 7-8, 2017(<http://www.profit.md/articles-ro/number>) (vizitat 3.02.2017.)
182. Plants for a Future. Available online: <http://www.pfaf.org/user/Plant.aspx?LatinName=Rubus> (vizitat 14.01.2018).
183. USDA National Nutrient Data Base. Available online: <http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/2180> (vizitat 23.06.2016).
184. WHO (World Health Organization) 2002; The World Health Report 2002: Reducing Risks, Promoting Healthy Life. WHO: Geneva. (vizitat 20.12.2017).

ANEXE

Anexa 1. Microclonarea soiurilor de mur



Fig. A 1.1. Plantule cultivate pe mediu Nr. 3, soiul 'Black Satin'

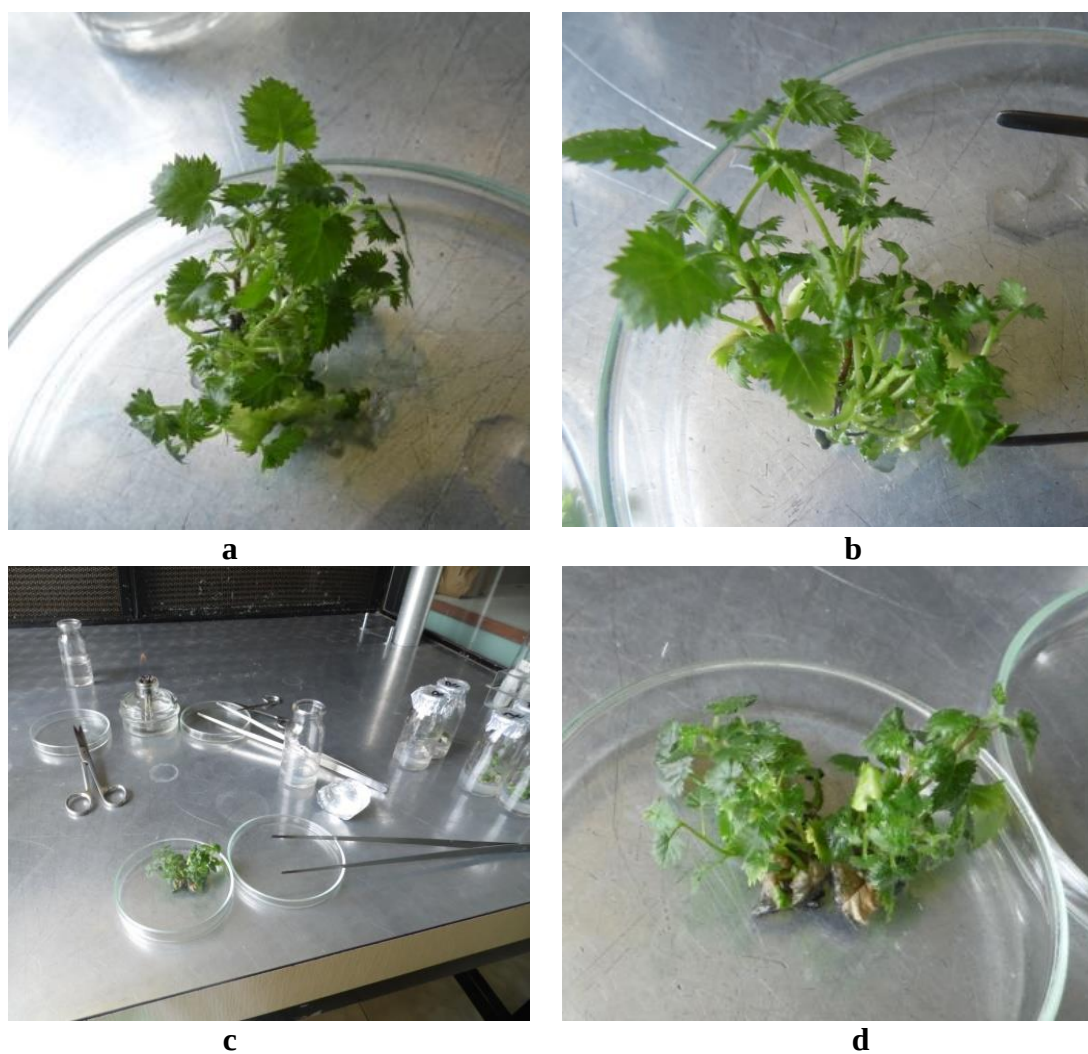


Fig. A 1.2. Microclonarea soiurilor de mur pe mediul nutritiv Nr. 2.
Notă: a, b – soiul 'Loch Ness', c, d – soiul 'Polar'

Anexa 1.
Microclonarea soiurilor de mur



Fig. A 1.3. Microclonarea soiului 'Triple Crown' pe mediul nutritiv Nr. 2



a



b



c



d

Fig. A 1.4. Microclonarea soiurilor de mur pe mediul nutritiv Nr. 2.

Notă: a, b, c, d — plantule de mur proliferate, soiul 'Arapaho'

Anexa 1.
Microclonarea soiurilor de mur



a



b

Fig. A 1.5. Microclonarea vitroplantulelor de mur pe mediul nutritiv Nr. 2.

Notă: a, b – soiul ‘Chester’



a



b



c



d

Fig. A 1.6. Proliferarea lăsatrilor pe mediul nutritiv Nr. 3.

Notă: a – ‘Arapaho’, b – ‘Loch Ness’, c – ‘Polar’, d – ‘Smoothstem’, pe mediul de cultivare Nr. 1.

Anexa 1.
Microclonarea soiurilor de mur



a



b

Fig. A 1.7. Microclonarea vitroplantulelor de mur, pe mediul nutritiv Nr. 2.
Notă: a – 'Reuben', b – 'Chester'.



Fig. A.1.8. Microclonarea soiului 'Triple Crown', pe mediul de cultivare Nr. 3.



Fig. A. 1.9. Microclonarea soiului 'Black Satin' pe mediul nutritiv Nr. 3.

Anexa 2.

Micropropagarea și rizogeneza soiurilor de mur



a



b



c



d



e



f

Fig. A. 2.1. Micropropagarea soiurilor de mur pe mediul de cultivare Nr.10.
 Notă: **a, b, c** – ‘Smoothstem’, **d** – ‘Thornfree’, **e, f** – ‘Loch Ness’.

Anexa 2.
Micropropagarea și rizogeneză soiurilor de mur



a



b



c



d



e



f

Fig. A. 2.2. Micropropagarea soiurilor de mur pe mediul Nr.10.
Notă: a – ‘Arapaho’, b – ‘Polar’, c – ‘Thornless Evergreen’, d – ‘Thornfre’, e, f – ‘Reuben’.

Anexa 3.

Rizogeneza pe medii suplimentate cu auxine (Nr. 7, Nr. 8, Nr. 9)



Fig. A. 3.1. Soiul 'Loch Ness'



Fig. A. 3.2. Soiul 'Polar'.



Fig. A. 3.2. Dezvoltarea sistemului radicular pe combinații de auxine, soiul 'Smoothstem'.



Fig. A. 3.3. Combinații de auxine mediul nutritiv Nr. 7, Nr. 8, Nr. 9 la soiul 'Chester'.

Anexa 4.
Calusogeneza și organogeneza obținută din limb foliar

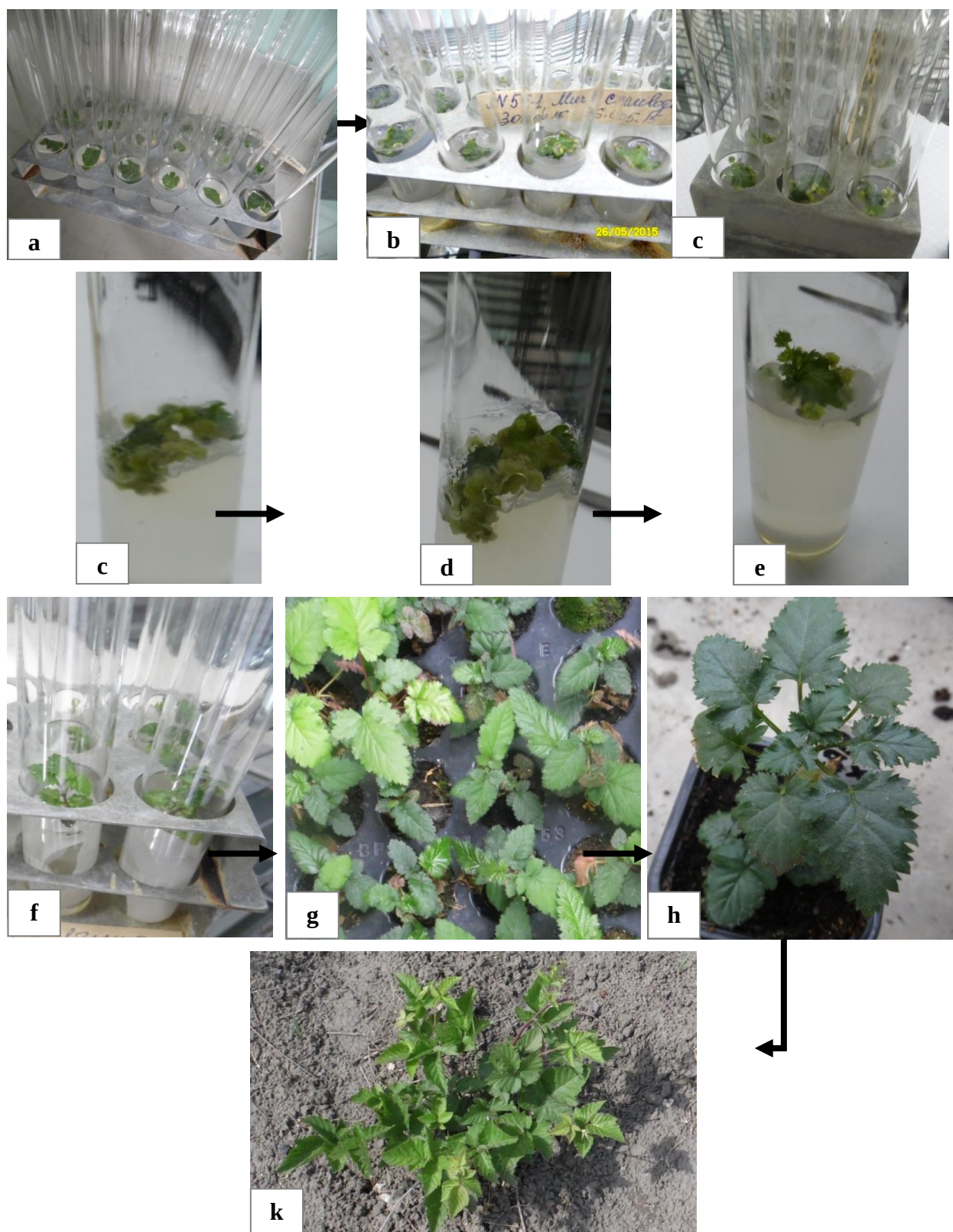


Fig. A 4.1. Schema de obținere a materialului avirotic de mur din calus foliar.

Notă: **a** – plasarea pe medii nutritive a fragmentelor de limb cultivate *in vitro*; **b, c** – gofrarea și creșterea în dimensiuni a limbului foliar, **d** – formarea masei calusare; **e** – creșterea masei calusare; **f** – dezvoltarea plantulelor din masă calusară; **g** – aclimatizare, transfer *ex vitro*; **h** – plantarea în ghiveci; **k** – plantarea în teren deschis.

Anexa 5.
Aclimatizarea vitroplantulelor de mur

Schema aclimatizării materialului biologic multiplicat biotehlogic



a



b



c

Amplasarea în palete cu substrat din turbă (I-a fază de aclimatizare *ex vitro*)



d



e

Anexa 5.
Aclimatizarea vitroplantulelor de mur



Fig. A 5.1. *Notă:* **a, b** – minibutășirea plantulelor de mur; **c** – plasarea în palete cu substrat de turbă (I-a fază de aclimatizare *ex vitro*); **d, e** – a-II-a fază de aclimatizare *ex vitro* a plantulelor; **f, g** – a III-a fază de aclimatizare *ex vitro* a plantulelor de mur; **h** – a III-a fază de aclimatizare *ex vitro* a plantelor de mur.

Anexa 6.
Material săditor obținut prin tehnici biotehnologice



Fig. A 6.1. Soiul ‘Thornless Evergreen’.



Fig. A 6.2. soiul ‘Arapaho’.



Fig. A 6.3. soiul ‘Black Satin’.



Fig. A 6.4. soiul ‘Triple Crown’



Fig. A 6.5. soiul ‘Black Satin’

Anexa 6.
Material săditor obținut prin tehnici biotehnologice



Fig. A 6.6. Soiul 'Loch Ness'.

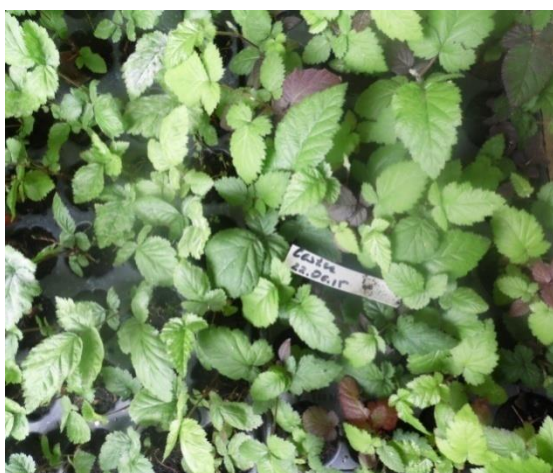


Fig. A 6.7. Soiul 'Chester'.



Fig. A 6.8. Soiul 'Thornfree'.



Fig. A 6.9. Soiul 'Reuben'.



Fig. A 6.10. Soiul 'Black Satin'.



Fig. A 6.11. 'Triple Crown'.



Fig. A 6.12. Soiuri de de mur aclimatizate.

Anexa 7.
Studiul anatomic

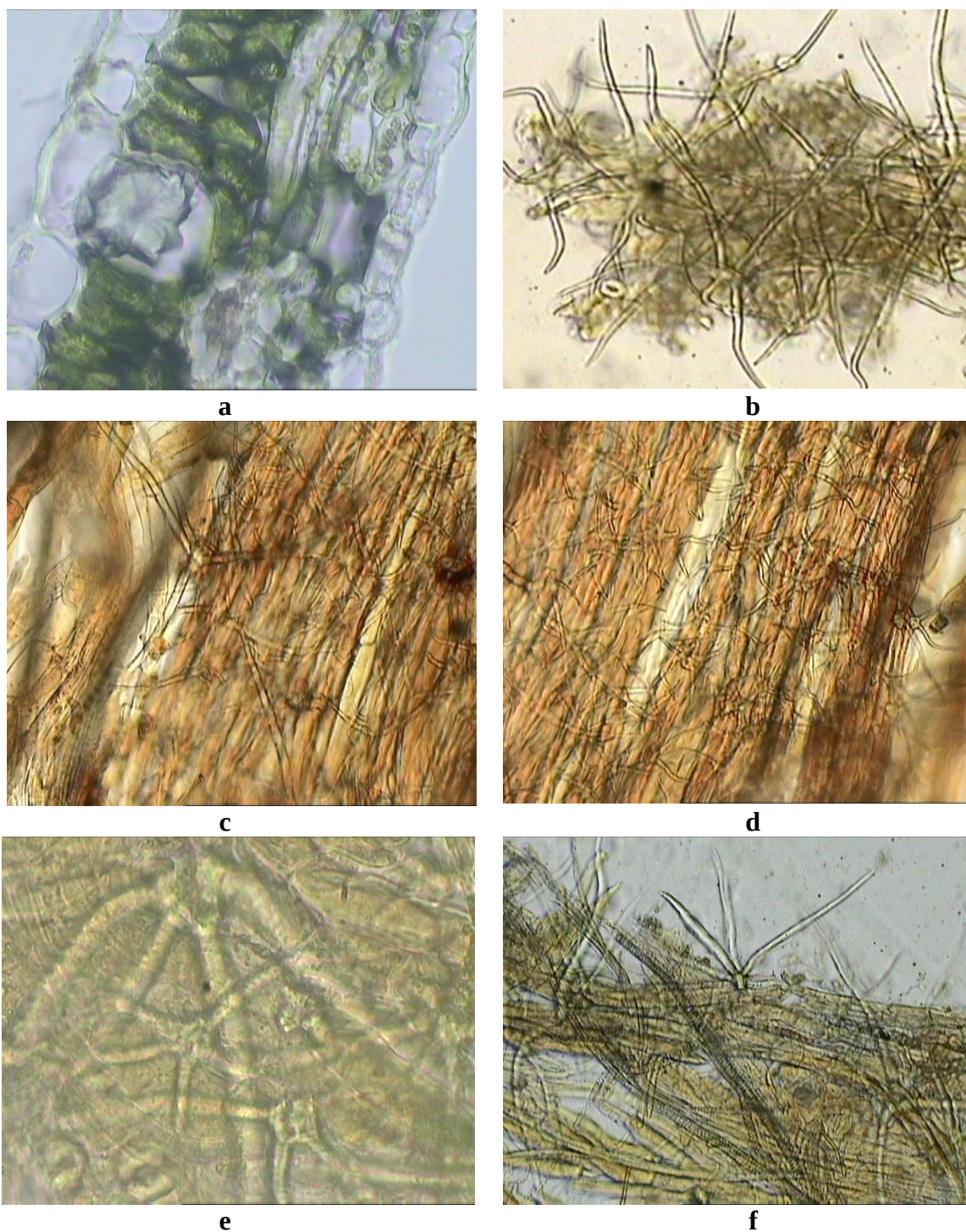


Fig. A. 7.1. Specia spontană.

Notă: **a** – Secțiune transversală prin limb; **b, c, d** – Peri tectori în mănunchi ; **e, f** – peri anomostozați

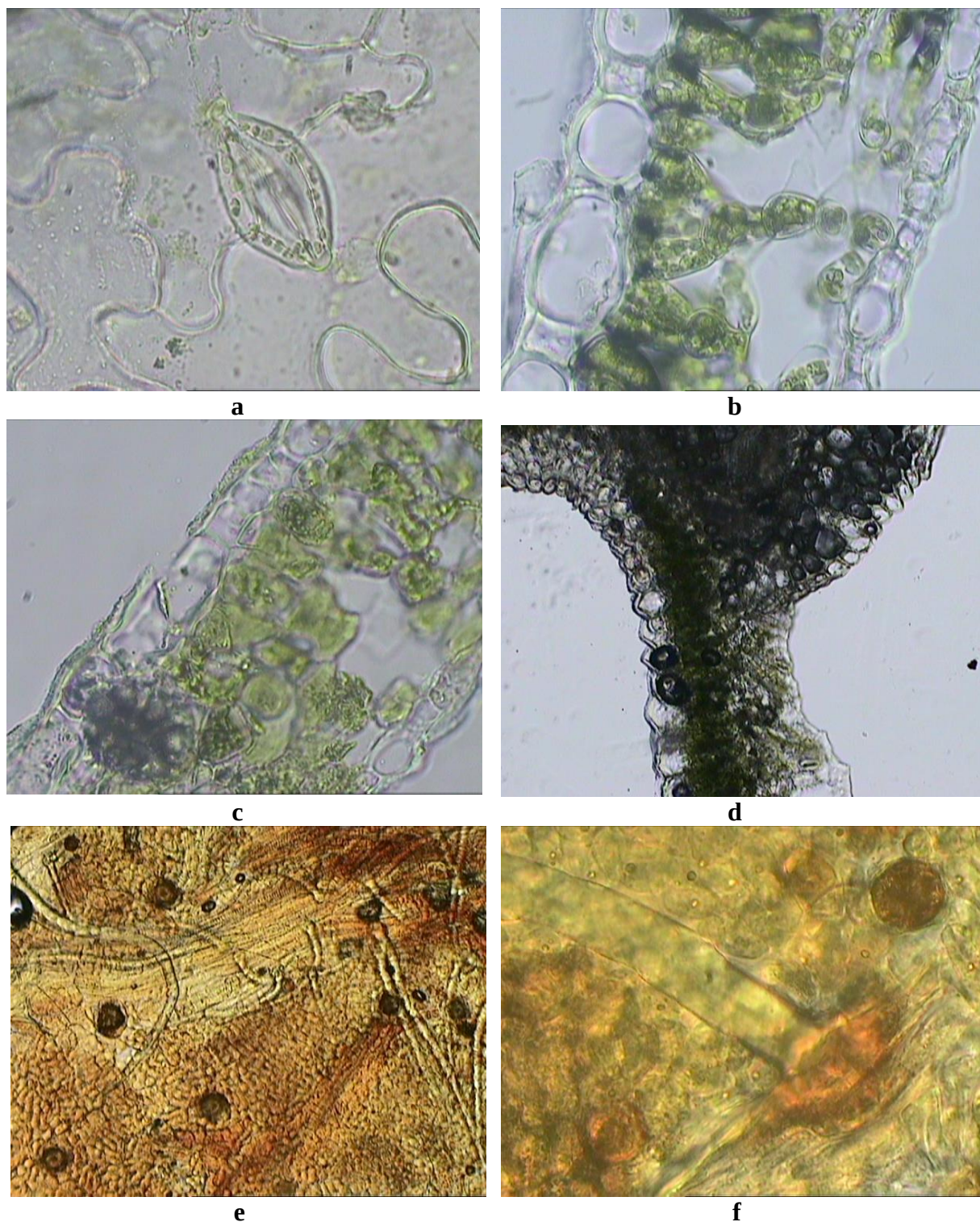


Fig. A 7.2. Soiul 'Arapaho'.

Notă: **a** – Stomată la soiul 'Arapaho'; **b, c** – Secțiune transversală prin limb, **d** – secțiune prin nervură; **e** – Peri unicelulari lungi, **f** – Păr unicelular, druze oxalice.

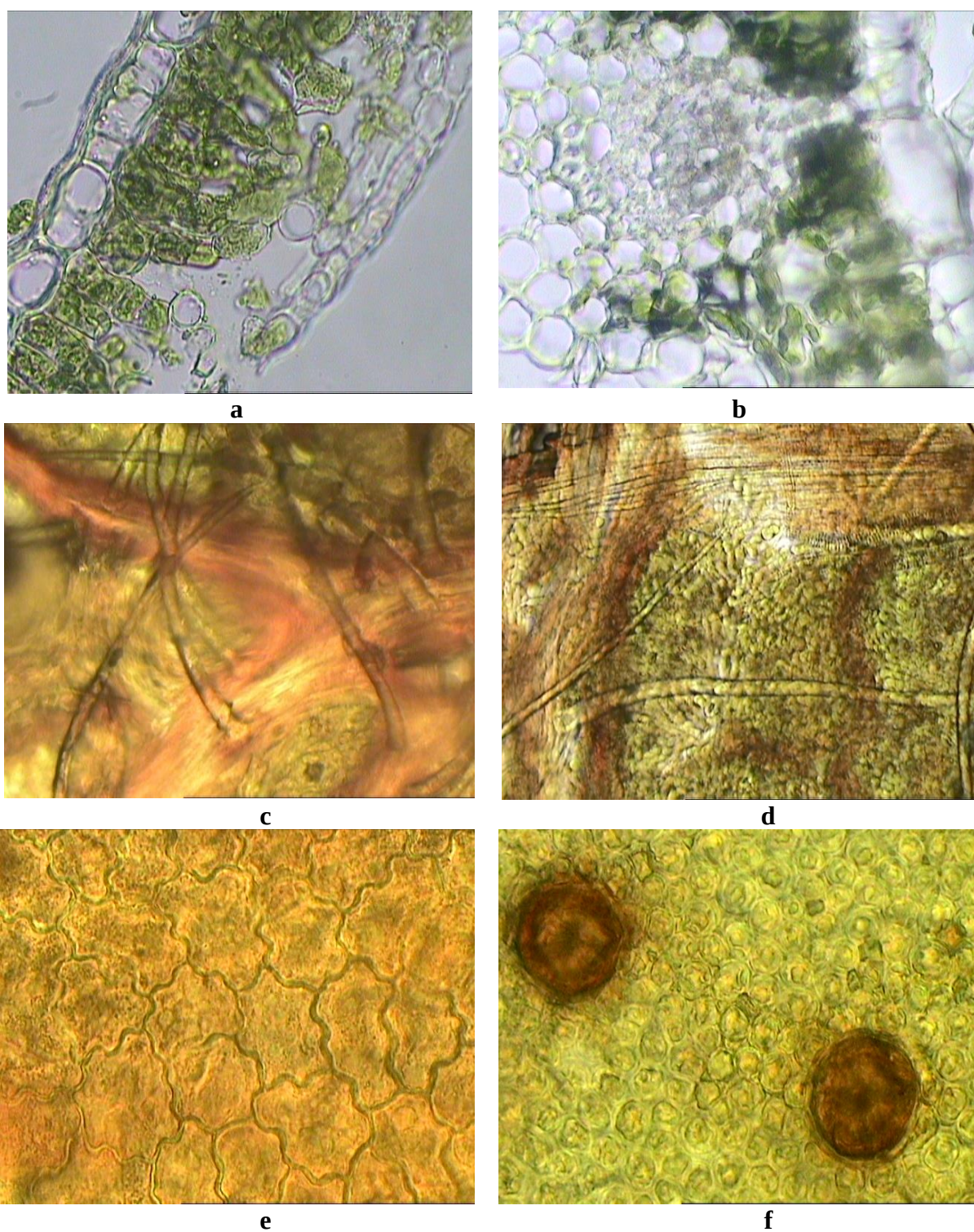


Fig. A 7.3. Soiul 'Chester'.

Notă: **a, b** – Secțiune transversală prin limbul soiului 'Chester' $\times 40$. **c, d** – peri tectori unicelulari, **e** – stomate; **f** – stomate, druze oxalice.



Fig. A 7.4. Soiului 'Thornfree'.

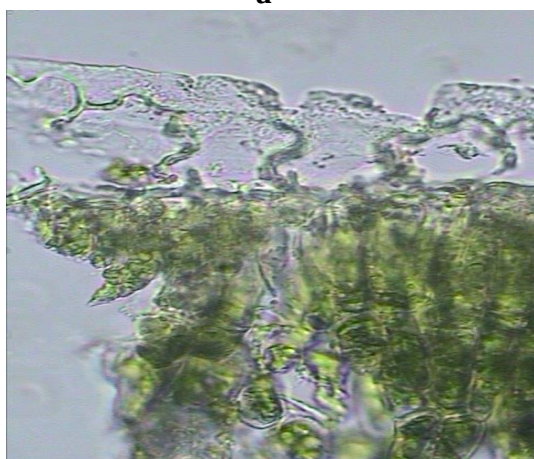
Notă: **a, b** – Secțiune transversală prin limb $\times 40$, **c, d** – Secțiune transversală prin limb $\times 10$,
e, f – peri unicelulari lungi



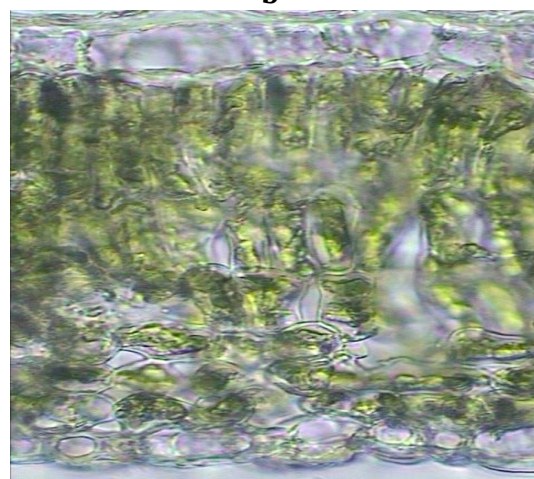
a



b



c



d



e



f

Fig. A 7.5. Soiul 'Thornless Evergreen'.

Notă: **a** – Secțiune prin nervură $\times 40$; **b** – Secțiune prin limb $\times 10$; **c, d** – Secțiune prin limb $\times 40$; **e** – Peri celulari anomostozați câte 4; **f** – Peri unicelulari lungi.

Anexa 8.
Biochimia principalelor grupe de compuși chimici



Fig. A 8.1. Obținerea extractelor hidro-alcoolice pe baia de aburi

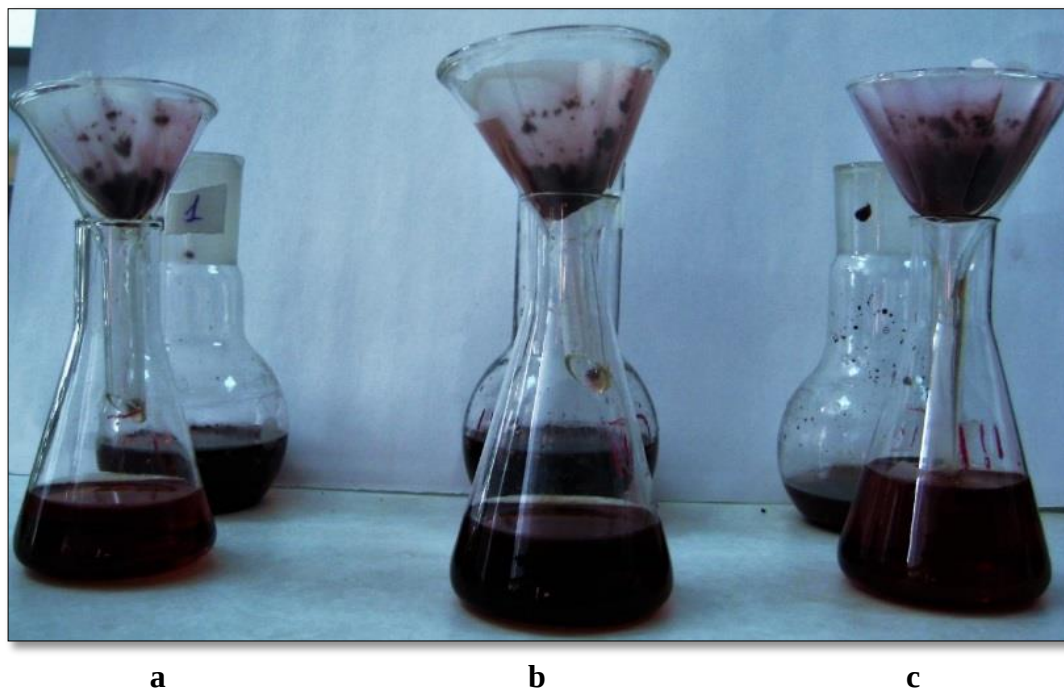


Fig. A 8.2. Extractele hidro-alcoolice din fructe pentru analiza calitativă a flavonozidelor la:
a – soiul ‘Thornless Evergreen’, **b** - soiul ‘Chester’, **c** - soiul ‘Thornfree’.

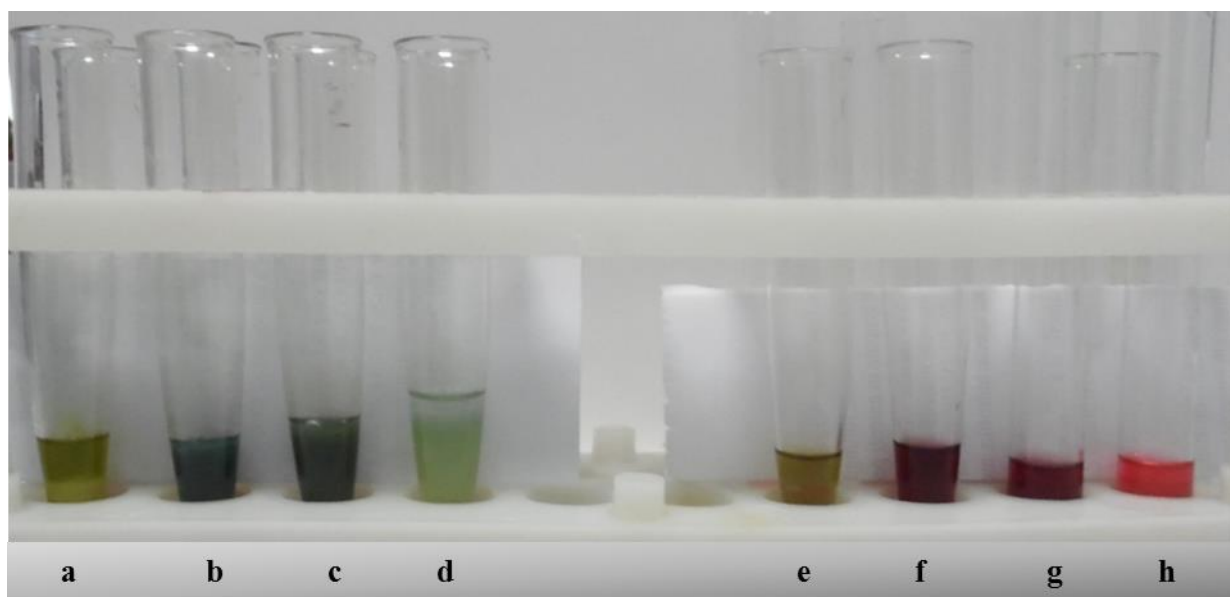


Figura A.8.3. Efectele analitice ale reacției cianidului în extractele analizate.

Notă: **a** – frunze soiul ThornFree, **b** – frunze R. candicans, **c** – frunze soiul Arapaho, **d** – frunze soiul Cester, **e** – frunze soiul Thornless-Evergreen, **f** – fructe soiul Thornless-Evergreen, **g** – fructe soiul Cester, **h** – fructe soiul Thornfree.

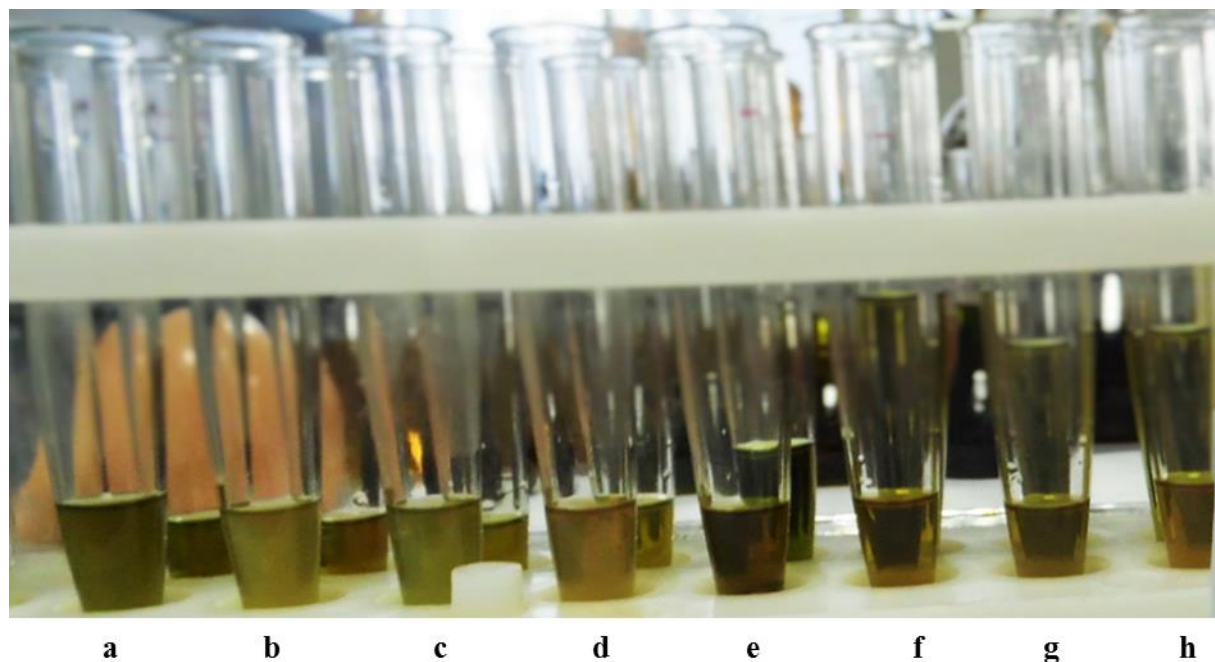


Figura A. 8.4. Efectele analitice ale reacției cu soluție de acetat de Pb bazic în extractele analizate.

Notă: **a** – frunze soiul ThornFree, **b** – frunze R. fruticosus (flora spontană), **c** – frunze soiul Arapaho, **d** – frunze soiul Cester, **e** – frunze soiul Thornless-Evergreen, **f** – fructe soiul Thornless-Evergreen, **g** – fructe soiul Cester, **h** – fructe soiul ThornFree.

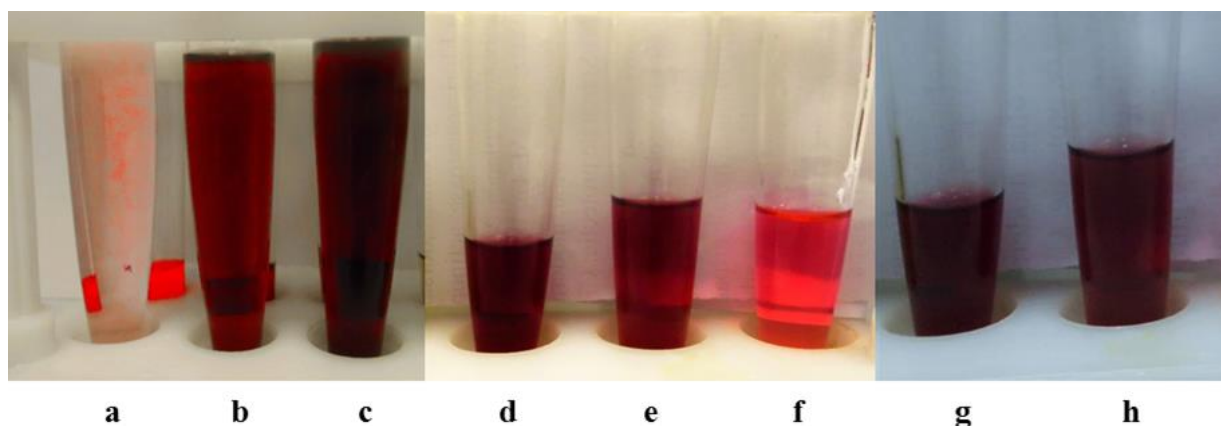
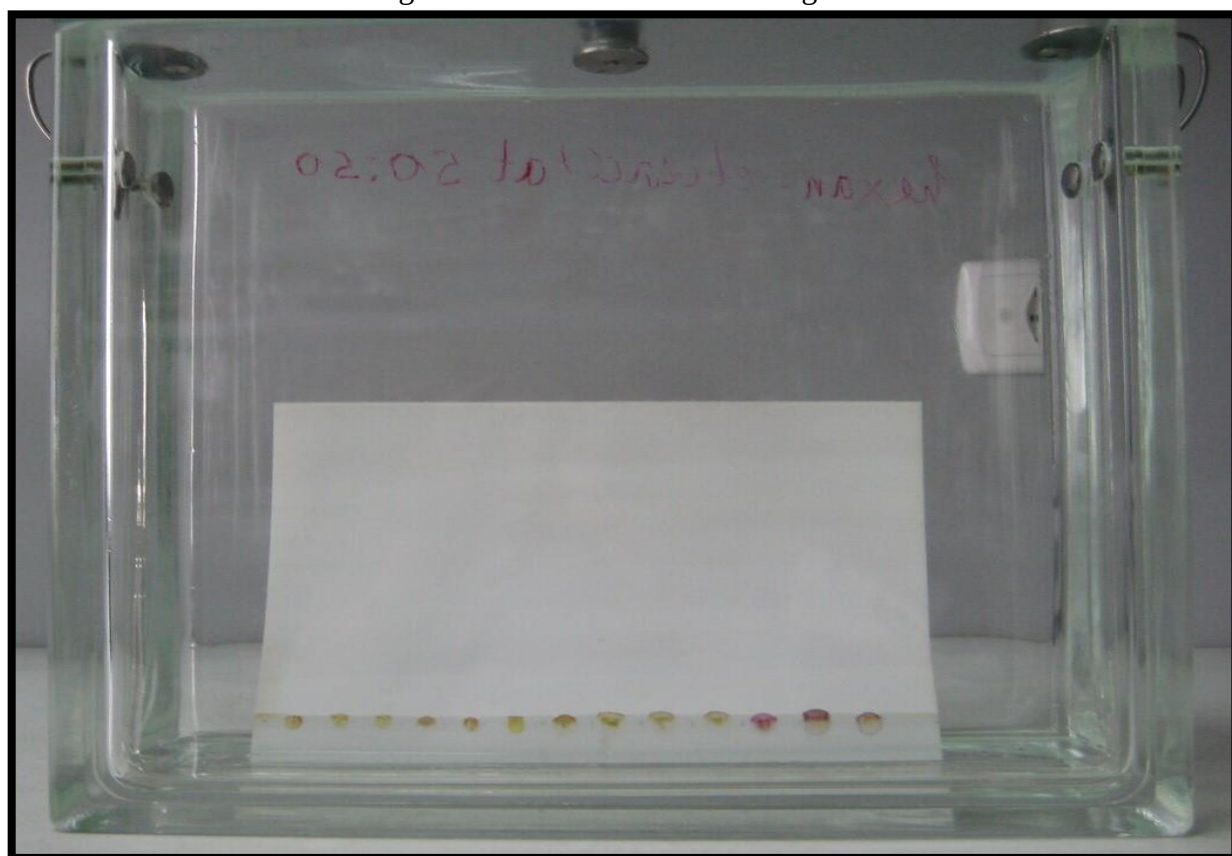


Figura A.8.5. Efectele analitice ale reacției cu soluție de vanilină 1% în acid clorhidric concentrat în extractele analizate.

Notă: **a** – frunze soiul ‘Thornfree’, **b** – frunze *R. candicans* (flora spontană), **c** – frunze soiul ‘Arapaho’, **d** – frunze soiul ‘Chester’, **e** – frunze soiul ‘Thornless-Evergreen’, **f** – fructe soiul ‘Thornless-Evergreen’, **g** – fructe soiul ‘Chester’, **h** – fructe soiul ‘Thornfree’.

Figura A.8.6. Camera de cromatografiere



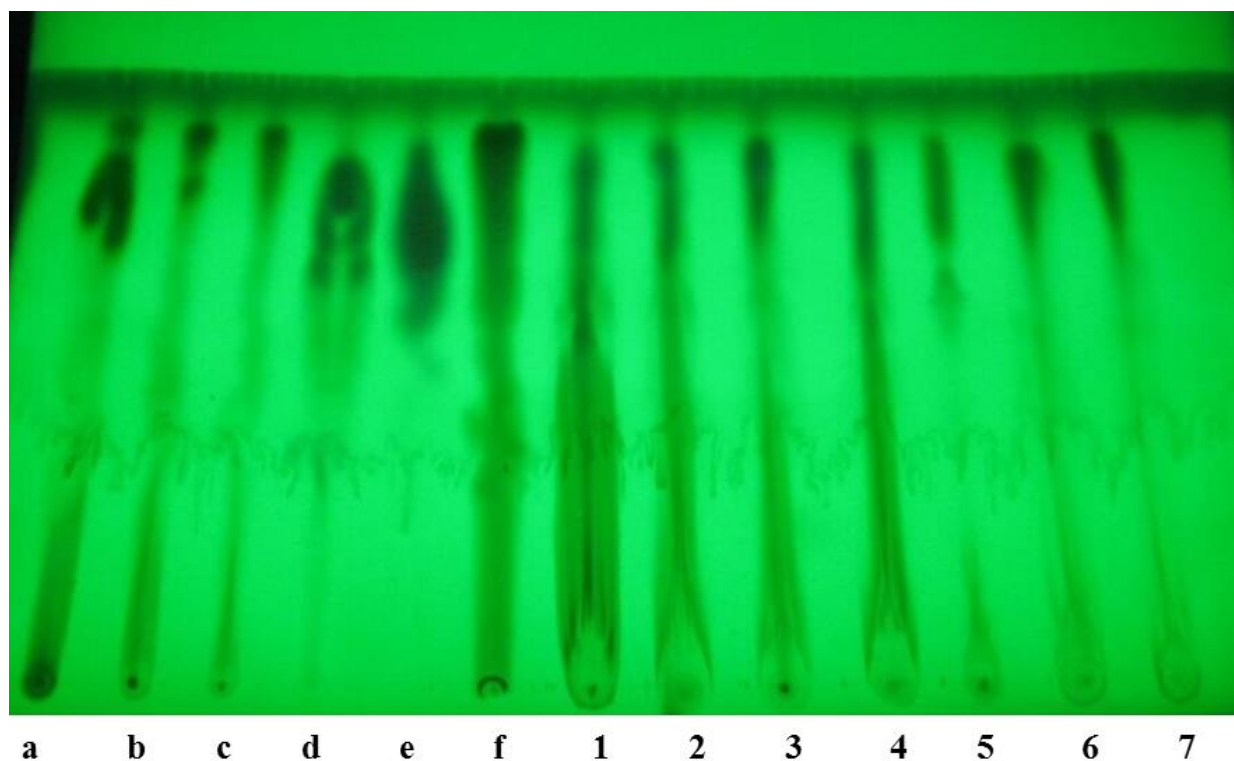


Figura A. 8.7. Placa cromatografică în strat subțire de determinare a flavonozidelor.

Notă: **a** – Rutozida; **b** – Quercetol; **c** – Quercetozida; **d** – Izoquercetozida; **e** – acid Cafeic; **f** – acid clorogenic; **1** – extract din frunze soiul ‘Arapaho’; **2** – extract din frunze soiul ‘Thornless Evergreen’; **3** – extract din frunze soiul ‘Chester’; **4** – extract din frunze soiul ‘Thornfree’; **5** – extract din fructe soiul ‘Thornfree’; **6** – extract din fructe soiul ‘Chester’; **7** – extract din fructe soiul ‘Thornless Evergreen’.



A



B

Fig. A.8.8. Prelucrarea extractelor: **A** – diluție cu alcool etilic 50%; **B** – adăugarea acetatului de sodiu și clorurii de aluminiu.



Figura A. 8.9. Determinarea absorbanței la spectrofotometru.



A



B

Figura A. 8.10. **A** – Soluțiile de rutozidă de diferite concentrații pentru construirea liniei etalon de rutozidă; **B** – măsurarea absorbanței la spectrofotometru.

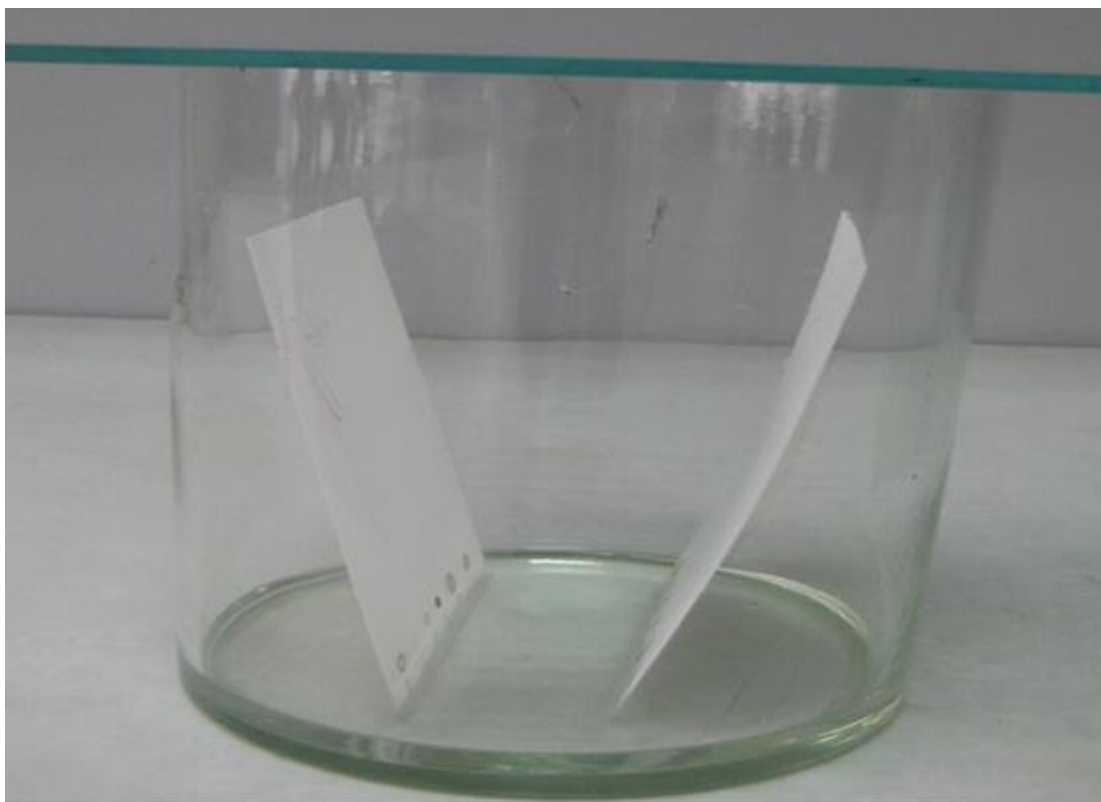


Figura A. 8.11. Camera de cromatografiere.

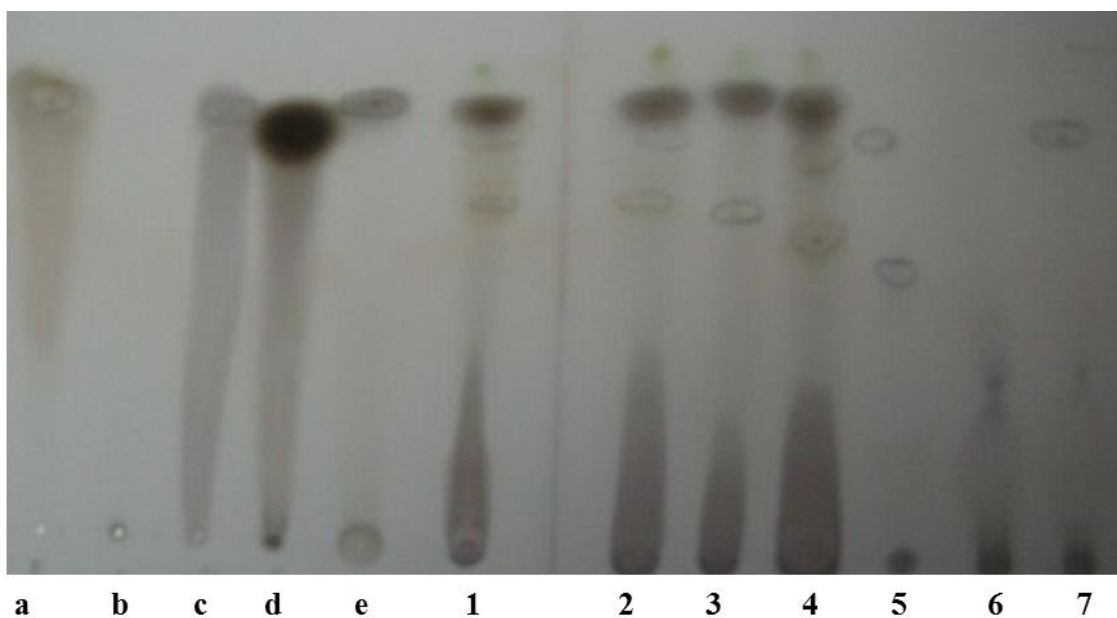


Fig. A. 8.12. Placa cromatografică în strat subțire de determinare a substanțelor tanante.

Notă: **a** – tanin; **b** – acid elagic; **c** – acid galatonic; **d** – pirogalol; **e** – acid gali; **1** – extract din frunze soiul soiul ‘Chester’; **2** – extract din frunze soiul ‘Thornless Evergreen’, **3** – extract din frunze soiul ‘Arapaho’, **4** – extract din frunze soiul ‘Thornfree’; **5** – extract din fructe soiul ‘Thornfree’; **6** – extract din fructe soiul ‘Chester’; **7** – extract din fructe soiul ‘Thornless Evergreen’.

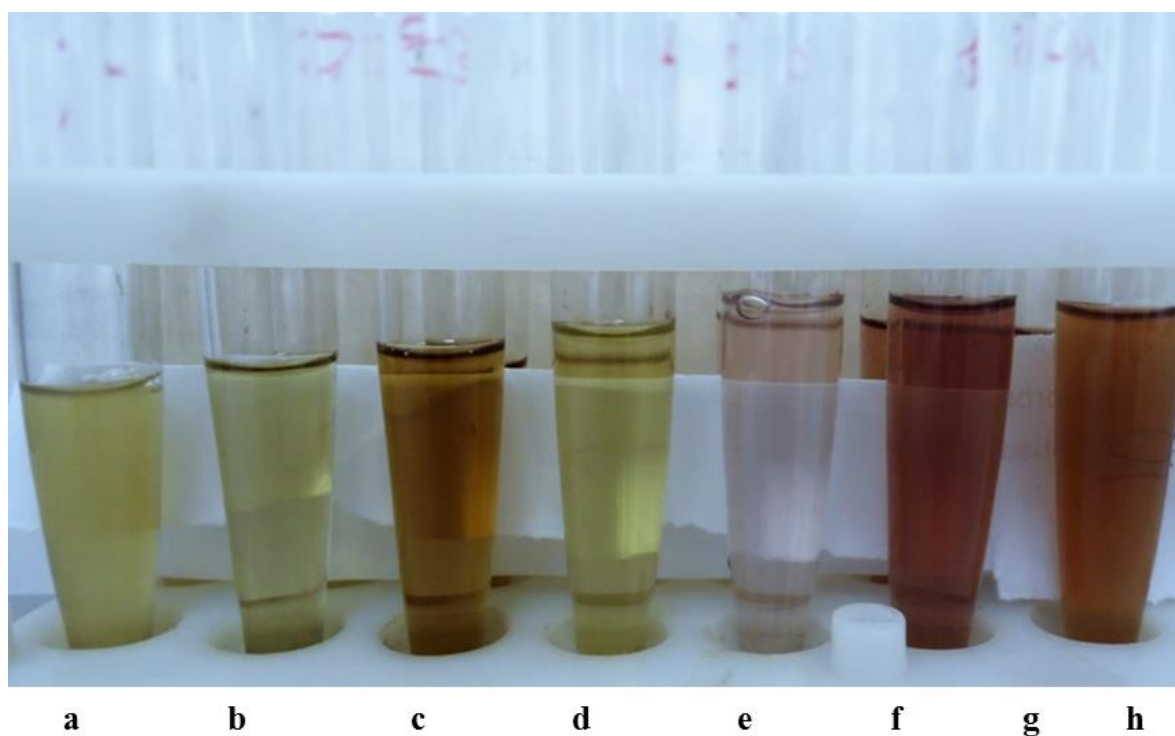


Figura A. 8.13. Efectul analitic al reacției cu gelatină 1 % în extractele de mur analizate.

Notă: **a** – frunze soiul ‘Thornfree’, **b** – frunze *R. candicans* (flora spontană), **c** – frunze soiul ‘Arapaho’, **d** – frunze soiul ‘Chester’, **e** – frunze soiul ‘Thornless Evergreen’, **f** – fructe soiul ‘Thornless Evergreen’, **g** – fructe soiul ‘Chester’, **h** – fructe soiul ‘Thornfree’.

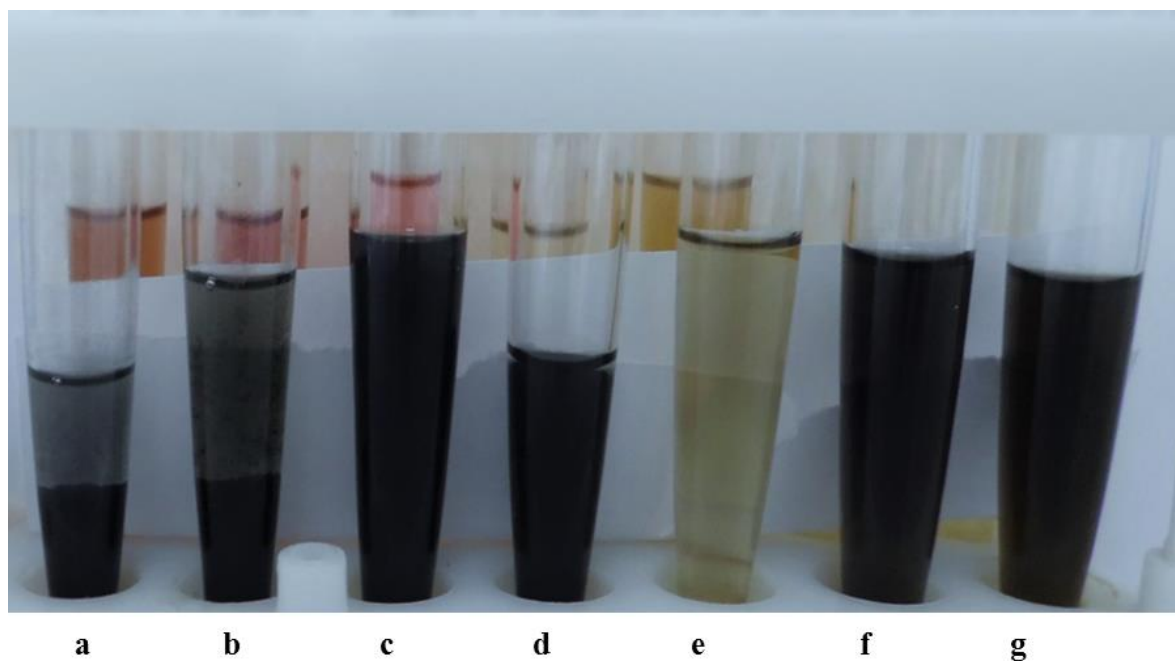


Fig. A 8.14. Efectul analitic al reacției cu alauni de fier și amoniu în extractele de mur analizate.

Notă: **a** – frunze soiul ‘Thornfree’, **b** – frunze *R. candicans*, **c** – frunze soiul ‘Arapaho’, **d** – frunze soiul ‘Chester’, **e** – frunze soiul ‘Thornless Evergreen’, **f** – fructe soiul ‘Thornless Evergreen’, **g** – fructe soiul ‘Chester’.

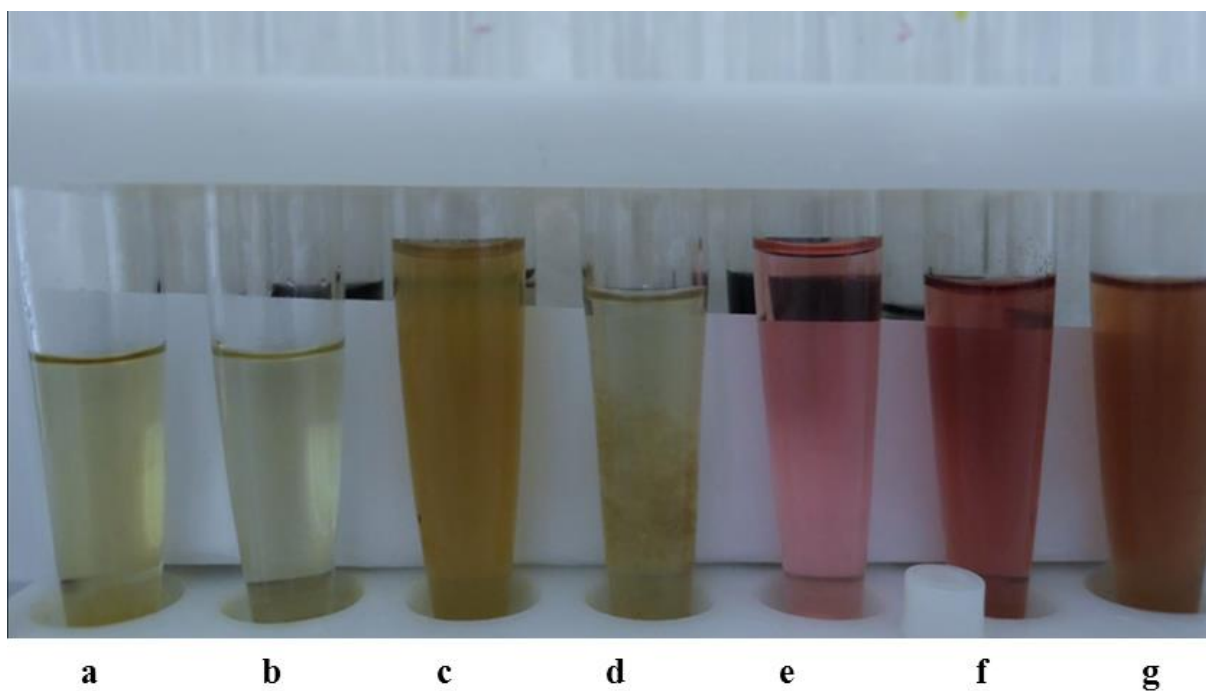


Fig. A 8.15. Efectul analitic al reacției cu acid acetic și acetat de Pb în extractele de mur analizate: Reacția cu efectul analitic al produselor vegetale analizate.

Notă: **a** – frunze soiul ‘Thornfree’, **b** – frunze sp. *R. candicans*, **c** – frunze soiul ‘Arapaho’, **d** – frunze soiul ‘Chester’, **e** – frunze soiul ‘Thornless Evergreen’, **f** – fructe soiul ‘Thornless Evergreen’, **g** – fructe soiul ‘Chester’.

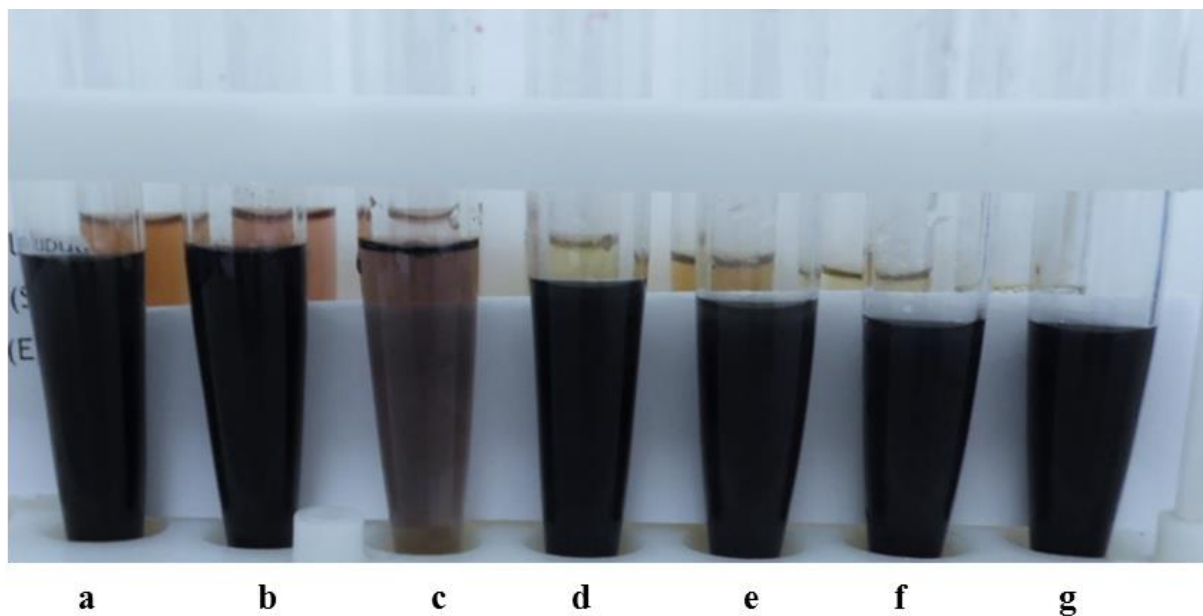


Fig. A. 8.16. Efectul analitic al reacției cu soluție de clorură ferică 1% în extractele de mur analizate.

Notă: **a** – frunze soiul ‘Thornfree’, **b** – frunze sp. *R. candicans*, **c** – frunze soiul ‘Arapaho’, **d** – frunze soiul ‘Chester’, **e** – frunze soiul ‘Thornless Evergreen’, **f** – fructe soiul ‘Thornless Evergreen’, **g** – fructe soiul ‘Chester’.

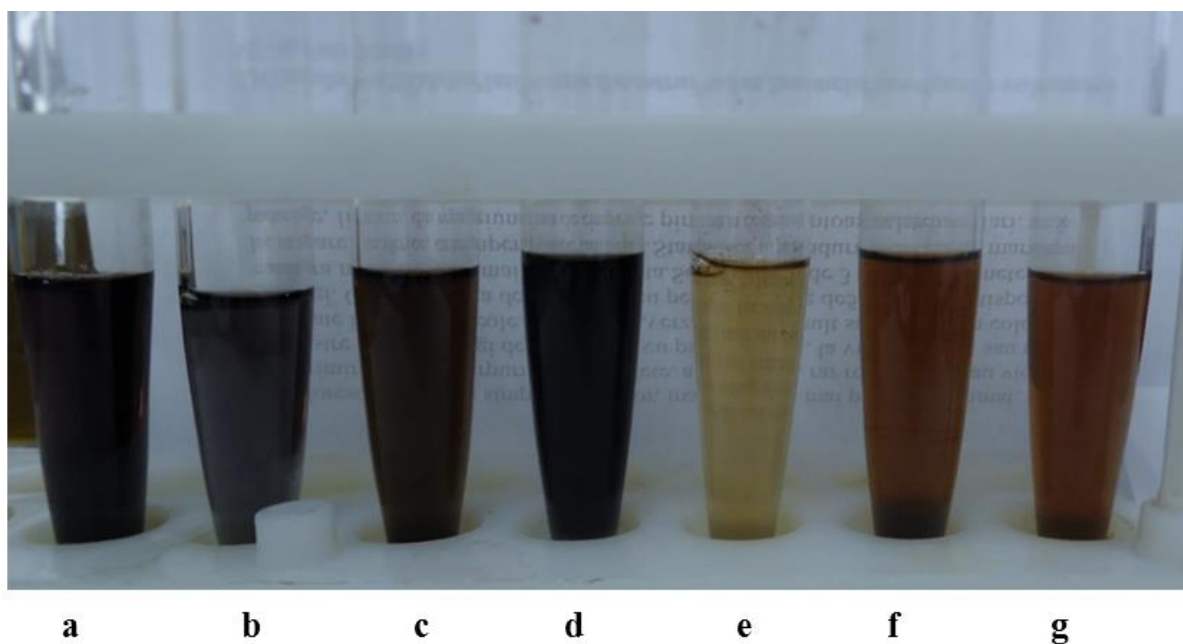
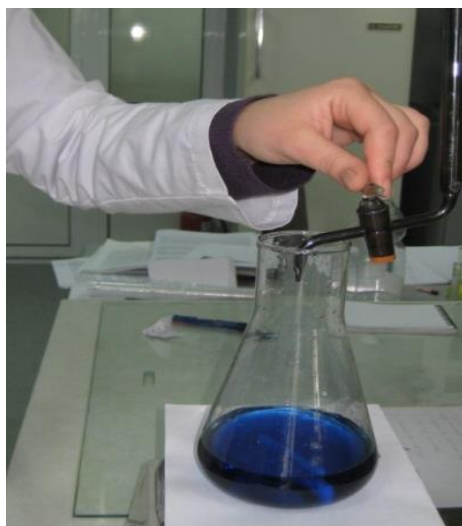


Fig. A. 8.17. Efectul analitic al reacției cu cristale de NaNO_3 și HCl de 0,1N în extractele de mur analizate.

Notă: **a** – frunze soiul ‘Thornfree’, **b** – frunze *R. candicans*, **c** – frunze soiul ‘Arapaho’, **d** – frunze soiul ‘Chester’, **e** – frunze soiul ‘Thornless-Evergreen’, **f** – fructe soiul ‘Thornless Evergreen’, **g** – fructe soiul ‘Chester’.



A



B

Fig. A. 8.18. Titrarea extractului analizat cu soluție de permanganat de potasiu.

Notă: **A** – extractul până la titrare; **B** – extractul după titrare.

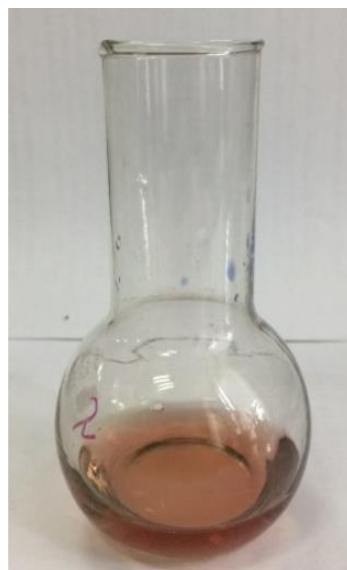


Fig. A. 8.19. Titrarea extractului cu 2,6-diclorfenolindofenolat de sodium până la culoarea roz persistent

Anexa 9.
Colecția de arbuști fructiferi



a



b



c



d

Fig. A 9.1. Soiul ‘Black Satin’.

Notă: **a** – aspect general, **b** – arbust cu fructe, **c** – limb foliar, **d** – fructe.



a



b



c

Fig. A 9.2. Soiul 'Thornless Evergreen'.

Notă: **a, b, c** – aspect general în perioada de maturare a fructelor.



a



b

Fig. A 9.3. Soiul 'Thornless Evergreen'.

Notă: a, b – antrenat pe gard.



a



b



c



d



e

Fig. A 9.4. Soiul 'Chester'.

Notă: **a, b, c** – aspect general în perioada de maturare a fructelor, **d, e** – inflorescență.



a



b



c



d

Fig. A 9.5. Soiul 'Arapaho.

Notă: **a** – aspect general floare, **b** – fructe, **c** – arbust, **d** – arbust antrenat pe spalier.

Anexa 9.
Colecția de arbuști fructiferi



a



b



c



d

Fig. A 9.6. Soiul 'Reuben'.

Notă: **a** – aspect general, **b** – arbust cu fructe , **c**, **d** – arbust în perioada de înflorire.

Anexa 9.
Colecția de arbuști fructiferi



Fig. A 9.7. Soiul 'Thornfree', aspect general.



a



b

Fig. A. 9.8. Soiul 'Loch Ness', **a, b** – aspectul general al arbustului.



a



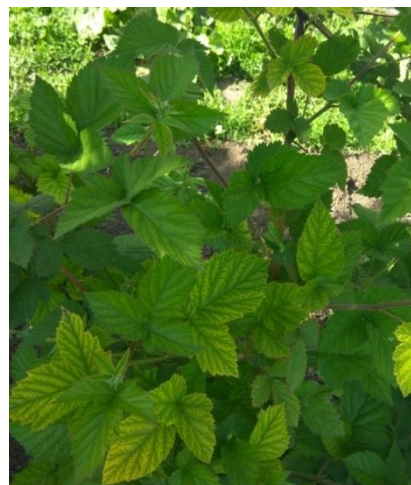
b

Fig. A. 9.9. Soiul 'Polar'.

Notă: **a** – inflorescență, **b** – aspect general al arbustului.



a

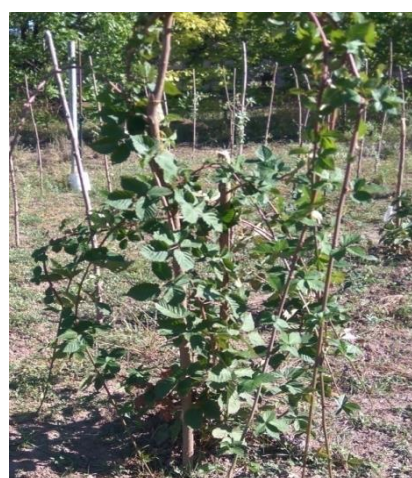


b

Fig. A. 9.10. Soiul 'Smoothstem', **a, b** – aspect general.



a



b

Fig. A 9.10. Soiul 'Triple Crown', aspect general al arbustului.

Anexa 9.
Colecția de arbuști fructiferi



a



b



c

Fig. A 9.11. Colecția de arbuști de mur, septembrie 2017, aspect general.

Tabelul 9.12
Perioada de înflorire la genotipurile de mur

Nr.	Soiul	Mai				Iunie							Iulie	Septembrie
		15	20	25	30	1	5	10	15	20	25	30		
1.	‘Arapaho’													
2.	“Polar”													
3.	‘Loch Ness’													
4.	‘Triple Crown’													
5.	Black Satin													
6.	‘Thornfree’													
7.	Smoothstem													
8.	‘Chester’													
9.	Thornless Evergreen													
10.	‘Reuben’													

Anexa 10.
Act de implimentare a rezultatelor



Contracte încheiate cu gospodării țărănești

5. Alte condiții

În baza prezentei contract vor fi soluționate în ordinea stabilită de legislația în vigoare, aducerea în instanțele judecătorești reclamantul este obligat să depună reclamație către cealaltă parte contractuală pentru a soluționa situația creată pe cale amiabilă.

5.2. Prezentul contract este perfectat în două exemplare originale, câte unul pentru fiecare parte.

5.3. Toate modificările și completările prezentei contract au putere juridică numai după confirmarea în scris a acestora în fiecare caz aparte.

5.4. Prezentul contract este încheiat la data de _____

6. ADRESELE ȘI RECHIZITELE AMBELOR PĂRȚI

Vânzătorul:
Grădina Botanică (Institut) a A.S.M.
MD 2002, mun. Chișinău, str. Pădurii 18
Tel. 022-55-04-43
IBAN: MD78TRPAAA142310801165AA
Banca: Ministerul Finanțelor-Trezoreria de Stat
Cod bancar: TREZMD2X
Cont trez: 33114001
Cod fiscal: 1005600072960

Cumpărătorul:
Botan Radu Vasile
r. Strășeni, str. 1, Calugăreanu 1973
Buletin de identitate: Sr. A33070112
Cod fiscal: 2000033061233
Buletin de identitate, valabil 30.12.2025
Eliberat: 03.02.2006

Director
Grădina Botanică (I) a A.S.M.
dr. Teleuș Alexandru

Botan Radu Vasile

SPECIFICAȚIA materialului sădător

Nr. d/o	Denumirea bunurilor/lucrărilor/serviciilor	Cantitatea/volumul (unit. de măsură)	Preț pe unitate	Suma totală (inclusiv TVA)	Articol alina	Caracteristicile bunurilor/lucrărilor/serviciilor
1	2	3	4	5	6	7
1	Material sădător (butași înrădăcinați de mur)	725.00 butași	15.00 lei	10 875.00 lei	3	
				Total - 10 875.00 lei		

Director
Grădina Botanică (I) a A.S.M.
dr. Teleuș Alexandru

Botan Radu Vasile

pg. 2 din 3

5. Alte condiții

În baza prezentei contract vor fi soluționate în ordinea stabilită de legislația în vigoare, aducerea în instanțele judecătorești reclamantul este obligat să depună reclamație către cealaltă parte contractuală pentru a soluționa situația creată pe cale amiabilă.

5.2. Prezentul contract este perfectat în două exemplare originale, câte unul pentru fiecare parte.

5.3. Toate modificările și completările prezentei contract au putere juridică numai după confirmarea în scris a acestora în fiecare caz aparte.

5.4. Prezentul contract este încheiat la data de _____

6. ADRESELE ȘI RECHIZITELE AMBELOR PĂRȚI

Vânzătorul:
Grădina Botanică (Institut) a A.S.M.
MD 2002, mun. Chișinău, str. Pădurii 18
Tel. 022-55-04-43
IBAN: MD78TRPAAA142310801165AA
Banca: Ministerul Finanțelor-Trezoreria de Stat
Cod bancar: TREZMD2X
Cont trez: 33114001
Cod fiscal: 1005600072960

Cumpărătorul:
G.T. "Coneval Dumitru"
r. Eșchii, a. Prodigi
IBAN: MD33AG000000022512736778
Codul bancar: AG00MD2X780
BC: "Moldova-Agroindbank" S.A. Fil. Eșchii
Tel.: 069368951
C.I.: 45082590
TVA: 5906666

Director
Grădina Botanică (I) a A.S.M.
dr. Teleuș Alexandru

Director
G.T. "Coneval Dumitru"
Coneval Dumitru

SPECIFICAȚIA materialului sădător

Nr. d/o	Denumirea bunurilor/lucrărilor/serviciilor	Cantitatea/volumul (unit. de măsură)	Preț pe unitate	Suma totală (inclusiv TVA)	Articol alina	Caracteristicile bunurilor/lucrărilor/serviciilor
1	2	3	4	5	6	7
1	Material de înmuiere (ramuri de nuc (ochiuri pe ram))	1 250.00 ramuri	7.00 lei	8 750.00 lei		
				Total - 8 750.00 lei		

Director
Grădina Botanică (I) a A.S.M.
dr. Teleuș Alexandru

Director
G.T. "Coneval Dumitru"
Coneval Dumitru

pg. 2 din 3

CONTRACT DE VÂNZARE-CUMPĂRARE Nr. 26

mun. Chișinău

Grădina Botanică (Institut) a A.S.M., numită în continuare "Vânzător", în persoana directorului Teleu Alexandru, care activează în baza Statutului, pe de o parte, și persoana fizică Botan Radu Vasile, numită în continuare "Cumpărător", de altă parte, au încheiat prezentul contract la următoarele condiții:

1. OBIECTUL CONTRACTULUI

1.1. Vânzătorul se obligă să transmită Cumpărătorului 320.00 butași de mur (butași înrădăcinați) prin cultura înveștăciată cu înălțimea (10-15 cm), la finele lunii mai 2017, conform specificației care este parte integrantă prezentei contract iar Cumpărătorul se obligă să plătească prețul convenit de 17,00 lei per butac.

2. PREȚUL ȘI MODUL ACHTĂRII

2.1. Suma contractului constituie 5437,50 lei (Cinci mii patru sute trezeci și șapte lei 50 bani).

2.2. Achitarea se face prin transfer sau numerar.

2.3. Pentru neachitarea la timp a materialului sădător (butași înrădăcinați de mur) oferit de Vânzător, conform specificației, Cumpărătorul este obligat să plătească Vânzătorului penalitate în sumă de 0,1 % din suma neachitată timp, pentru fiecare zi de întârziere.

2.4. Pentru neplata la dispoziție la timp a materialului sădător (butași de mur) conform specificației, Vânzătorul este obligat să plătească Cumpărătorului penalitate în sumă de 0,1 % din suma totală neprețată la timp, pentru fiecare zi de întârziere.

2.5. Plata se va efectua în tranșe, conform Actelor de primire-predare a materialului sădător livrat.

2.6. Cumpărătorul va achita în termen de 10 zile lucrătoare din momentul semnării prezentei contract un avans de 5 437,50 lei (cinci mii patru sute trezeci și șapte lei 50 bani) din suma contractului, garant pentru cantitatea livrată.

3. MODUL DE PREDARE-PRIMIRE A MĂRFURILOR

3.1. Materialul sădător (butași înrădăcinați de mur) se vor pune la dispoziția Cumpărătorului pînă la finele lunii mai 2017.

3.2. Predarea-primirea a materialului sădător (butași înrădăcinați de mur) se va efectua la locul aflării Vânzătorului, mun. Chișinău, str. Pădurii 18.

3.3. Vânzătorul este obligat să anexeze la planșele comercializate documentele necesare (adeverință pentru soi de plantă eliberată de Comisia de Stat pentru testarea soiurilor de plante, factura de expediție, actul de primire-predare).

3.4. La primirea materialului sădător Cumpărătorul trebuie să verifice starea lui.

3.5. Toate cheltuielile de transportare a materialului sădător le suportă Cumpărătorul.

3.6. Vânzătorul va pune la dispoziție materialul sădător (butași înrădăcinați de mur) în cantitatea specificată în p. 1.1 al prezentei contract. În cazul în care la data livrării materialului sădător va fi pus la dispoziția cumpărătorului într-o cantitate mai mică decât cea stipulată în contract, achitarea se va efectua de către cumpărător conform Actului de primire - predare, fără înaintarea elorva pretenții materiale referitoare la cantitatea livrată.

4. FORȚA MAJORĂ

4.1. Nici una dintre părțile contractante nu răspunde de neexecutarea la termen sau/și de executarea în mod necorespunzător - total sau parțial - a oricărei obligații care îi revine în baza prezentei contract, dacă neexecutarea sau executarea necorespunzătoare a obligației respective a fost cauzată de forța majoră, așa cum este definită de lege.

4.2. Partea care invocă forța majoră este obligată să notifice celelalte părți, în termen de 5 zile, producerea evenimentului și să ia toate măsurile posibile în vederea limitării consecințelor lui.

4.3. Dacă în termen de 5 zile, de la producere, evenimentul respectiv nu încetează, părțile au dreptul să-și notifice înțetarea deplin drept a prezentei contract fără ca vreuna dintre ele să pretindă daune-interese.

pg. 1 din 2

5. Alte condiții

În baza prezentei contract vor fi soluționate în ordinea stabilită de legislația în vigoare, aducerea în instanțele judecătorești reclamantul este obligat să depună reclamație către cealaltă parte contractuală pentru a soluționa situația creată pe cale amiabilă.

5.2. Prezentul contract este perfectat în două exemplare originale, câte unul pentru fiecare parte.

5.3. Toate modificările și completările prezentei contract au putere juridică numai după confirmarea în scris a acestora în fiecare caz aparte.

5.4. Prezentul contract este încheiat la data de 31.ianuarie 2018

6. ADRESELE ȘI RECHIZITELE AMBELOR PĂRȚI

Vânzătorul:
Grădina Botanică (Institut) a A.S.M.
MD 2002, mun. Chișinău, str. Pădurii 18
Tel. 022-55-04-43
IBAN: MD78TRPAAA142310801165AA
Banca: Ministerul Finanțelor-Trezoreria de Stat
Cod bancar: TREZMD2X
Cont trez: 33114001
Cod fiscal: 1005600072960

Cumpărătorul:
"Espberry" SRL
CF 1017660606641
IBAN: MD33AG000000022513205403
BC: "Moldova-Agroindbank" S.A. Fil.Nr 1 Chișinău
Adresa: MD 3542, a. Piatra, r-ul Orhei
tel: 067336918

Director
Grădina Botanică (I) a A.S.M.
dr. Teleuș Alexandru

Director
"Espberry" SRL
Bogdan Mihai

SPECIFICAȚIA materialului sădător

Nr. d/o	Denumirea bunurilor/lucrărilor/serviciilor	Cantitatea/volumul (unit. de măsură)	Preț pe unitate	Suma totală (inclusiv TVA)	Articol alina	Caracteristicile bunurilor/lucrărilor/serviciilor
1	2	3	4	5	6	7
1	Material sădător (butași înrădăcinați de mur), două soiuri (Arapaho și Triple Crown)	2 200.00 butași	15.00 lei	33 000.00 lei		
				Total - 33 000.00 lei		

Director
Grădina Botanică (I) a A.S.M.
dr. Teleuș Alexandru

Director
"Espberry" SRL
Bogdan Mihai

pg. 2 din 3

DECLARAȚIA PRIVIND ASUMAREA RĂSPUNDERII

Subsemnatul, 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.

Lozinschii Mariana

Semnătura

Data

CURRICULUM VITAE

			
Informații personale			
Nume / Prenume	LOZINSCHII MARIANA		
Adresă(e)	Cioricești 11, Chișinău, Republica Moldova		
Telefon(oane)	022531147	Mobil:	069860112
E-mail(uri)	diaconm@mail.ru		
Naționalitate(-tăți)	MDA		
Data nașterii	3 februarie 1985		
Sex	F		
Locul de muncă vizat /Domeniul ocupațional	Grădina Botanică Națională (Institut), Laboratorul Embriologie și Biotehnologie		
Experiența profesională			
Perioada	Iunie 2011 - prezent		
Activități și responsabilități principale	Laboratorul Embriologie și Biotehnologie, Grădina Botanică Națională (Institut) Cercetare		
Numele și adresa angajatorului	Grădina Botanică Națională (Institut), str. str. Padurii, 18, MD-2002, Chisinau, Republica Moldova, Tel: (+373 22) 55-91-36, Fax: (+37322) 55-04-43.		
Tipul activității sau sectorul de activitate	Cercetare, Biotehnologie, embriologie		
Educație și formare			
Perioada	Noiembrie 2013-noiembrie 2016		
Nivelul în clasificarea națională sau internațională	Studii doctorale, Studii postuniversitare		
Numele și tipul instituției de învățământ/urnizorului de formare	Universitatea Academiei de Științe a Moldovei, Grădina Botanică Națională (Institut)		

Disciplinele principale studiate/ competențe profesionale dobândite		Specialitatea 164.01. – Botanica Botanica, istoria și metodologia domeniului de cercetare, limba engleză, tehnologii informaționale					
Perioada		Septembrie 2011 - iunie 2013					
Calificarea/diploma obținută		Masterat în biologie Specialitatea Biologie					
Disciplinele principale studiate / competențe profesionale dobândite		Filogenie moleculară, bioinformatică, genetică umană, biostatistică, enzimologie, agricultură ecologică.					
Numele și tipul instituției de învățământ / furnizorului de formare		Universitatea Academiei de Științe, facultatea Științe ale Naturii					
Aptitudini și competențe personale							
Limba(i) maternă(e)		Română					
Limba(i) străină(e) cunoscută(e)		Engleză, rusă,					
Autoevaluare Nivel european (*)		Înțelegere		Vorbire		Scriere	
		Ascultare		Citire		Participare la conversații	
				Discurs oral		Expri mare scrisă	
		En		A2		A2	
		Ru		C2		C2	
				A1		A1	
				B2		B2	
				C1		C1	
		(*)Nivelul Cadrului European Comun de Referință Pentru Limbi Străine					
Competențe și aptitudini organizatorice		Abilități de comunicare interpersonală și pentru lucrul în echipă; înaltă capacitate și disponibilitate pentru efort intelectual susținut; voință și putere de a finaliza cu succes toate acțiunile inițiate, cooperare.					
Competențe și aptitudini de utilizare a calculatorului		O bună stăpânire a instrumentelor Microsoft Office (Excel, Word, PowerPoint, Picture Manager, Adobe InDesign etc., Mozilla Firefox, Google Chrome; ENCBI					
Alte competențe și aptitudini		Entuziasm, flexibilitate, atenție la detalii, responsabilitate, atingerea obiectivelor, bună-voință, disciplină.					
Informații suplimentare							
Activități de cercetare		1. Proiect instituțional: Cercetarea proceselor de dezvoltare și multiplicare microclonală in vitro, ex vitro și ex situ a unor culturi valoroase pentru economia națională (2010-2014). 2. Proiect bilateral: Fundamentarea principiilor și metodologiilor de proiectare a modelelor experimentale în vederea valorificării spațiilor verzi și terenurilor degradate, cu impact asupra reducerii poluării mediului în contextul integrării în platforma europeană de					

	management durabil al resurselor și reconstrucției ecologice, în conformitate cu normele și standardele UE (2010-2012). 3. Proiect instituțional „Fundamentarea științifică privind elaborarea tehnologiilor de înmulțirea <i>in vitro</i> a speciilor valoroase de interes economic pentru Republica Moldova”. (2015-2018)
Participarea la foruri științifice internaționale:	• Международной Научной Конф. 200 Летию НБС, "Роль Ботанических Садов В Сохранении Разнообразия Растений", Ялта, Украина, 2012. • Юбилейной Международной Научно-Практической Конференции, Посвященной 100-Летию Ботанического Сада, Батуми, 2013. • 12th International Symposium “Prospects for the 3th Millennium, Agriculture”, Cluj Napoca, România, 2013. • International Symposium "Conservation of plant diversity", 3rd edition, Chisinau, 2014. • Conferința Științifică internațională a doctoranzilor: "Tendințe Contemporane ale Dezvoltării Științei: Viziuni ale Tinerilor Cercetători", ediția a III-a, Chișinău 2014. • Conferința Științifică internațională a doctoranzilor: "Tendințe Contemporane ale Dezvoltării Științei: Viziuni ale Tinerilor Cercetători", ediția a IV-a, Chișinău 2015. • Conservation Of Plant Diversity, International Symposium, dedicated to the 65th anniversary of the Botanical Garden (Institute) of the Academy of Sciences of Moldova, Chișinău, 2015. • Conferința Științifică internațională a doctoranzilor: "Tendințe Contemporane Ale Dezvoltării Științei: Viziuni Ale Tinerilor Cercetători", ediția a V-a, Chișinău 2016. • Conferința Națională cu participare internațională ”Știința în Nordul Republicii: realizări, probleme, perspective” (ediția a II-a,) Bălți, 2016. • Simpozionul științific Conservarea diversității plantelor <i>in situ</i> și <i>ex situ</i>, Iași, 2016. • Biotehnologii avansate — Realizări și Perspective, al IV-lea Simpozion național cu participare internațională, Chișinău 2016. • International Symposium "Conservation of plant diversity" 5th edition, Chisinau, 2017.
Lucrări științifice publicate:	
Premii și mențiuni:	23 lucrări științifice publicate. Bursa Federației Mondiale a Savanților 2015 Bursa de nominală "Boris Matienko" 2016 Mențiune în cadrul concursului Premiul Municipal pentru tineret în domeniul științei, 2017

Grădina Botanică Națională (Institut) „Alexandru Ciubotaru”