

**MINISTERUL EDUCAȚIEI, CULTURII ȘI CERCETĂRII  
UNIVERSITATEA DE STAT „DIMITRIE CANTEMIR”  
GRĂDINA BOTANICĂ NAȚIONALĂ (INSTITUT)  
„ALEXANDRU CIUBOTARU”**

Cu titlu de manuscris  
C.Z.U.:582.951.4(478) (043.2)

**TABĂRA MARIA**

**DEZVOLTAREA ȘI MULTIPLICAREA MICROCLONALĂ A  
SPECIEI *LYCIUM BARBARUM* L. (GOJI)**

**164.01 – BOTANICA**

**Teză de doctor în științe biologice**

Autor:

\_\_\_\_\_

**TABĂRA Maria**

Conducător științific:

\_\_\_\_\_

**CIORCHINĂ Nina**  
doctor în științe biologice  
conferențiar cercetător

**CHIȘINĂU, 2020**

**© Tabăra Maria, 2020**

## CUPRINS

<b>ADNOTĂRI (engleză, română, rusă)</b> .....	<b>6</b>
<b>LISTA ABREVIERILOR</b> .....	<b>8</b>
<b>LISTA TABELELOR</b> .....	<b>9</b>
<b>LISTA FIGURILOR</b> .....	<b>10</b>
<b>INTRODUCERE</b> .....	<b>12</b>
<b>1. STAREA STUDIULUI ACTUAL PRIVIND DEZVOLTAREA ȘI MULTIPLICAREA IN VITRO A SPECIEI LYCIUM BARBARUM L.</b> .....	<b>17</b>
1.1. Încadrarea sistematică, distribuție și cultivare .....	17
1.2. Descrierea botanică a speciei <i>Lycium barbarum</i> L. ....	22
1.3. Proprietăți farmaceutice și nutritive ale speciei <i>Lycium barbarum</i> L. ....	24
1.4. Cerințele față de factorii pedoclimatici și caracteristicile ecologice ale speciei <i>Lycium barbarum</i> L. ....	28
1.5. Microînmulțirea plantelor horticole <i>in vitro</i> – baza teoretică și utilizarea practică .....	31
1.6. Particularitățile micropropagării și înmulțirea <i>in vitro</i> a speciei <i>Lycium barbarum</i> L. ....	34
1.6. Concluzii la capitolul 1 .....	36
<b>2. OBIECTUL DE STUDIU ȘI METODELE DE CERCETARE</b> .....	<b>37</b>
2.1. Caracteristica materialului de cercetare .....	37
2.2. Metode de cercetare .....	38
2.3. Concluzii la capitolul 2 .....	50
<b>3. MICROPROPAGAREA ȘI DEZVOLTAREA IN VITRO A SOIURILOR DE GOJI...</b> <b>52</b>	
3. 1. Inițierea și stabilizarea culturilor <i>in vitro</i> a arbustului de goji .....	52
3.2. Acțiunea citochininelor asupra ratei de multiplicare la soiurile de goji.....	59
3.3. Influența combinației și concentrației regulatorilor de creștere asupra ratei de multiplicare și procesul de creștere <i>in vitro</i> la vitroculturile de goji .....	63
3.4. Influența auxinelor în procesul de creștere și rizogeneză la soiurile de goji .....	67
3.5. Organogeneza <i>in vitro</i> la soiurile de goji (cultura de calus) .....	70
3.6. Aclimatizarea materialului săditor obținut prin cultura <i>in vitro</i> .....	76
3.8. Concluzii la capitolul 3 .....	79
<b>4. STUDIUL MORFO-ANATOMIC ȘI BIOCHIMIC COMPARATIV AL SPECIEI LYCIUM BARBARUM L.</b> .....	<b>81</b>
4.1. Aspecte fenologice ale arbuștilor din specia <i>Lycium barbarum</i> L.....	81
4.2. Biometria organelor vegetative ale arbustului de <i>Lycium barbarum</i> L. ....	85
4.3. Particularitățile anatomice adaptive ale frunzelor (seră și teren) la specia și soiurile de <i>Lycium barbarum</i> L. ....	93
4.4. Studiul biochimic al frunzelor și fructelor de <i>Lycium barbarum</i> L. din flora spontană și cultivată.....	99

4.4.1. Analiza calitativă a flavonoidelor și taninurilor.....	100
4.4.2. Determinarea cantitativă a compușilor biologic activi.....	103
4.4.3. Analiza indicatorilor biochimici în fructele speciei <i>Lycium barbarum</i> L. spontane și cultivate.....	106
4.5. Concluzii la capitolul 4 .....	109
<b>BIBLIOGRAFIE.....</b>	<b>112</b>
<b>ANEXE.....</b>	<b>133</b>
Anexa 1. Microînmulțirea soiurilor de goji.....	133
Anexa 2. Calusogeneza și organogeneza obținută din limb foliar și pețiol .....	135
Anexa 3. Micropropagarea și rizogeneza soiurilor de goji .....	137
Anexa 4. Aclimatizarea vitroplantulelor de goji .....	138
Anexa 5. Material săditor obținut prin metode <i>in vitro</i> .....	139
Anexa 6. Colecția de arbuști fruciferi de goji .....	140
Anexa 7. Structura anatomică a laminei frunzei la taxonii de <i>Lycium</i> .....	141
Anexa 8. Studiul fitochimic al taxonilor de <i>Lycium</i> (fructe, frunze) .....	144
Anexa 9. Cerere de brevet pentru soi de plată .....	147
Anexa 10. Acte de implementare a rezultatelor științifice.....	151
<b>DECLARAȚIA PRIVIND ASUMAREA RĂSPUNDERII.....</b>	<b>154</b>
<b>CV-UL AUTORULUI .....</b>	<b>155</b>



## ADNOTARE

Tabăra Maria, "Dezvoltarea și multiplicarea microclonală a speciei *Lycium barbarum* L. (goji)",  
teză de doctor în științe biologice, Chișinău, 2020.

**Structura tezei.** Teza include introducerea, patru capitole, concluzii generale și recomandări practice, bibliografia din 321 surse, volumul total de 156 pagini, 18 tabele, 39 figuri și 10 anexe. Rezultatele obținute sunt publicate în 21 lucrări științifice.

**Cuvinte-cheie:** *Lycium barbarum* L., cultura *in vitro*, microclonare/micropropagare, calusogeneză, rizogeneză, aclimatizare, soiuri de goji, fenologie, anatomie, biochimie.

**Domeniu de studiu:** 164.01 – Botanica

**Scopul tezei:** elaborarea tehnologiei de multiplicare *in vitro* a speciei *Lycium barbarum* L., evidențierea particularităților biomorfologice și estimarea biochimică comparativă ale speciei spontane și soiurilor cultivate în condițiile pedoclimatice ale Republicii Moldova.

**Obiectivele de cercetare:** \*identificarea, mobilizarea soiurilor de goji și evidențierea explantelor adecvate pentru inițierea culturilor *in vitro*; \*selectarea mediilor nutritive, adecvate pentru fiecare etapă de microclonare; \*analiza biologiei dezvoltării plantelor obținute, în condițiile *in vitro*, *ex vitro* și în teren experimental; \*studiul anatomic și evaluarea biochimică comparativă a conținutului de flavonoide, taninuri și acid ascorbic la plantele de goji cultivate și din flora spontană; \*elaborarea tehnologiei de micropropagare și descrierea protocolului de obținerea unui coeficient înalt de înmulțire la soiurile de goji și extinderea genofondului de arbuști fructiferi din cadrul GBNI (inițierea colecției).

**Noutatea și originalitatea științifică:** pentru prima dată în R. Moldova s-a realizat înmulțirea plantelor de goji prin tehnici și metode de micropropagare eficiente pentru producerea de material săditor robust, necontaminat și genetic uniform. S-au optimizat microtehnicele de cultivare *in vitro* ale organogenezei și calusogenezei la soiurile de goji de perspectivă. S-a efectuat studiul biologic complex la soiurile de goji, (morfologic, anatomic, biochimic) comparativ cu specia din flora spontană autohtonă în condițiile pedoclimatice ale R. Moldova.

**Problema științifică soluționată:** constă în elaborarea tehnologiei multiplicării *in vitro* a speciei *L. barbarum* L. și obținerea materialului săditor de calitate necontaminat, uniform genetic și omogen la soiurile de goji în condițiile climatice ale R. Moldova. Materialul săditor obținut prin cultura *in vitro* va contribui în înființarea plantațiilor moderne în R. Moldova și organizarea în GBNI a colecției de arbuști fructiferi.

**Semnificația teoretică:** rezultatele cercetărilor biotehnologice completează informația științifică privind studiile de microclonare și micropropagare a plantelor de goji, bazată pe principiul totipotenței celulare în culturile *in vitro* pentru regenerarea vitroplantulelor. De asemenea, acest studiu vizează particularitățile biologice de creștere și dezvoltare ale plantelor, în baza aspectelor fenologice, biometrice, anatomice și biochimice, în condițiile pedoclimatice pe teritoriul R. Moldova, date care ar contribui la instruirea corespunzătoare a agricultorilor cu privire la folosirea de soiuri rezistente la secetă și de calitate înaltă.

**Valoarea aplicativă:** elaborat și descris detaliat protocolul de obținere a materialului săditor sănătos și omogen la soiuri de goji pentru R. Moldova. Rezultatele cercetărilor sunt utilizate în Laboratorul de Embriologie și Biotehnologie a GBNI. Materialul săditor obținut a servit ca sursă pentru a iniția crearea colecției din 5 soiuri de goji din GBNI: 'Amber Sweet', 'Erma', 'Ning Xia N1', 'New Big' și 'Licurici' (soi ameliorat de către cercetătorii științifici ai Laboratorului de Embriologie și Biotehnologie a GBNI, în prezent se află la comisia de testare CSTSP). Plantele de goji multiplicare *in vitro* pot servi în calitate de material săditor pentru fondarea plantațiilor moderne de goji pe arii extinse pe teritoriul R. Moldova.

**Implementarea rezultatelor științifice:** în baza cercetărilor științifice efectuate au fost implementate metodele de multiplicare *in vitro* a speciei *L. barbarum* L. aplicate în contracte economice realizate în Laboratorul de Embriologie și Biotehnologie. Rezultatele studiilor obținute fenologice și biochimice vor îmbogăți spectrul sectorului de pomușoare existente în R. Moldova. Totodată, acestea reprezintă material științifico-didactic pentru cursurile: *Botanică aplicată*, *Botanică farmaceutică*, *Chimie biologică* și în instituțiile de învățământ cu profil biologic și agricol, precum și realizarea de contracte cu beneficiari particulari, gospodării țărănești și amatori interesați de soiurile de goji.

## ANNOTATION

Tabăra Maria, “Development and microclonal multiplication in *Lycium barbarum* L. (wolfberry)”,  
PhD thesis in biological sciences, Chisinau, 2020.

**Structure of the thesis.** The thesis includes introduction, four chapters, general conclusions and practical recommendations, bibliography from 321 sources, total volume of 156 pages, 18 tables, 39 figures and 10 annexes. The obtained results are published in 21 scientific papers.

**Keywords:** *Lycium barbarum* L., *in vitro* culture, microclonation/micropropagation, callusogenesis, rhizogenesis, acclimatization, goji varieties, phenology, anatomy, biochemistry.

**Field of investigation:** 164.01 – Botany

**The purpose of the research** is to develop *in vitro* multiplication technology of *Lycium barbarum* L. and comparative morphological and biochemical evaluation of biochemical compounds of the spontaneous species and varieties grown under the pedoclimatic conditions of the Republic of Moldova.

**Objectives of the thesis:** \*identification of goji varieties and highlighting the appropriate explants for initiating *in vitro* cultures \*selection of nutrients suitable for each stage of microcloning \*analysis of plant development biology obtained, *in vitro*, *ex vitro* and experimental conditions; \*anatomical study and comparative biochemical evaluation of the content of flavonoides, tannins, and ascorbic acid in cultivated goji plants and spontaneous flora; \*elaboration of micropropagation technologies and description of the protocol for obtaining a high multiplication coefficient for goji varieties and extension of the genus of fruit shrubs within GBNI (initiation of the collection).

**Scientific novelty and originality.** For the first time in the Republic of Moldova, goji plants have been propagated through efficient micropropagation techniques and methods for the production of robust, uncontaminated and uniform propagating material. This complex study is the first of its kind in our country, its importance being given by the need for biological characterization of shrubs in the experimental group, making observations and biometric measurements on: plant height, length and number of shoots, number of leaves on the rosette and on the plant, and the comparative highlighting of the morpho-anatomical and biochemical peculiarities with adaptive characters of the plant organs in the climatic conditions of the country of the cultivated plants and the native spontaneous flora.

**The most important solved scientific problem** in the thesis consist in the *elaboration* of the *in vitro* multiplication technology of the species *Lycium barbarum* L. and the obtaining of the uncontaminated, uniform and homogeneous quality propagating material for goji varieties in the climatic conditions of the Republic of Moldova. The planting material obtained through *in vitro* culture will *contribute* to the establishment of modern plantations in the Republic of Moldova and the organization in GBNI of the collection of fruit bushes.

**The theoretical significance.** The obtained results allow us to mention that, by using *in vitro* multiplication, it confirms the increase of the quantity of planting material and the improvement of its quality. Thus, this study highlighted the elucidation of biological features of plant growth and development based on phenological, biometric, anatomical and biochemical aspects in climatic conditions in the Republic of Moldova, data that would contribute to proper training of farmers on the use of drought-resistant and high-quality varieties.

**The applicative value of the work** The scheme of the technology for obtaining healthy and homogeneous planting material for goji varieties for the Republic of Moldova was elaborated. The research results are used in the Embryology and Biotechnology Laboratory of GBNI. The planting material obtained served as a source to initiate the creation of the collection of 5 goji varieties from GBNI: 'Amber Sweet', 'Erma', 'Ning Xia NI', 'New Big' and 'Licurici' (variety improved by scientific researchers of the Biotechnology and Embryology Laboratory of GBNI, is currently on the CSTSP test commission). *In vitro* multiplied goji plants can serve as planting material for the establishment of modern goji plantations in large areas of the Republic of Moldova.

**Implementation of scientific results.** Based on the scientific research carried out, the *in vitro* multiplication methods of the *Lycium barbarum* species were implemented applied in economic contracts made in the Laboratory of Embryology and Biotechnology. The results obtained from phenological and biochemical investigations will enrich the spectrum of the existing berry sector in the Republic of Moldova. At the same time, they represent scientific didactic material for the specialties: Botany, Ecology, Pharmacy and in educational institutions with botanical and agricultural profile, as well as contracts with private beneficiaries, farmers and amateurs interested in goji varieties.

## АННОТАЦИЯ

Табэра Мария, «Развитие и микрклональное размножение вида *Lycium barbarum* L. (годжи)»,  
Докторская диссертация по биологическим наукам, Кишинев, 2020.

Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук, Кишинев, 2020.

**Структура диссертации:** Диссертация включает введение, четыре главы, общие выводы и практические рекомендации, библиографию из 321 источников, общий объем страниц 156, таблиц 18, рисунков 39 и 10 приложений. Полученные результаты опубликованы в 21 научных работах.

**Ключевые слова:** *Lycium barbarum* L., *in vitro*, микрклональное/микрочеренкование, каллусогенез, ризогенез, акклиматизация, сорта годжи, фенология, анатомия, биохимия.

**Область исследования:** 164.01 – Ботаника

**Целью:** данной работы является разработка технологии размножения *in vitro* *Lycium barbarum* L. и сравнительной морфологической и биохимической оценки биохимических соединений спонтанных видов и сортов, выращенных в почвенно-климатических условиях Республики Молдова.

**Задачи:** \*выявление и мобилизация сортов годжи и выделение соответствующих эксплантов для инициации культур *in vitro*; \*выбор питательных сред, подходящих для каждого этапа микрклонального размножения; \*анализ биологии развития растений, полученных *in vitro*, *ex vitro* и в условиях открытого грунта; \*анатомическое исследование и сравнительная биохимическая оценка содержания флавонозидов, дубильных веществ и аскорбиновой кислоты у культивируемых сортов годжи и вида из спонтанной флоры; \*разработка технологий микроразмножения и описание протокола для получения высокого коэффициента размножения, начало сбора территории ГБНИ.

**Научная новизна и оригинальность:** Впервые в Республике Молдова была разработана технология размножения растения годжи с помощью эффективных методов микрклонального размножения с целью получения здорового, генетически однородного посадочного материала плодово-ягодных культур. Была оптимизирована микротехника культивирования *in vitro* процессов каллусогенеза и органогенеза у перспективных сортов годжи. Были проведены комплексные исследования сортов годжи изучены сравнительная: (морфология, анатомия, биохимия) сортов и спонтанного вида *Lycium barbarum* L. в условиях Р. Молдова.

**Решенная научная проблема:** заключается в разработке технологии размножения *in vitro* вида *Lycium barbarum* L. и получения, однородного качественного посадочного материала методом витрокультуры для сортов годжи, соответствующего почвенно-климатическим условиям Р. Молдова. Данная технология и оздоровленный посадочный материал могут быть использованы для создания современных промышленных плантаций в Р. Молдова и организации в условиях ГБНИ коллекции плодовых кустарников.

**Теоретическое значение:** Полученные результаты позволяют утверждать, что метод витрокультуры значительно увеличивает количество посадочного материала высокого качества. Проведенные биотехнологические исследования еще раз подтверждают и преумножают научную информацию, основанную на принципах клеточной тотипотентности в культуре *in vitro*. Также выявлены биологические особенности роста и развития растений на основе анализа фенологических, биометрических, анатомических и биохимических исследований для почвенно-климатических условий Р. Молдова, которые будут способствовать надлежащему обучению фермеров в виду использования новых засухоустойчивых высокопродуктивных сортов.

**Прикладная ценность работы:** разработана и описана детальная схема технологии получения здорового генетически однородного посадочного материала для новых сортов годжи в условиях Р. Молдова. Результаты исследований используются в лаборатории Эмбриологии и Биотехнологии ГБНИ. Полученный посадочный материал послужил источником для инициирования коллекции из 5 сортов годжи на территории ГБНИ: «Amber Sweet», «Erma», «New Big», «Ning Xia N1» и «Licurici» (сорт полученный научными сотрудниками ГБНИ который в настоящее время проходит тестирование в ГКТСР). Размноженные растения годжи *in vitro* могут служить посадочным материалом для создания современных плантаций годжи на больших площадях в Р. Молдова.

**Внедрение научных достижений.** На основании проведенных научных исследований в лаборатории Эмбриологии и Биотехнологии были разработаны и внедрены методы размножения *in vitro* таксонов рода *Lycium*. Более того результаты фенологических и биохимических исследований значительно обогатят существующие знания плодово-ягодной отрасли с/х в Р. Молдова. Результаты исследования могут быть включены в учебный процесс по специальностям: ботаника, экология, фармацевтика, а также контракты с частными бенефициарами, фермерами и любителями, интересующимися сортами годжи.

## LISTA ABREVIERILOR

<b>ANOVA</b>	<i>Analysis Of Variance</i> (Analiza varianței sau analiza dispersională)
<b>2,4-D</b>	acid 2,4 – diclorfenoxiacetic
<b>AG<sub>3</sub></b>	acid giberilinic
<b>AIA</b>	acid 3-indolilacetic
<b>AIB</b>	acid 3-indolilbutiric
<b>ANA</b>	acid -naftilacetic
<b>ARN</b>	acid ribonucleic
<b>BAP (BA)</b>	benziladenină (sau 6-benzilaminopurină)
<b>BNS</b>	Biroul Național de Statistică
<b>CSTSP</b>	Comisia de Stat pentru Testarea Soiurilor de Plante
<b>GBNI</b>	Grădina Botanică Națională (Institut) „Alexandru Ciubotaru”
<b><i>L. barbum L.</i>, <b>LB</b></b>	<i>Lycium barbarum L.</i>
<b>LC</b>	<i>Lycium chinesis L.</i>
<b>KIN (KN)</b>	chinetină
<b>MS</b>	Murashige-Skoog
<b>B5</b>	Gamborg
<b>OMS</b>	Organizația Mondială a Sănătății
<b>ORAC</b>	capacitate de absorbție a radicalilor de oxigen
<b>R. Moldova</b>	Republica Moldova
<b>PV</b>	produs vegetal
<b>SUA</b>	Statele Unite ale Americii
<b>Zea</b>	zeatină

## LISTA TABELELOR

	pag.
<b>Tabelul 1.1.</b> Sinteza proprietăților farmacologice din fructele de goji	27
<b>Tabelul 2.1.</b> Medii suplinite cu regulatori de creștere utilizate pentru inducerea morfogenezei	41
<b>Tabelul 2.2.</b> Componenta chimică a mediului <i>Murashige Skoog</i> (MS) și <i>Gamborg</i> (B5)	42
<b>Tabelul 3.1.</b> Agenți sterilizanți utilizați la aseptizarea materialului biologic	54
<b>Tabelul 3.2.</b> Compoziția mediului Murashige-Skoog și Gamborg modificat	55
<b>Tabelul 3.3.</b> Influența compoziției mediilor de cultură asupra inițierii culturii <i>in vitro</i> la soiurile de goji, după 30 zile	57
<b>Tabelul 3.4.</b> Concentrațiile și combinațiile regulatorilor de creștere utilizați, pentru inducerea microclonării, stimulării alungirii și rizogenezei la soiurile de goji	59
<b>Tabelul 3.5.</b> Efectul citochininelor asupra multiplicării soiurilor de goji	60
<b>Tabelul 3.6.</b> Influența combinației și concentrației hormonilor de creștere, asupra ratei de multiplicare <i>in vitro</i> , după 35 zile	64
<b>Tabelul 3.7.</b> Influența auxinelor în procesul de creștere și rizogeneză la soiurile goji, după 21 de zile	68
<b>Tabelul 3.8.</b> Influența fitohormonilor asupra inițierii și dezvoltării calusului la diferite tipuri de explante la soiurile de goji 'Ning Xia N1', 'Erma', 'New Big', 'Amber Sweet' și 'Licurici', după 35 zile	72
<b>Tabelul 3.9.</b> Caulogeneza din disc de limb foliar și segment de pețiol, după 30 zile	74
<b>Tabelul 3.10.</b> Influența substratului asupra aclimatizării plantelor de goji	77
<b>Tabelul 4.1.</b> Biometria plantelor speciei <i>Lycium barbarum</i> L. (soiurilor 'Ning Xia N1', 'Erma' și 'Licurici') în perioada de vegetație mai-noiembrie 2017 – 2018	87
<b>Tabelul 4.2.</b> Caracteristicile anatomice ale frunzelor speciei de <i>Lycium barbarum</i> L. spontan și cultivat (condiții de seră și teren)	97
<b>Tabelul 4.3.</b> Efectele reacțiilor calitative pentru identificarea flavonoidelor în diferite produse vegetale de la sp. <i>Lycium barbarum</i> spontană și cultivate	101
<b>Tabelul 4.4.</b> Efectele reacțiilor calitative pentru identificarea taninurilor în diferite produse vegetale de la sp. <i>Lycium barbarum</i> spontană și cultivate	103
<b>Tabelul 4.5.</b> Analiza indicatorilor biochimici a fructelor speciei <i>Lycium barbarum</i> L. spontane și cultivate	107

## LISTA FIGURILOR

	pag.
<b>Fig. 1.1.</b> Distribuția geografică a genului <i>Lycium</i>	18
<b>Fig. 1.2.</b> Căile de dispersie ale genului <i>Lycium</i> , 2011	19
<b>Fig. 1.3.</b> <i>Lycium barbarum</i> (stânga) și <i>Lycium chinense</i> (dreapta)	20
<b>Fig. 1.4</b> Volumul producției de pomușoare în anul 2015 în R. Moldova și prognoza 2021, consum intern de pomușoare, mii t	22
<b>Fig. 1.5.</b> Specia <i>Lycium barbarum</i> L.	23
<b>Fig. 1.6.</b> Efectul conținutului de citochinine și auxine asupra proceselor de creștere și morfogeneză din cultura <i>in vitro</i>	32
<b>Fig. 2.1.</b> Schema amplasării soiurilor de goji în GBNI	44
<b>Fig. 2.2</b> Curba de calibrare cu valorile absorbantei și concentrațiile de rutozidă pentru dozarea flavonoidelor în extractele vegetal	47
<b>Fig. 2.3.</b> Metodologia de cercetare prezentată schematic	51
<b>Fig. 3.1.</b> Schema de prelevare și aseptizarea explanților de goji, cu sterilizantul optim clorură de mercur de 0,1%	53
<b>Fig. 3.2.</b> Inițierea culturii cu meristeme și primordii foliare	56
<b>Fig. 3.3.</b> Influența mediului V4 asupra procesului de inițiere <i>in vitro</i>	58
<b>Fig. 3.4.</b> Proliferarea și microclonarea lăstarilor de goji pe mediul de bază nutritiv MS cu diferite concentrații de citochinine BAP și KIN (mg/l).	61
<b>Fig. 3.5.</b> Înălțimea (cm) a lăstarilor pe medii suplinate cu citochininele BAP și KIN	62
<b>Fig. 3.6.</b> Lăstari regenerați pe mediul MS suplimentat cu 0,5 mg/l BAP, după 30 zile	63
<b>Fig. 3.7.</b> Influența combinației și concentrației hormonilor de creștere asupra creșteri și proliferării <i>in vitro</i> la soiurile de goji	65
<b>Fig. 3.8.</b> Stimularea lăstării axilare pe mediul M6, după 30 zile	66
<b>Fig. 3.9.</b> Capacitatea de înrădăcinare a soiurilor de goji pe mediul MS 100%, ANA de 0,2 mg/l (stânga) și 0,5 mg/l (dreapta)	69
<b>Fig. 3.10.</b> Înrădăcinarea plantulelor pe medii nutritive suplinate cu auxine la soiul 'Licurici'	70
<b>Fig. 3.11.</b> Regenerarea lăstarilor din calusul derivat din fragment de frunză, pe mediul M <sub>6</sub> la soiul 'Erma', după 14 - 30 zile	75
<b>Fig. 3.13.</b> <i>Lycium barbarum</i> L în etapa a II-a de aclimatizare, după 30 zile	77

<b>Fig. 3.14.</b>	Aclimatizare soiurilor de goji în <i>I etapa</i>	78
<b>Fig.3.15.</b>	Etapele cultivării <i>in vitro</i> a speciei <i>Lycium barbarum L.</i>	79
<b>Fig. 4.1.</b>	Fazele de dezvoltare a organelor vegetative în anul 2017 ( <i>stânga</i> ) și în anul 2018 ( <i>dreapta</i> )	82
<b>Fig. 4.2.</b>	Fazele de dezvoltare ale florilor de goji cultivat de la mugure florifer, buton floral, înflorire, sfârșitul înfloririi ( <i>stânga</i> ), legarea fructului, până la faza de dezvoltare a fructului ( <i>dreapta</i> ), Iulie 2018	84
<b>Fig.4.3.</b>	Floare de goji cultivat aflată la începutul ciclului său de dezvoltare ( <i>stânga</i> ), sfârșitul ciclului său de dezvoltare ( <i>dreapta</i> )	884
<b>Fig. 4.4.</b>	Floare de <i>Lycium barbarum L.</i> din flora spontană cu petale puternic reflexe ( <i>stânga</i> ), floare de <i>Lycium barbarum L.</i> cultivat cu petale foarte puțin reflexe ( <i>dreapta</i> )	84
<b>Fig. 4.5.</b>	Histograma înălțimii (cm) plantelor pe parcul a doi ani de la plantare, la cele trei soiuri de goji	85
<b>Fig. 4.6.</b>	Histograma numărului de ramuri pe plantă pe parcul a doi ani de la plantare, la cele trei soiuri de goji	88
<b>Fig. 4.7.</b>	Histograma lungimii ramurilor (cm) pe parcul a doi ani de la plantare, la cele trei soiuri de goji	89
<b>Fig. 4.8.</b>	Histograma numărului de frunze pe plantă pe parcul a doi ani de la plantare, la cele trei soiuri de goji	91
<b>Fig. 4.9.</b>	Analiza fructificării soiurilor de goji în 2017 (primul an de la plantare)	91
<b>Fig. 4.10.</b>	Analiza fructificării soiurilor de goji în 2018 (an-ul II de la plantare)	92
<b>Fig. 4.11.</b>	Secțiune transversală prin limbul foliar la specia <i>Lycium barbarum L.</i> (flora spontană)	94
<b>Fig. 4.12.</b>	Epiderma inferioară a limbului foliar la soiul 'Ning Xia N1'	94
<b>Fig. 4.13.</b>	Secțiune transversală prin limbul foliar, la nivelul nervurii la soiul 'Erma'	95
<b>Fig. 4.14.</b>	Epiderma limbului frunzei goji la soiul 'Licurici'	96
<b>Fig 4.15.</b>	Totalul flavonoidic în frunzele și fructele goji spontan și cultivat	104
<b>Fig. 4.16.</b>	Pondere procentuală a taninurilor determinată titrimetric și spectrofotometric în produsele vegetale de <i>Lycium barbarum</i> spontan și cultivat	105
<b>Fig.4.17.</b>	Conținutul procentual al acidului ascorbic în fructele goji spontane și cultivate	107
<b>Fig. 4.18.</b>	Conținutul procentual de zahăr (A) și aciditate (B) în fructele de goji, spontane și cultivate	108

## INTRODUCERE

### **Actualitatea și importanța problemei abordate**

Condițiile climaterice și fertilitatea solului favorabile din Republica Moldova oferă posibilitate agricultorilor să cultive diverse specii și soiuri agricole de o valoare înaltă. Calitatea fructelor, legumelor și a pomușoarelor moldovenești a fost întotdeauna apreciată atât în țară, cât și peste hotarele ei. În ultimii ani s-a observat o tendință de plantare a culturilor bacifere, dar și de promovare a consumului de pomușoare [242, 282].

Extinderea diversității culturilor bacifere poate fi realizată prin introducerea de noi soiuri de arbuști fructiferi, unul din care este *Lycium barbarum* L. (goji) - aliment funcțional bogat în antioxidanți, vitamine și substanțe minerale importante [1, 34, 113, 163].

Printre diversitatea culturilor pomicole de importanță economică majoră se enumeră *Lycium barbarum* L. (familia *Solonaceae*), cu proprietăți gustative și curative multiple. În ultimii ani, această plantă a atras tot mai mult atenția consumatorilor datorită proprietăților antioxidante și scopuri terapeutice pentru îmbunătățirea vederii [27], prevenirea diabetului [118, 119, 226], a hipertensiunii arteriale [127] și întărirea sistemului imunitar [2, 3, 48, 231].

Totuși, deși intens cercetată, sub aspect alimentar și terapeutic a fructelor, această specie este insuficient studiată din punct de vedere a dezvoltării morfobiologice și structurale ale plantei. Metodele convenționale de înmulțire a acestei culturi nu sunt suficient de efective [254, 284], astfel apare necesitatea introducerii unor metode noi, moderne ce ar facilita și eficientiza acest proces. Majorarea randamentului de obținere a materialului săditor, va fi posibil prin realizarea obiectivelor ce țin de introducerea în cultura *in vitro* a speciei luate în studiu, fiind obținute un număr mare de exemplare sănatoase, genetic omogene de calitate superioară, într-un timp relativ scurt [29, 38, 125, 246].

*Lycium barbarum* L. fiind o specie relativ nouă, nu a beneficiat de studiul comportamentului său în cultură. Astfel, deși naturalizată de mulți ani pe teritoriul R. Moldova, această specie a fost ignorată din lipsa cunoștințelor cu privire la proprietățile sale nutriționale remarcabile [5, 117, 119, 216]. Introducerea în cultură a acestui arbust este oportună, fructele proaspete fiind o adiție valoroasă la alimentația omului modern, săracă în produse de o calitate biologică înaltă.

În literatura de specialitate se observă o tendință de sporire a cultivării arbustului de goji pe fonul unei cereri majore față de fructele și produsele dietetice derivate din acestea [36, 47, 74, 98, 119, 238]. În R. Moldova aceste fructe chinezești sunt crescute de 26 fermieri, iar suprafața terenurilor plantate crește anual [283].



Este cunoscut faptul, că ramura de producere a baciferelor în R. Moldova se află la o etapă incipientă de dezvoltare. Organizațiile: „Pomuşoarele Moldovei”, „Agricultura performantă în R. Moldova” și „Îmbunătățirea productivității în cultivarea arbuștilor fructiferi și a căpșunului” contribuie la sporirea și dezvoltarea acestui sub-sector [262].

Organizațiile și proiectele date au o abordare complex, privind asistența producătorilor și tehnologiile moderne de producere a materialului săditor prin suport informațional specializat. Dezvoltarea sectorului de pomuşoare în R. Moldova generează o cerere mare a materialului săditor, calitatea căruia influențează și productivitatea plantelor. Pentru dezvoltarea și susținerea pepinierelor de arbuști fructiferi, care comercializează material săditor de soiuri valoroase de calitate, o soluție este multiplicarea plantelor, utilizând diverse metode moderne, în special cultura *in vitro*, care asigură obținerea plantelor sănătoase, rezistente la boli cu o creștere mai rapidă față de cele obținute prin metode de înmulțire convenționale.

În acest context, s-a urmărit elaborarea de tehnologii optimizate de multiplicare *in vitro* bazate pe metode simple, accesibile, eficiente, utilizate pe scară largă în domeniul micropropagării; studierea complexă a particularităților de creștere și dezvoltare; efectuarea cercetărilor anatomice și compoziției biochimice a fructelor/frunzelor plantelor cultivate și din flora spontană.

Cercetările corelative de micropropagare, fenologice, biochimice și anatomice expuse în această lucrare pot servi ca suport metodologic în dezvoltarea industriei agro-alimentare, farmaceutice și cosmetice bazate pe materia primă autohtonă.

**Scopul** prezentei lucrări constă în elaborarea tehnologiei de multiplicare *in vitro* a speciei *Lycium barbarum* L., evidențierea particularităților biomorfologice și estimarea biochimică comparativă ale speciei spontane și soiurilor cultivate în condițiile pedoclimatice ale R. Moldova.

În conformitate cu scopul propus au fost desemnate următoarele **obiective**:

- identificarea, mobilizarea soiurilor de goji și evidențierea explantelor adecvate pentru inițierea culturilor *in vitro*;
- selectarea mediilor nutritive optime pentru fiecare etapă de microclonare;
- analiza biologiei dezvoltării plantelor obținute în condițiile *in vitro*, *ex vitro* și în teren experimental;
- studiul anatomic și evaluarea biochimică comparativă a conținutului de flavonoide, taninuri, și acid ascorbic la plantele de *Lycium barbarum* din flora spontană și soiurile de goji cultivat;
- elaborarea tehnologiei de micropropagare și descrierea protocolului de obținerea unui coeficient înalt de înmulțire la soiurile goji și extinderea genofondului de arbuști fructiferi din cadrul GBNI (inițierea colecției).

**Ipoteza de cercetare** constă în elaborarea unei tehnologii de multiplicare prin culturi *in vitro* a speciei *Lycium barbarum* L. și obținerea materialului săditor de calitate necontaminat, uniform și omogen la soiurile goji în condițiile climaterice a R. Moldova. Materialul săditor obținut prin cultura *in vitro* va contribui la înființarea plantațiilor moderne de soiuri rezistente la secetă și de calitate înaltă în R. Moldova și organizarea în GBNI a colecției de arbuști fructiferi. Lucrarea în ansamblu va contribui substanțial la susținerea și extinderea dezvoltării ramurii de arbuști fructiferi, fructele având cu potențial terapeutic și conținut fitochimic bogat.

**Sinteza metodologiei de cercetare și justificarea metodelor de cercetare alese.** Studiul științific și metodologia cercetării, care însumează un număr impunător de metode și tehnici, selectate în cadrul acestei lucrări a permis realizarea obiectivelor propuse. Analiza complexă privind multiplicarea microclonală la specia *Lycium barbarum* L., creșterea și dezvoltarea plantei *in vitro* și *ex vitro* a fost realizată cu aplicarea metodelor de micropropagare a plantelor și tehnici de preparare a mediilor de cultură. Investigațiile privind procesele biologice creșterea și dezvoltarea plantelor în condițiile climaterice a R. Moldova s-au realizat utilizând metode morfologice, anatomice și biochimice. Pentru prelucrarea statistică a rezultatelor s-au aplicat teste de semnificație statistică (ANOVA, *Bonferroni*, testul *Duncan*) ce permit prezentarea și interpretarea clară și veridică a rezultatelor.

#### **Semnificația teoretică**

Rezultatele cercetărilor biotehnologice îmbogățesc informația științifică privind studiile de microclonare și micropropagare a plantelor de goji, bazate pe principiul totipotenței celulare în culturile *in vitro* pentru regenerarea vitroplantulelor. De asemenea, acest studiu vizează particularitățile biologice de creștere și dezvoltare ale plantelor în baza aspectelor fenologice, biometrice, anatomice și biochimice [249, 258, 295], în condițiile pedoclimatice pe teritoriul R. Moldova, date care ar contribui la instruirea corespunzătoare a agricultorilor cu privire la folosirea soiurilor rezistente la secetă și de calitate înaltă.

#### **Valoarea aplicativă a lucrării**

Ca rezultat al cercetărilor științifice a fost elaborat și descris detaliat protocolul de obținere al materialului săditor sănătos și omogen la soiurile de goji pentru R. Moldova. Rezultatele cercetărilor sunt utilizate în cadrul Laboratorului Embriologie și Biotehnologie al GBNI. Materialul săditor obținut a servit ca sursă pentru fondarea colecției din 5 soiuri de goji din GBNI: 'Amber Sweet', 'Erma', 'Ning Xia N1', 'New Big', și 'Licurici' - soi ameliorat de către cercetătorii științifici ai Laboratorului Embriologie și Biotehnologie al GBNI (în prezent soiul se află la CSTSP). Plantele de goji multiplicare *in vitro* pot servi în calitate de material săditor pentru inițierea plantațiilor moderne de goji pe arii extinse pe teritoriul R. Moldova. Totodată, rezultatele studiului sunt incluse

în procesul didactic la disciplinele de studiu: *Botanică aplicată, Botanică farmaceutică, Ecologie și plantele medicinale, Fiziologie vegetală, Chimie biologică, Morfologie și anatomie a plantelor* în instituțiile de învățământ cu profil botanic și agricol, precum și realizarea contractelor cu beneficiari particulari, gospodării țărănești și amatori interesați de soiurile goji.

### **Aprobarea rezultatelor științifice**

Cercetările realizate și datele obținute au fost prezentate și discutate anual la ședințele și rapoartele anuale ale Consiliilor științifice ale GBNI în perioada studiilor doctorale (2016-2019) precum și în cadrul următoarelor întruniri științifice: Conferința Științifică Internațională a Doctoranzilor: "Tendințe contemporane ale dezvoltării științei: Viziuni ale Tinerilor Cercetători", ediția a V-a, 2016, ediția a VI-a, 2017, ediția a VII-a, 2018; Conferința Științifică Internațională Perspectivele și Problemele Integrării în Spațiul European al Cercetării și Educației, Cahul, 2016; Conferința Națională cu participare internațională "Știința în Nordul R.: realizări, probleme, perspective" (ediția a II-a) Bălți, 2016, (ediția a III-a) Bălți, 2019; Simpozionul științific „Conservarea diversității plantelor *in situ* și *ex situ*”, Iași, 2016; International Symposium "Conservation of plant diversity" 5th edition, Chisinau, 2017; Congres al asociației studenților farmaciști din R. Moldova, „Inovarea și creativitatea în practica și cercetarea farmaceutică” Revista Farmaceutică a Moldovei nr.12, 2017; Simpozion național cu participare internațională „Biotehnologii avansate – Realizări și Perspective”, ediția a IVa, Chișinău 2016, Biotehnologii avansate – realizări și perspective”, Ediția a V-a 21-22 octombrie 2019.

### **Sumarul compartimentelor tezei**

Lucrarea cuprinde: adnotare prezentată în limbile: română, rusă și engleză, lista abrevierilor, introducere, patru capitole, concluzii generale și recomandări practice, bibliografie, acte de implementare a rezultatelor științifice, declarația privind asumarea răspunderii și CV-ul. Teza de doctor este expusă pe 156 pagini, conținutul completat cu 18 tabele și 39 figuri.

În **Introducere** se abordează actualitatea și importanța problemei; sunt formulate scopul și obiectivele tezei, este descrisă noutatea științifică a rezultatelor obținute, importanța teoretică și valoarea aplicativă a lucrării, aprobarea rezultatelor și sumarul compartimentelor tezei.

**Capitolul 1 „Starea studiului actual privind dezvoltarea și multiplicare *in vitro* a speciei *Lycium barbarum* L.”** cuprinde o analiză a celor mai recente date din literatura de specialitate, privind valoarea speciei în aspect biochimic, taxonomic, originea și aria geografică de răspândire și cultivare a speciei *Lycium barbarum* L. Tot aici sunt descrise tehnologiile de înmulțire *in vitro* cunoscute în lume, îndeosebi la arbuștii fructiferi. În cadrul capitolului, o atenție deosebită a fost acordată studiului referitor la exigențele culturii față de factorii pedoclimatici și corespunderea cadrului natural din țara noastră (cerințele față de sol, condițiile de temperatură și cantitatea de

precipitații, cerințele față de lumină și caracteristicile ecologice) ce va contribui la instruirea corespunzătoare a horticultorilor, cu privire la adaptarea caracteristicilor agro-pedo-climatice ale R. Moldova.

**Capitolul 2 „Obiectul de studiu și metodele de cercetare”** este expusă descrierea metodologiei de cercetare pentru realizarea studiului: metode biotehnologice (condițiile de sterilizare, inoculare, subcultivare, formulele chimice ale mediilor nutritive, caracteristica factorilor fizici, tehnologici), metode biochimice (analiza calitativă și cantitativă a flavonoidelor, taninurilor și dozarea acidului ascorbic, acidității și zahărul total), metode microscopice și observațiile fenologice privind comportamentul de creștere și dezvoltare al speciei studiate și prelucrarea statistică a datelor obținute.

**Capitolul 3 „Micropropagarea și dezvoltarea *in vitro* a soiurilor de goji”** include rezultatele privind aplicarea microtehnichilor de cultivare tisulară în cultura *in vitro*. Identificarea și elaborarea mediilor nutritive pentru: inoculare, microclonare, micropropagare și rizogeneză. Sunt evidențiate interacțiunile compatibile sau incompatibile dintre mediul de cultură, explant și regulatorii de creștere. Conține descrierea proceselor calusogenezei și organogenezei la soiurile de goji, s-a studiat dinamica de dezvoltare a inoculilor obținuți. Au fost selectate substraturile de cultivare ale plantulelor de goji *ex vitro*, stabilite și descrise condițiile pentru aclimatizarea plantulelor regenerate.

**Capitolul 4 „Studiul morfo-anatomic și biochimic comparativ al speciei *Lycium barbarum* L.”** sunt prezentate rezultatele cercetărilor privind particularitățile biologice de creștere ale arbuștilor de goji, observații și măsurători biometrice cu privire la: *înălțimea plantelor, numărul de ramuri per plantă, lungimea ramurilor, numărul de frunze la faza vegetivă* și elucidarea indicilor morfo-anatomici (*frunza de mijloc a tulpinei*) a soiurilor de goji comparativ cu specia din flora spontană, în contextul rezistenței condițiilor nefavorabile ale mediului.

Analiza biochimică comparativă a scos în evidență prezența flavonoidelor, taninurilor vataminei C, aciditatea și zahărul total în produsele vegetale. Fructele de goji provenite de la plante multiplicare biotehnologic posedă activitate antioxidantă înaltă și pot fi recomandate ca surse autohtone sigure pentru consum în sectorul alimentar, cosmetic și farmaceutic.

Compartimentul **Concluzii generale și Recomandări practice** este dedicat generalizării studiului de față și a posibilităților de implementare în practică a rezultatelor obținute.

**Publicațiile la tema tezei.** Rezultatele obținute sunt reflectate în 21 lucrări științifice: 3 articole în reviste naționale recenzate (dintre care 2 fără coautori), 9 articole în culegeri științifice naționale și internaționale (dintre care 1 peste hotare), 7 comunicări în cadrul unor manifestări științifice naționale și internaționale, 1 cerere de brevet pentru soi de plantă.

## **1. STAREA STUDIULUI ACTUAL PRIVIND DEZVOLTAREA ȘI MULTIPLICAREA IN VITRO A SPECIEI *LYCIUM BARBARUM* L.**

Importanța unei alimentații sănătoase în prezent este din ce în ce mai conștientizată. Una din caracteristicile esențiale ale alimentației echilibrate este diversitatea acesteia. Conform recomandărilor Organizației Mondiale a Sănătății și Organizației Alimentației și Agriculturii consumul minim de fructe și legume zilnic este de 400 g, excepție fiind tuberculii cu amidon [161, 130]. Cultivarea pe scară largă a arbuștilor fructiferi și îndeosebi a speciei mai puțin cultivate și anume *Lycium barbarum* L., este motivată, în special, de importanța alimentară a acestora, datorită conținutului mare de vitamine, săruri minerale, antioxidanți dar și de rezistența la temperaturi scăzute precum și capacitatea de a valorifica terenuri mai puțin productive [76, 145, 204].

### **1.1. Încadrarea sistematică, distribuție și cultivare**

Cercetările efectuate pe plan mondial evidențiază particularitățile specifice privind sistematica și morfologia genului, particularitățile fiziologice și relațiile cu factorii de mediu, cât și posibilitățile de ameliorare genetică, precum și de cultivare în diferite sisteme agricole.

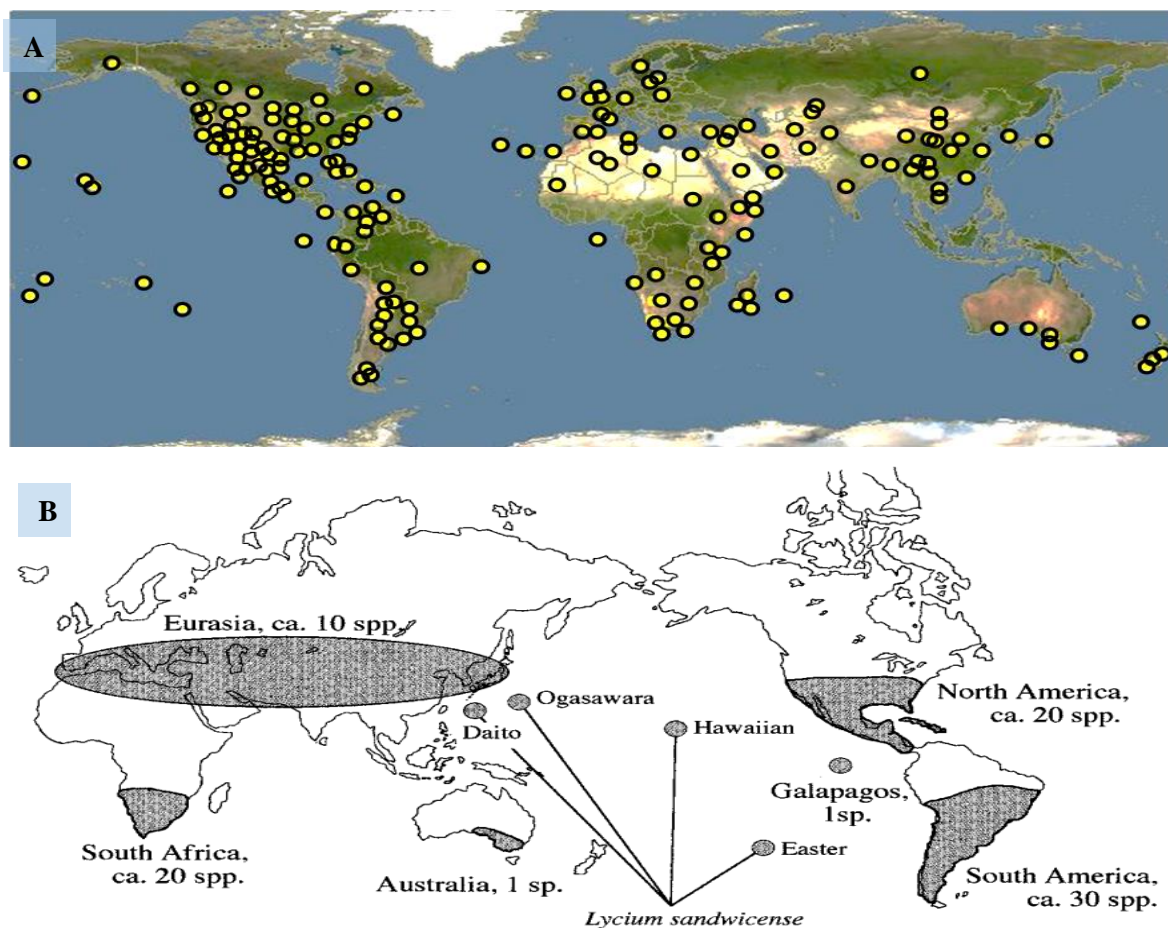
#### **Repere taxonomice și distribuție**

Conform diferitor nomenclatoare botanice *Lycium barbarum* L., este sinonim cu alte denumiri științifice (mai rar folosite în prezent) precum: *Lycium vulgare* (Dunal), *Lycium halimifolium* (P. Miller), *Lycium europaeum* hort., *Lycium subglobosum* (Dunal) sau *Lycium flaccidum* (Veillard) K. Koch [311].

Genul *Lycium* include 80 [123], de specii distincte din familia *Solanaceae* (ordinul *Solanales*), fiind distribuit în regiuni cu climă temperată sau sub-tropicală și prezintă, asemenea întregului gen, o disjuncție între emisfera nordică și cea sudică. Nu se cunoaște cu precizie originea speciei *L. barbarum* L. dar habitatul său natural se găsește între Europa de Sud-Est și Asia de Sud-Vest. Una din zonele specifice de răspândire este Ningxia din China, de unde *lycium* s-a răspândit ca plantă de cultură în America de Nord, Africa de nord și Australia respectiv Noua Zeelandă [73].

Sunt menționate aproximativ 10 specii originare din zona Euro-Asiatică, 20 din zona sud-Africană, 20 din zona nord-Americană, 30 de specii originare din zona Americii de Sud și câte o specie ce își are originea în Australia, Insulele Galapagos și alte insule din Oceanul Pacific (Hawaii, Ogasawara, Daitou) (Figura 1.1; A, B) [6, 73].

Zona cu cea mai mare diversitate în ceea ce privește numărul speciilor de *Lycium* este cea a continentului American, America de Sud (Figura 1.1, A) este considerată ca fiind locul de origine al acestui gen și chiar al întregii familii a Solanaceelor [195].



**Fig. 1.1. Distribuția geografică a genului *Lycium***

**Notă:** **A** – răspândirea speciei pe glob; **B** – distribuția după T. Fukuda, J. Yokoyama, H. Ohashi (2001) a celor 80 specii de *Lycium* [73]

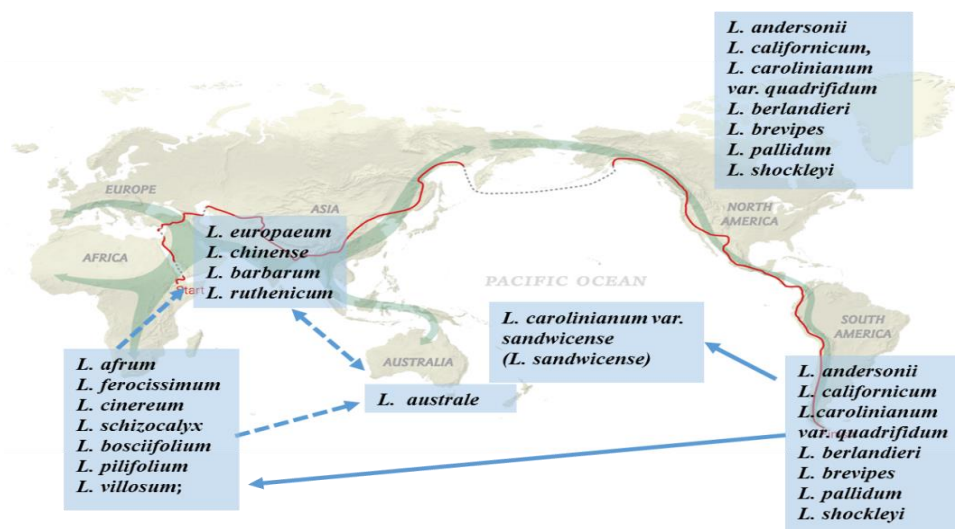
Cercetările recente denotă că speciile care s-au dezvoltat în zona Euroasiatică și în Australia au un strămoș comun din sudul Africii, specie care a evoluat, la rândul său, dintr-o plantă originară din continentul American [73] (Figura 1.2).

Printre cele mai reprezentative specii ale genului *Lycium*, pentru fiecare zonă menționată mai sus, se numără:

- Europa și Asia: *L. europaeum*, *L. chinense*, *L. barbarum*, *L. ruthenicum*;
- Sudul Africii: *L. afrum*, *L. ferocissimum*, *L. cinereum*, *L. schizocalyx*, *L. bosciifolium*, *L. pilifolium*, *L. villosum*;
- America de Nord: *L. andersonii*, *L. californicum*, *L. carolinianum* var. *quadrifidum*, *L. berlandieri*, *L. brevipes*, *L. pallidum*, *L. shockleyi*;
- America de Sud: *L. cestroides*, *L. chilense*, *L. elongatum*, *L. morongii*, *L. americanum*, *L. cuneatum*, *L. ameghinoi*, *L. tenuispinosum*, *L. nodosum*, *L. vimineum*;
- Australia: *L. australe*;
- Insulele Galapagos: *L. minimum*;

- Insulele din Pacific (Hawaii, Ogasawara, Daitou): *L. carolinianum* var. *sandwicense* (*L. sandwicense*).

*L. barbarum* L. în limba latină; goji– limba română; goji berry sau wolfberry – limba engleză; lyciet – limba franceză; дереза– limba rusă.



**Fig. 1.2. Căile de dispersie ale genului *Lycium*, 2011 [73]**

În unele cazuri, speciile acestui gen s-au adaptat și habitatelor costale, devenind rezistente la expunerea maritimă și la vânturile puternice. Acesta este și cazul arbuștilor de *L. barbarum* L. care au o bună toleranță la solurile saline și sunt folosiți sub formă de garduri vii sau pentru fixarea solurilor nisipoase, în zonele cu o micro-climă maritimă. Mai mult, această specie de arbust este considerată ca având cea mai vastă distribuție (la nivel mondial) în raport cu celelalte specii ale genului din care face parte [37].

Jill S. Miller și Rachel A. Levin (2005) au vizat filogenia genului *Lycium*, dimorfismul sexual, distribuția speciilor și relațiile evoluționare dintre acestea. Făcând o sinteză a rezultatelor acestor studii, afirmând faptul că cele trei specii est-asiatice: *L. barbarum*, *L. chinense* și *L. ruthenicum* formează un grup monofiletic, însă relația lor cu celelalte specii din genul *Lycium* sunt încă insuficient studiate [164].

Mai mult, dat fiind faptul că *L. barbarum* L. este o specie naturalizată în majoritatea țărilor lumii, acest lucru a îngreunat procesul de diferențiere între specii și mai ales între subspeciile acestui arbust. Printre primele țări europene în care a fost introdusă această specie de *Lycium* se numără Marea Britanie, răspândirea acestei specii în arealele britanice se datorează, cel mai probabil, atractivității fructelor sale și utilizarea sub formă de garduri vii. Conform unor surse [318] *L. barbarum* L. a fost introdus în Anglia în anul 1730 de către ducele de Argyll, devenind cunoscut sub denumirea de „Duke of Argyll’s Tea Tree” sau „Duke of Argyll’s Teaplant”, cu numele *barbarum* al speciei, *L. barbarum* L.. Aceasta este strâns legată de *Lycium chinense* Mill, deoarece



în 1753 Linnaeus folosește denumirea de *L. barbarum*. Botanistul Philip Miller, 15 ani mai târziu a descris *Lycium chinense*, fiind cultivat în sudul Chinei, în timp ce *L. barbarum* L. este cultivat în nordul Chinei începând cu anul 1987. [172].

Tot în anul 1825, autorul englez P. W. Watson descria în lucrarea sa „Dendrologia britannica” [156] atât *L. barbarum* L (LB), cât și *Lycium chinense* (LC) Mill. (Figura 1.3).



**Fig. 1.3. *Lycium barbarum* (stânga) și *Lycium chinense* (dreapta) [156]**

Cea mai răspândită specie pe glob sub denumirea de „goji” (denumire comercială) este *L. barbarum* L. (popular cățina de gard). Denumirea comercială este atribuită de către etnobotanistul nord-american pe nume Bradley Dobos, fiind specia cu valoarea comercială cea mai semnificativă.

Linnaeus și Miers (1825) afirmă că specia *Lycium europaeum* L. este o specie distinctă față de LB mai mult, acesta chiar atrage atenția asupra faptului că cele două specii au fost confundate de către unele autorități [106]. Ulterior, *L. europaeum* apare ca o subspecie a LB. Hermann Müller (1829-1883) descrie subiectul polenizării plantelor de către insecte, tratat ce a stat la baza unei alte lucrări și anume cea a lui Paul Knuth (1906-1909), ce viza același subiect, axându-se nu doar pe biologia la LB (aici sub denumirea de *Lycium vulgare* Dun.) ci și pe o serie de specii implicate în procesul de polenizare al acestei plante [311]. Ca rezultat a mai multor studii, s-a constatat că *L. europaeum* apare ca o subspecie a LB, în literatura de specialitate, în special, cea clasică [104], apar uneori confuzii și dificultăți cu privire la denumirea și diferențierea unor specii foarte asemănătoare din cadrul genului *Lycium* [33].

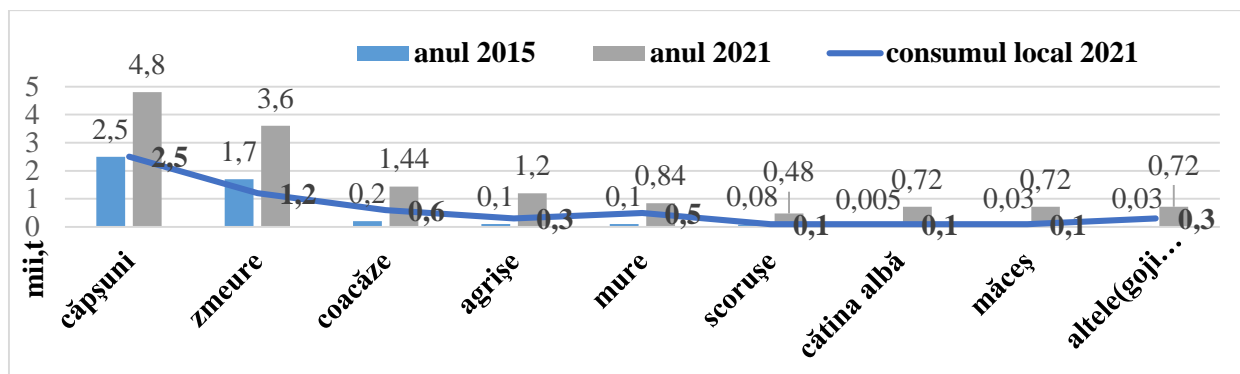
În Franța arbustul de LB a fost descris de către M. Jaume Saint-Hilaire în tratatul său din 1825 despre pomii și arbuștii cultivați sau prezenți în flora spontană a țării. Se găsește pe marginea drumului, în pădure cu solurile nitrata [120].



În Statele Unite ale Americii unii autori [66, 164] care au descris arbustul de LB și care i-au remarcat prezența în flora locală spontană sau ca plantă cultivată în special în scopuri decorative (garduri vii), fac scurtă comparație între acesta și *Lycium chinense* Mill., acțuând faptul că LB se diferențiază față de LC prin dimensiunile mai mici ale frunzelor și fructelor și prin forma obtuză a lobilor caliciului (Figura 1.3). În prezent acest arbust începe a fi cultivat și în scopuri alimentare sau ca plantă medicinală pe teritoriul S.U.A. [170].

În ceea ce privește distribuția acestei specii a fost înregistrată, de-a lungul timpului, în următoarele state: Austria, Belgia, Bulgaria, Luxemburg, Italia, Grecia, Cehia, Slovacia, Germania, Elveția, Olanda, Spania, Ungaria, Portugalia, Polonia, Rusia și Turcia. Acești arbuști au fost observați chiar și în țările nordice precum: Danemarca, Suedia și Norvegia. În plus, lucrările de specialitate mai vechi indică prezența și pe teritoriul fostei Iugoslaviei și a fostei U.R.S.S. [318]. Nu în ultimul rând, LB se găsește și în România, fiind observat în zona Dobrogei (inclusiv în Delta Dunării [261], în regiunea Moldovei (unde a fost descris ca fiind o plantă adventivă ce prezintă un caracter invaziv pronunțat) și în orașul Timișoara [259].

Conform cercetătorilor autohtoni, *L. barbarum* L. se întâlnește în flora spontană a R. Moldova. Este menționat doar în câteva lucrări și este descris ca fiind o plantă alohtonă și naturalizată ce a fost introdusă din China în scop ornamental (garduri vii) și care a pătruns în ecosistemele naturale, căpătând un caracter potențial invaziv [277, 299]. Cercetătorii cehi, englezi la fel ca și cei români – consideră că acest arbust a fost introdus pe teritoriul țării lor din considerente estetice. În cadrul unor cercetări [270] s-a demonstrat, că deși *L. barbarum* L. considerat drept plantă „potențial invazivă”, acest risc nu este viabil atunci când această specie este introdusă într-un sistem de cultură corespunzător în care plantele sunt conduse corect, nefiind lăsate să formeze mărăcinișuri dacă prezintă această tendință. Deasemenea, folosirea unui material biologic de calitate în cultură poate reduce total acest potențial pericol. Acest lucru se realizează prin alegerea și cultivarea soiurilor de calitate, înalt productive, cu o dinamică normală de creștere și dezvoltare, cu rezistență sporită la boli și dăunători [137]. Astfel, pentru satisfacerea și menținerea criteriilor menționate, se va prefera metoda înmulțirii prin culturi *in vitro* față de cele generative și vegetative. Principalii cultivatori de goji la nivel mondial rămân a fi cei din China, care ocupă primul loc, apoi Spania, Italia, Polonia, Maria Britanie, Ungaria, Franța, Austria, Rusia și România [165, 317]. Conform Biroului Național de Statistică (BNS), consumul de pomușoare în stare proaspătă pe cap de locuitor reprezintă aproximativ 1,2 kg. În 2021 se preconizează că consumul de pomușoare va crește până la 1,6 kg și va constitui 5,4 mii tone pe diferite specii. Media europeană de consum a ”fructelor moi”, ”fructe mici” sau ”fructe de pădure” pe cap de locuitor în 2016 a fost de peste 6 kg (Figura 1.4).



**Fig. 1.4 Volumul producției de pomușoare în anul 2015 în R. Moldova și prognoza 2021, consum intern de pomușoare, mii t**

Condițiile pedoclimatice sunt principalele repere care au permis aclimatizarea arbustului goji în R. Moldova. Astăzi în R. Moldova sunt înregistrate mai multe plantații de goji de la circa 20 producători cu suprafețe mari și mici de cca 20 ha. În 2017, conform BNS, prima plantație de goji înregistrată oficial este cea din raionul Ungheni, satul Chirileni ce cuprinde 10 hectare. Cultivatorii se bucură de o productivitate sporită cu peste 10 tone la hectar anual. Unicul soi de goji omologat și înregistrat în catalogul de soiuri al R. Moldova este 'Miracol' înregistrat în anul 2018 [253].

## 1.2. Descrierea botanică a speciei *Lycium barbarum* L.

*Lycium barbarum* L. este un arbust cu ramuri ce pot atinge înălțimea de 2,5 m iar diametrul tufei poate varia între 1-3 m în funcție de condițiile de mediu. Rata de creștere este moderată, viteza de creștere medie fiind de 0,5 m/an la maturitate, în condiții optime de cultivare [273].

**Rădăcina.** Rădăcină pivotantă, trasantă, adaptată pentru îndeplinirea a două funcții principale, una de natură mecanică, de fixare a plantei în sol și alta vitală, de a absorbi apa și substanțele minerale dizolvate în aceasta. Rădăcina contribuie la metabolismul plantei.

**Tulpina și ramurile.** La început drepte, spre vârf arcuit pendente, prevăzute cu spini proveniți din transformarea lujerilor. Lujeri lungi, flexibili, spinoși, fistuloși, cenușii-albicioși, cu numeroase lenticile. Muguri alterni, mici, câte 4-5 la un loc, cu baza îngropată în scoarță. Ramurile acestei specii sunt foarte numeroase, curbate și atârână atunci când nu sunt susținute, subțiri, flexibile și glabre. Ramurile au culoare pală maroniu-gălbuie sau gri-albicioasă și pot prezenta sau nu spini de cca, 1 cm lungime (Figura 1.5) [271].

**Frunzele.** Sunt dispuse alternativ pe ramuri sau fasciculat. Forma acestora este simetrică, însă foarte variabilă, putând fi: ovate, ovat-lanceolate, lanceolate, eliptice și rareori spatulate. Frunzele au o suprafață glabră, partea superioară fiind de un verde intens, iar partea dorsală a frunzei fiind de un verde pal, mai puțin lucios. Unele surse descriu fața inferioară a frunzei de LB ca fiind glaucă. Limbul, de o consistență erbacee puțin cărnoasă, prezintă o nervațiune penată puțin pronunțată.

Marginea limbului foliar este întreagă, ușor vălurită, iar forma vârfului limbului poate fi: ascuțită, acuminată sau obtuză. Baza frunzei este scurt-atenuată cu pețiol de 3,0-10,0 mm. Ca dimensiuni, frunza de LB are între 2,0-3,0 cm lungime și 2,5-8,0 mm lățime. Totuși, la unele biotipuri cultivate, aceste dimensiuni ajung până la 6,0 cm în lungime și 1,5-3 cm în lățime (Figura 1.5, B) [272].

**Florile.** *Lycium barbarum* L. înflorește din luna iunie, până în septembrie. Mai mult, există unele consemnări care atestă faptul că această plantă poate înflori chiar și în luna noiembrie. Florile pot fi solitare sau în inflorescențe de câte 2-3, chiar până la 6 uneori, situate în zona nodurilor. Pedicelul ce susține floarea este filiform, cu o dimensiune cuprinsă între 6 și 13 mm în lungime, totuși, în unele surse acesta este descris ca având 5-15 mm sau chiar 1-2 cm [84]. Petalele pot avea culori de la nuanțe deschise de lila, până la nuanțe intense de mov sau purpuriu. Spre sfârșitul ciclului de viață, florile își pierd coloritul devenind albe-gălbui. În centru, unde au o culoare mai deschisă, florile de LB prezintă o serie de dungi de culoare închisă, contrastante, ce servesc drept ghidaje către nectar. Caliciul are o lungime de 4,0-5,0 mm sau 2,5-3,5 mm după alte surse [59, 78], formă campanulată și este împărțit în 2 sau 3 lobi inegali, posibil chiar și în 4-5. Corola are formă rotat-campanulată (stea/clopoțel), cu o lungime de 1,0-1,3 cm. Tubul corolei are lungimea de 8,0-10 mm după unele surse și 3,0-7,0 mm după altele. Petalele, puternic reflexe, sunt 5-6 la număr, cu formă oval-lanceolată și dimensiuni de 9,0-14,0 mm în lungime. Staminele, 5 la număr, sunt mai lungi decât corola, au antere de cca, 1 mm de formă orbiculară. Pistilul sau gineceul depășește staminele în lungime, având un ovar cu formă oblongă, stil filiform, glabru și stigmat globoid, bilamelat (Figura 1.5. C).



**Fig. 1.5. Specia *Lycium barbarum* L.**

În ceea ce privește florile de LB, mai poate fi menționat și faptul că la începutul ciclului de viață, acestea au filamentele staminelor îndoite în sens opus față de orientarea stilului pentru a evita atingerea dintre antere și stigmat. Astfel, este încurajată polenizarea încrucișată care este, cel mai adesea, efectuată de către diverse specii de albine (*Bombus agrorum*, *B. lapidarius* ș.a.) [78, 244].

Ulterior, odată cu avansarea către sfârșitul ciclului său de viață și pierderea coloritului violet, floarea de LB – care este ambigenă – își apropie anterele de stigmat astfel încât, prin apropiere sau atingere directă, să se poată produce autopolenizarea.

**Fructele.** Bace de formă oblong-ovată, uneori eliptică, cu vârful ascuțit sau obtuz și suprafață glabră. Culoarea poate varia de la roșu aprins până la galben-portocaliu, iar gustul este dulce-fad, semănând puțin cu cel al stafidelor, mai ales atunci când acestea sunt consumate în stare uscată (Figura 1.5. D). Dimensiunile fructului sunt de 0,4-2,0 cm în lungime, cu 0,5-1,0 cm în diametru [136]. Semințele așezate în mod compact, 10-20 la număr, galben-maronii, cu aspect sferic-reniform, ele au dimensiuni de aprox. 2,5-3,0 mm în lungime și 2,25-2,5 mm în lățime, germeul este curbat, iar datorită culorii atractive a fructelor, semințele de LB sunt dispersate deseori de către păsări. În emisfera nordică perioada de maturitate a fructelor de goji este situată între lunile iulie și octombrie [200].

Arbustul de goji are o tendință de dezvoltare decumbentă cu numeroase ramuri flexibile și lăstari care, de obicei, nu pot susține greutatea fructelor aplecându-se, astfel, atunci când producția este una însemnată. Acest fapt demonstrează necesitatea de a conduce creșterea plantelor prin sisteme de susținere, astfel încât ramurile să aibă o înclinație cât mai mică. Se vor prefera lăstarii cu un unghi de creștere mai mic de 45°. De asemenea, se va încuraja formarea unui trunchi prin alegerea unui lăstar principal și îndepărtarea lăstarilor de la baza acestuia. Nu trebuie omisă nici încurajarea formării lăstarilor laterali în vederea formării unei coroane [138, 139].

Cu toate acestea, soiurile productive vor avea nevoie, cel mai probabil, și de susținere. Astfel plantele tinere se vor conduce cu ajutorul unor tutori iar plantele mature pot primi un plus de susținere cu ajutorul unor plase sau prin creșterea pe sârmă. Nu se vor uita nici tăierile de întreținere ce ar trebui să vizeze rădăcina coroanei și sporirea productivității arbuștilor. Altfel spus, este de preferat ca, în plantații, conducerea plantelor să fie realizată cu trunchi și coroană și nu sub formă de tufă – aceasta din urmă fiind forma naturală de dezvoltare a speciei [270].

### **1.3. Proprietăți farmaceutice și nutritive ale speciei *Lycium barbarum* L.**

Începând cu secolul XXI pe teritoriul țărilor euroasiatice, americane [1, 119, 163] și chineze [49, 50], fructele de *L. barbarum* L. (goji) au devenit obiectul de cercetare în multe laboratoare biochimice și continuă a fi până în prezent [51, 91]. Fructele de goji sunt adevărate depozite de substanțe biologice active (SBA). Printre constituenții descriși în fructul de *L. barbarum* L. Cei mai investigați compuși au fost polizaharidele. Acestea manifestă activitate imunomodulatorie eficientă inhibând creșterea tumorilor maligne și distruge celulele canceroase chiar și la animalele de laborator [25]. În componența polizaharidelor au fost identificate monozaharide ca: xiloza (Xil),

glucoză (Glc), arabinoză (Ara), ramnoză (Rha), mannoză (Om), galactoză (Gal), fructoză (Fuc), acid galacturonic (GalA), acid glucuronic (GlcA) [220], care sunt estimate să constituie 5-8% din fructele uscate [217] și 02-2,48% din materia primă [167].

Pe lângă vitamine și minerale, fructele arbustului de goji au în componența lor și o serie de alți compuși organici, unii dintre ei fiind foarte valoroși în alimentația umană. Carotenoizii, substanțe naturale sintetizate de plante, având culori diferite: galben, roșu, portocaliu, din punct de vedere chimic sunt reprezentați de alfa și beta-caroten, beta-criptoxantină, zeaxantină, luteină și licopen [5]. Acești compuși organici au o acțiune benefică asupra organismului prin: atenuarea efectelor stresului oxidativ, întărirea sistemului imunitar sau prevenirea bolilor tumorale și cardiovasculare. De asemenea conțin, vitaminele A, B și C. Au un conținut ridicat de proteine (10%) și oferă 18 aminoacizi dintre care 8 esențiali [135, 197].

Fructele goji, conțin componente bogate în glutation, care este unul dintre cei mai eficienți antioxidanți. Cercetătorii din spațiul chinez [110] au dedicat atenția asupra cercetării polizaharidelor din goji, în timp ce alte clase de compuși funcționali (alcaloizi, glicoproteine, tocoferoli) au fost investigate de cercetătorii din afara Chinei [22, 221]. Printre alți fitocompuși descriși în fructul de goji, literatura menționează cantități mici de: flavonoide, acizi fenolici, flavonoide, taninuri și acizi organici (citric, malic și fumaric) [83, 133]. În același timp, studii mai recente au demonstrat și argumentat un spectru larg de acțiuni farmacologice a fructelor : sporirea imunității și potenței sexuale [233], antioxidantă [27, 202, 226, 231], anticancer [77], reținerea proceselor de îmbătrânire [27] antiradiantă și îmbunătățirea calității sângelui [15].

Printre alte efecte terapeutice fructele goji sunt recomandate ca adjuvant în tratamentul diabetului (hipoglicemic), bolilor cardiace (hipotensor, reglare a colesterolului), tuberculozei, pneumoniei infantile, anemiei, afecțiunii ale sistemului nervos sau tulburărilor de vedere provocate de malnutriție. De asemenea, atunci când este asociat cu alte plante medicinale (fructe de pădure, rodie, coacăz, mure, afine ș.a.), goji are efect anti-aging (de încetinire a îmbătrânirii) prevenind albirea părului, apariția ridurilor și a pigmentării pielii [92, 191, 202].

În ultimii ani au apărut multe lucrări [47, 53, 130] axate pe studiul frunzelor, unde este demonstrată corelația dintre conținutul polifenolic și activitate antioxidantă înaltă manifestată împotriva radicalilor liberi și antimicrobiană la sp. *L. barbarum* cultivată și spontană. Fructele de goji au o capacitate de absorbție a radicalilor de oxigen (ORAC) de aproximativ 3,2900  $\mu\text{mo TE}/100\text{g}$  de fructe [88], fiind unele dintre cele mai bogate surse de antioxidanți. Acest indice este mult mai mare decât în fructele de mere 2,828  $\mu\text{mo TE}/100\text{g}$  de fructe, dar puțin mai mic decât la mure 4,669  $\mu\text{mo TE}/100\text{g}$  de fructe și zmeură 5,065  $\mu\text{mo TE}/100\text{g}$  de fructe [23, 39].

**Compoziția nutrițională a fructelor.** Fructele de goji au o valoare nutrițională înaltă datorită compoziției lor care asigură o cantitate semnificativă din necesarul zilnic de macronutrienți. În jur de 68% din masa totală a unui fruct e reprezentată de carbohidrați, goji fiind, însă bogat și în proteine (12 – 16 % din masa totală a fructului), acizi grași (8,5 % după un an de păstrare și 0,5 % după 1 – 3 ani de păstrare în stare uscată), fibre alimentare (10 % după un an și 21 % după 1 – 3 ani de păstrare în stare uscată) [26]. Variabilitatea compozițională și profilul nutrițional al fructelor sunt determinate de expunerea la lumina solară, condițiile pedoclimatice, de modul de procesare, păstrare și distribuție. Această variabilitate este valabilă pentru toate componentele nutritiv valoroase: macronutrienți (proteine, glucide, lipide), cât și pentru micronutrienți (minerale, vitamine) și produși cu funcții antioxidante (carotenoizi) [19, 24].

Privind evaluarea proprietăților antioxidante pentru sănătatea omului, fructele de goji pun la dispoziție un spectru foarte larg și o cantitate însemnată de vitamine, minerale și aminoacizi. Mai exact, aceste mici fructe conțin: 7 vitamine, 11 minerale esențiale, 22 oligoelemente și 18 aminoacizi. Printre cele 7 vitamine putem aminti complexul vitaminic B (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub> și B<sub>6</sub>), vitamina C, vitamina E și vitamina A. Vitaminele sunt compuși organici indispensabili vieții, creșterii și dezvoltării corpului uman. Acestea nu au o valoare energetică proprie și trebuie preluate din alimente deoarece, de obicei, organismul nostru nu le poate sintetiza (excepție vitamina D) [149, 213].

Cele mai bogate surse de vitamine sunt alimentele naturale integrale (neprocesate), acest lucru fiind explicat prin sensibilitatea acestor compuși la diverse tratamente precum cele termice (ex: fierbere, congelare, pasteurizare) sau chimice (oxidare) care rezultă în urma procesării alimentelor. Un număr impunător de lucrări științifice au fost publicate privind proprietățile antioxidante ale speciei *L. barbarum* [10, 56, 131]. Generalizând principalii nutrienți și proprietățile farmacologice din fructele de goji ce pot avea numeroase efecte benefice asupra organismului, unii autori au vizat determinarea activității biologice ale acestor compuși, ajungând la concluziile prezentate în Tabelul 1.1.

Studii complexe au raportat, că factorii de mediu precum temperatura și lumina, procedeele de cultivare se răsfrâng asupra capacității antioxidante a pomușoarelor. Mulți factori genetici și de mediu afectează producția de fructe și acumularea de compuși bioactivi, determinând calitatea nutrițională [40, 44, 207, 235]. Aceste caracteristici ce țin de factorii de mediu, factorii fiziologici, cantitatea de principii active în fructe manifestă interes în studii și cercetări, astfel în cât consumul de fructe sau pomușoare să compenseze consumatorului aportul necesar de compuși și principii activi necesare sănătății umane. Aceste caracteristici ce țin de factorii de mediu, factorii fiziologici, cantitatea de principii active în fructe manifestă interes în studii și cercetări, astfel în cât consumul

de fructe sau pomușoare să compenseze consumatorului aportul necesar de compuși și principii activi necesare sănătății umane. Studii recente efectuate de *American Cancer Society* indică că acidul elagic din fructe poate reduce efectele nocive pe care estrogenul le are în cazul cancerului glandelor mamare [82, 190,194].

**Tabelul 1.1. Sinteza proprietăților farmacologice din fructele de goji**

<b><u>Micronutrienți</u></b>	<b>Activități farmacologice</b>	<b>Referințe</b>
<b>Calciul</b>	Componentă de bază a sistemului osos și a dinților. Are un rol complex în activitatea țesuturilor moi, fiind implicat și în buna funcționare a sistemului cardiac și neuro-muscular, în stabilirea echilibrului hormonal și în transportul trans-membranar.	[4, 219]
<b>Potasiul</b>	Electrolit esențial și factor co-enzimatic cu rol în scăderea hipertensiunii arteriale.	[25]
<b>Fierul</b>	Co-factor al enzimelor implicate în desfășurarea a numeroase procese metabolice. Carența în acest nutrient poate provoca anemie.	[98]
<b>Zincul</b>	Esențial în sintetiza proteinelor și a ADN-ului, el afectează modul de funcționare a peste 100 de enzime. Este implicat și în activități celulare de bază precum transportul trans-membranar, creșterea și repararea celulei.	[48]
<b>Seleniul</b>	Nutrient cu proprietăți antioxidante, valoros în special în zonele unde există carențe în sol ale acestui mineral (ex: România).	[145]
<b>Vitamina C.</b>	Vitamină cu proprietăți anti-oxidante ce protejează moleculele de acțiunea distrugătoare a radicalilor liberi.	[214]
<b><u>Antioxidanți</u></b>	<b>Activități farmacologice</b>	<b>Referințe</b>
<b>Zeaxantina</b>	Antioxidantul principal din fructele de goji, având o înaltă biodisponibilitate atunci când este preluat din aceste fructe. Acțiunea sa este resimțită mai ales la nivelul celulelor epiteliale ale cristalinului ochiului uman, protejându-le (alături de luteină) pe acestea de acțiunea razelor ultra-violete (UVB) și încetinind evoluția degenerescenței maculare sau apariția cataractei. Zeaxantina mai are acțiune benefică și asupra ficatului, stimulând activitatea enzimelor antioxidante și diminuând depunerea colagenului și a transaminazelor.	[28]
<b>Licopenul</b>	Cunoscut cel mai bine ca fiind un compus caracteristic tomatelor, el se regăsește și în fructele de goji, studiile recente demonstrând prezența acestui compus în cantități de 1,4 g la 100 g de praf concentrat din sucul de fruct. Licopenul are acțiune anti-tumorală, reducând semnificativ riscul de dezvoltare a formelor agresive de cancer de prostată la bărbați	[78, 232]
<b>β-carotenul</b>	Acest pigment carotenoid este un precursor al vitaminei A. Prezintă proprietăți antioxidante, intră în structura celulelor și este esențial în procesul de creștere, îmbunătățire a vederii și în menținerea sănătății dinților, oaselor și a pielii.	[221]
<b>β-criptoxantina</b>	Acțiune anti-diabetică prin scăderea nivelului de glucoză din sânge, prevenirea apariției intoleranței la glucoză și echilibrarea balanței între colesterolul „rău” (LDL) și cel „bun” (HDL). Mai are rol și în stoparea proceselor inflamatorii poliartrite și în prevenirea pierderii masei musculare și osoase (osteoporoză).	[128]

Un rol important în lupta împotriva cancerului îl au și antioxidanții, flavonoidele și vitamina C din fructele goji care ajută la reducerea radicalilor liberi, prevenind astfel apariția cancerului și a

diferitelor boli cronice. Flavonoidele prezintă un interes deosebit datorită proprietăților benefice asupra organismul uman. Acestea pot influența asupra celulelor canceroase prin mecanisme, cum ar fi declanșarea proceselor ce conduc la apoptoză (moartea programată a celulei), împiedicarea diviziunii celulare prin depolimerizarea microtubulilor, inhibarea procesului de angiogeneză și respectiv proliferarea tumorilor [121, 143, 188].

În literatura de specialitate acumularea substanțelor polifenolice și flavonoide poate fi determinată de condițiile climaterice umiditate ridicată, zile mai puțin însoțite în perioada înfloririi. Este demonstrat că conținutul de flavonoidele în plante variază în funcție de durata și intensitatea luminii solare, deoarece ele constituie substanțe cu rol de ecran față de radiațiile UV [199, 319].

#### **1.4. Cerințele față de factorii pedoclimatici și caracteristicile ecologice ale speciei *Lycium barbarum* L.**

Solul, relieful și condițiile climaterice ale R. Moldova sunt favorabile pentru cultivarea arbuștilor fructiferi, inclusiv și pentru arbustul goji [201]. Planta tolerează soluri cu bonitare redusă, oscilația temperaturilor și un grad de insolație sporit, similare cu cele din regiunea Ningxia. Totuși, goji se poate adapta/aclimatiza, fiind considerat un arbust nepretențios, însă pentru ca producția să fie una calitativă, se impune respectarea anumitor cerințe.

**Cerințele față de sol.** Goji preferă solurile nisipoase, argiloase sau chiar lutoase, însă bine drenate. Unii experți sunt de părere că acest arbust poate tolera și soluri foarte uscate sau salinizate, având rol și de fixare a solurilor sau acționând ca barieră ecologică. Evident, în aceste condiții nefavorabile, arbustul îndeplinește mai mult o funcție de minimă adaptare ecologică fără a avea, însă, o producție cantitativă și calitativă însemnată [184, 225]. Pentru dezvoltarea arbustului e nevoie de un pH situat în jurul valorii de 7 (neutru), însă pot fi tolerate și soluri mai acide sau mai alcaline. Același lucru este valabil și în cazul conținutului în nutrienți a solului, goji preferând substraturi de calitate medie sau bună, dar tolerându-le pe cele mai puțin fertile, ce nu au o cantitate semnificativă de humus [103, 236].

**Cerințele față de temperatură.** Exigențele speciei LB față de mediu sunt relativ neînsemnate, fiind un arbust relativ nepretențios fapt ce îl face ușor de cultivat și de îngrijit. Cu toate acestea, atunci când vine vorba de obținerea unei recolte calitative de fructe de goji, aceste particularități agropedoclimatice devin evidente. În ciuda preferinței pentru o climă mai călduroasă, *Lycium*-ul este rezistent și la iernare, supraviețuind la temperaturi negative sau în condiții de îngheț. LB este un nanofanerofit cu o rezistență la ger destul de bună (-15°C, -23°C), dar numai pe perioade relativ scurte de timp [261].



**Cerințele față de apă.** În ceea ce privește aportul de apă, goji este obișnuit să tolereze episoade moderate de secetă, însă pentru menținerea unor condiții optime, umiditatea relativă a solului trebuie să fie în permanență peste valoarea de 50% [215]. În cazul expunerii la unele episoade prelungite de secetă (câteva luni), pentru menținerea producției în parametrii normali, este suficientă o cantitate de cca 3 cm<sup>3</sup> de apă, distribuită din 2 în 2 săptămâni, pentru fiecare arbust în parte. Totuși, mult mai important este că plantele nu trebuie ținute în condiții de umezeală sporită și irigate excesiv. Dacă ne confruntăm cu situația solurilor cu umiditate înaltă sau au o umiditate în exces, se recomandă lucrări de asanare sau plantare pe straturi de pământ înălțate. În caz contrar, plantele de goji nu vor avea o producție satisfăcătoare, vor fi predispuse unor boli (mucegai) sau, chiar mai rău, pot pieri dacă planta nu a ajuns încă la maturitate [236].

**Cerințele față de lumină.** *Lycium barbarum* L. este un arbust obișnuit cu zonele însorite (cu tendințe de ariditate), astfel, pentru o bună dezvoltare și o producție însemnată, se recomandă plantarea culturii în zone cât mai expuse luminii solare (6-8 ore pe zi). Deși arbustul nu va avea probleme de creștere nici în zonele parțial umbrite, totuși, producția de fructe va fi mai redusă [139].

**Cerințele agrotehnice.** Atunci când se plantează materialul săditor, trebuie să se țină cont de dimensiunile medii ale arbustului ajuns la maturitate, pentru asigurarea unui spațiu optim de nutriție. Astfel, în cazul goji-ului se recomandă plantarea de minim 2 metri între fiecare plantă. Gropile în care se vor planta puieții necesită să aibă o adâncime de 50-70 de cm, în care se adaugă și o cantitate mică de mranită, pentru atenuarea stresului transplantării suferite de plantă. După finalizarea operațiunii de plantare se vor folosi cca 10-15 l de apă pentru udarea fiecărei plante. Arbuștii de *L. barbarum* L. au o dezvoltare relativ rapidă, intrând pe rod într-o perioadă de 1-3 ani din momentul plantării, această valoare fiind diferită în funcție de varietatea folosită, stadiul de dezvoltare al plantei în momentul plantării/transplantării sau condițiilor pedoclimatice. Pentru o mai bună dezvoltare și valorificare a fructelor de goji (ce se recoltează, de regulă, manual) este recomandată efectuarea unor tăieri de întreținere. Astfel, este bine să se facă tăieri de îndepărtare a ramurilor neproductive sau a celor care cresc prea mult pe verticală, în acest mod, se va încuraja obținerea unei producții mai mari pe ramurile ce cresc în lateral [279]. De asemenea, este bine să se împiedice atingerea solului de către ramuri, între acestea și pământ fiind recomandabil să existe măcar 30-40 cm [274].

Înălțimea arbuștilor este de maxim 2 m, fiind bine ca arbustul să nu fie lăsat să se dezvolte mai mult de atât în înălțime. Tăierile de întreținere pot fi efectuate pe tot parcursul anului, însă cele mai importante sunt recomandate a se efectua pe timp de iarnă. Lucrări de întreținere pot fi cele de protejare împotriva dăunătorilor sau a buruienilor. Protecția ecologică împotriva buruienilor poate

fi făcută prin prășit manual sau mecanic în funcție de tipul de cultură (ecologică/convențională), densitatea buruienilor, suprafața terenului cultivat și alte tehnici similare [138].

**Caracteristici ecologice.** Pentru început, este bine de amintit faptul că, în unele țări (printre care se numără și R. Moldova), *Lycium*-ul este considerat o plantă potențial invazivă, astfel, cel care cultivă aceste plante trebuie să dețină informații cu privire la aceste probleme, mai ales din cauza faptului că semințele de goji pot fi ușor propagate de către păsări sau alte animale care le consumă. Potențialul invaziv al speciei este explicat de unii autori prin faptul că, plantele drajonează ușor, ocupând frecvent spațiile deschise din habitat, de asemenea, ea reușește să se adapteze bine diferitelor schimbări sezoniere. Deseori cultivată în garduri vii, se înmulțește repede prin lăstari, devenind în multe locuri subsontană și formând uneori adevărate mărăcinișuri [137, 288]. De asemenea, și unii specialiști americani consideră faptul că *Lycium*-ul, datorită caracterului său nepretențios, poate deveni invaziv sau poate fi considerat o buruiană în cazul în care nu este îngrijit corespunzător. Totuși, trebuie menționat faptul că aceste afirmații sunt valabile mai mult pentru plantele necultivate, aflate pe terenuri neîngrijite, soiurile înalt-calitative neavând tendințe pronunțate de drajonare [139]. Deși nu este recomandată înființarea de culturi de goji cu destinație comercială pe terenuri contaminate cu metale grele sau cantități mari de pesticide, este bine de știut că specia este rezistentă la poluare [146].

Plantele tolerează bine solurile cu o salinitate crescută datorită mecanismului lor de modificare a grosimii stratului de glico-proteine din peretele celular al frunzelor, ca răspuns la stresul salin. În China, unele studii au ajuns la concluzia că această plantă este eficientă și în reconversia terenurilor agricole în zone împădurite, mai ales în regiunile montane joase. Similar, LB este descris și ca având rol de fixare a solului. Mai mult, el poate acționa și ca barieră ecologică (în Anglia este folosit și pe post de gard viu) [228].

**Boli și dăunători.** Nivelul cunoștințelor cu privire la agenții patogeni și dăunătorii speciei *L. barbarum* L. este destul de limitat, dat fiind faptul că această specie este introdusă relativ recent în cultură, în țările vestice. Cel mai adesea, bolile și dăunătorii nu apar din primul an de la înființarea culturilor. Printre dăunătorii semnalati pot fi amintiți: afidele, insecte din ordinul *Thysanoptera*, omizi [186], gândacul japonez (*Popillia japonica*), cicade sau musculița *Drosophila suzukii* Matsumura [17]. Plantele de goji (mai ales fructele) s-au dovedit a fi atrăgătoare și pentru iepuri, păsări sau câprioare. Nu în ultimul rând, au fost consemnate și infestații cu specia de acarieni *Aceria kuko* (Kishida) [147]. S-au semnalat și atacuri ale diferitor boli și agenți patogeni precum: făinare, alternarioză (*Alternaria* sp.), septorioză (*Septoria* sp) și antracnoză (ce poate compromite >80% din cultură) [126]. Pentru prevenirea dăunătorilor se recomandă folosirea unor metode cât mai puțin poluante pentru mediu și cât mai diversificate, fiind încurajată combaterea integrată a bolilor și a

dăunătorilor prin îmbinarea mijloacelor chimice ecologice cu cele biologice, bio-tehnice, fizico-mecanice (culegerea fructelor căzute sau stricate, arderea plantelor bolnave), a feromonilor însă lista poate continua [243].

Cultivarea speciilor bacifere în R. Moldova trezește un interes sporit din partea agricultorilor, fructele au o importanță economică deosebită și necesită măsuri și acțiuni prioritare de creștere ecologică a plantelor.

### **1.5. Microînmulțirea plantelor horticole *in vitro* – baza teoretică și utilizarea practică**

Înmulțirea *in vitro* a plantelor are toate șansele să devină o tehnologie populară în viitor întrucât determină obținerea unui număr ridicat de plante sănătoase. Micropropagarea *in vitro* constituie o metodă de înmulțire vegetativă modernă, cu o rată superioară de multiplicare a plantelor, comparativ cu metodele convenționale (butășire, marcotaj, altoire). Metodele de înmulțire biotehnologice constau în obținerea unor plante noi, cu caracteristici similare plantelor mamă, sănătoase și de o calitate superioară, pornind de la țesuturi meristematice ale căror dezvoltare are loc *in vitro*, după o prealabilă sterilizare și într-un mediu aseptice. Plantele obținute *in vitro* au o rădăcină mult mai puternică, cu tulpină viguroasă, sănătoasă, rezistentă la dăunători și boli. Metoda folosește explante vegetale de proveniență diferită: țesuturi meristematice, organe (muguri, minibutași, antere, ovare), celule de calus sau celule regenerare din protoplaști [102, 116].

Micropropagarea se bazează pe totipotența celulei vegetale, însușirea celulelor vegetale de a se divide, de a se reproduce și de a forma o plantă identică cu planta mamă. Teoretic fiecare celulă vie este totipotentă, însă practic s-a observat că nu toate celulele au capacitatea de a-și exprima acest caracter, datorită pe de o parte diferențierii celulare și îmbătrânirii, iar pe de altă parte gradului mare de specializare al acelor celule. Astfel, s-a demonstrat că la planta matură, celulele specializate care constituie țesuturile (traheidele, fibrele libero-lemnoase, sclereidele lipsește citoplasma și nucleul) nu sunt totipotente. Acest aspect este explicat chiar prin faptul că întreaga informație genetică a celulei totipotente se află în cromozomii din nucleu [239]. Meristemele sunt zonele generatoare de celule necesare creșterii în lungime și grosime a plantelor, fiind dispuse terminal atât în tulpină cât și în rădăcină [101].

#### **Factorii care influențează procesul de morfogeneză și regenerare în cultură *in vitro*.**

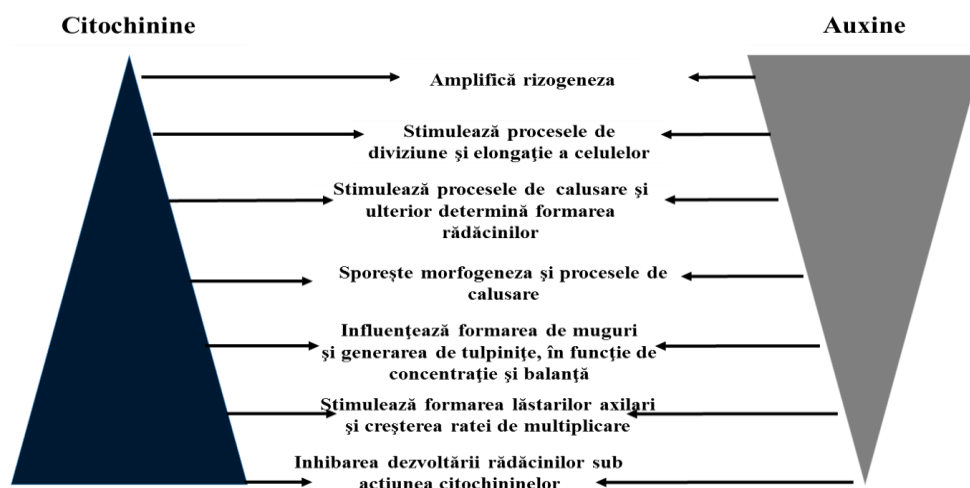
Tehnicile de cultură *in vitro* folosite în cercetare sau pentru producerea de plante, pornesc de la aceeași premiză: posibilitatea de a controla într-un mod optim factorii de mediu (temperatură, lumină, compoziția mediului de cultură, pH, umiditate) necesari fragmentului de plantă inoculat în condiții artificiale de mediu, în încercarea de a analiza funcțiile sale fiziologice sau de a conduce

într-o anumită direcție, cum ar fi formarea de noi lăstari (micropropagarea) [45,125]. Tehnicile de cultură *in vitro*, pe lângă aspectul tehnologic, ne permit rezolvarea unor probleme [71,72]:

- ✓ menținerea unui explant viabil și activ din punct de vedere vegetativ;
- ✓ determinarea proceselor de diferențiere în cazul unor fragmente de calus pentru formarea de organe sau embrioni somatici;
- ✓ inducerea proceselor de dediferențiere, în cazul unor explante formate din celule diferențiate (fragmente de tulpină, frunză, pețiol, rădăcină ș.a.) rezultând o nouă organizare tisulară;
- ✓ stimularea proceselor de diviziune celulară.

Aceste probleme au fost parțial rezolvate odată cu identificarea regulatorilor de creștere endogeni de tipul auxinelor (primul grup de fitohormoni recunoscut), giberelinelor, citochininelor, pentru a numi doar cele trei clase principale de regulatori de creștere. Aceste substanțe par a determina orientarea dezvoltării celulelor în cultura artificială, fapt pentru care li se acordă prima atenție atunci când se încearcă explicarea unor fenomene fiziologice [75, 210]. Cei mai importanți regulatori de creștere exogeni din cultura țesuturilor sunt citochininele și auxinele.

Van și Varshney au constatat un efect de reglementare comun al acestor substanțe asupra morfogenezei în cultura calusului tutunului. Autorii studiului au observat că formarea de organe depinde de raportul dintre regulatori de creștere. În timpul experimentului, au remarcat că un nivel ridicat de auxine în raport cu citochinine, duce la dezvoltarea rizogenezei, și invers, concentrațiile sporite de citochinine în raport cu auxinele determină formarea de plantule (tulpinițe) [211]. Miller (1957) a prezentat conceptul său, conform căruia un anumit tip de organogeneză poate fi indus prin schimbarea raportul dintre auxine și citochinine în mediul de cultură (Figura 1.6) [209].



**Fig. 1.6. Efectul conținutului de citochinine și auxine asupra proceselor de creștere și morfogeneză din cultura *in vitro***

Această teorie a generat numeroase studii, care descriu influența regulatorilor de creștere asupra morfogenezei plantelor dicotiledonate și monocotiledonate în cultura *in vitro*. Fitohormonii,

fitoregulatorii sau substanțele reglatoare de creștere sunt compuși organici utilizați în cantități mici cu rol de a stimula, inhiba sau controla procesele fiziologice de creștere și dezvoltare. Există fitohormoni endogeni, sintetizați de plante și fitohormoni exogeni sau de sinteză. Țesuturile *in vitro* nu sunt capabile să-și sintetizeze întreaga cantitate de fitohormoni care au nevoie, fiind necesară adăugarea lor în mediul de cultură pentru a asigura o bună creștere a explantelor.

**Auxinele** – sunt sintetizate în partea aeriană a plantelor în muguri, frunze, fructe tinere și mugurii floralii de unde circulă în toată planta. Sunt utilizate pentru reglarea proceselor de morfogeneză alături de citochinine. Auxina naturală descoperită este AIA (acidul indolilacetic) care se produce și prin sinteză pe cale industrială. Cele mai folosite auxine de sinteză sunt: IBA (acidul 3 indolil butiric); ANA (acidul naftilacetic); 2,4D (acidul 2,4 diclorfenoxiacetic); ANA (acidul beta naftoxiacetic) [55, 75, 169, 305]. Acțiunea auxinelor este foarte complexă datorită interacțiunii pe care o au cu alte substanțe reglatoare și intervenției asupra unor procese fiziologice. Rolul auxinelor este de a: stimula diviziunea celulară, influența alungirea celulelor prin mărirea plasticității peretelui celular și modifica permeabilitatea membranelor plasmactice pentru apă și ioni care inhibă formarea embrionilor somatici în suspensiile celulare [70, 75, 168]. Cel mai des se întrebuințează auxinele ANA și 2,4D care sunt mai stabile, nu se oxidează în prezența luminii. Pentru inducerea, creșterea calusului și rizogeneză este utilizată 2,4D. La calus asigură friabilitate mare ușurând separarea calusului pentru cultura de suspensii celulare și în embriogeneza somatică [182, 218, 223, 224].

**Citochininele** - sunt substanțe ce se găsesc în cantități relativ ridicate în fructe și semințe, iar ca structură au la bază adenina și un nucleu purinic. Prima citochinină izolată a fost chinetina, experimentată cu succes la culturile *in vitro*. La scurt timp s-a sintetizat benzil aminopurina (BAP). În prezent se folosesc pentru culturile de țesuturi patru citochinine dintre care două naturale (2 iP și zeatina) și două de sinteză (kinetina și BAP) [132]. Efectul fiziologic al citochininelor constă în: acționarea asupra diviziunii celulare alături de auxine; stimularea formării mugurilor adventivi și de calus; stimularea formării lăstarilor laterali; stimularea sintezei proteice și inhibarea formării rădăcinilor [11, 115, 177]. Biosinteza citochininelor endogene are loc în rădăcini și în embrioni, iar migrarea este dependentă de cea a glucidelor. Sunt substanțe termostabile suportând ușor autoclavarea. Unii autori au concluzionat că fitohormonii orientează procesele de dezvoltare *in vitro*. De exemplu, tipul de morfogeneză dintr-o cultură depinde de concentrațiile auxinelor și citochininelor și de raportul dintre aceste categorii de fitohormoni [54]. De asemenea, o valoare mare a raportului auxină/citochinină favorizează rizogeneza, embriogeneza și calusogeneza, iar o valoare mică - proliferarea mugurilor axilari și organogeneza, directă sau indirectă [173, 175, 176]. Autorii au constatat că, la unele specii horticoale, lăstărirea axilară este favorizată de prezența auxinei

în cantități ce depășesc nivelul citochininei, formarea calusului fiind indusă numai de auxine [46, 140].

### **1.6. Particularitățile micropropagării și înmulțirea *in vitro* a speciei *Lycium barbarum* L.**

Datorită importanței acestei culturi, în special al fructului, din punct de vedere nutrițional este important să se asigure furnizarea continuă a materialului săditor în decursul întregului an cu astfel de produse pe piața de desfacere, ce poate fi susținută preponderent prin culturi intensive. Din aceste considerente a crescut foarte mult interesul pentru culturile de țesuturi vegetale, tehnică ce este considerată o metodă alternativă înmulțirii plantelor prin metodele clasice (generative sau vegetative). Pentru depășirea problemelor apărute în înmulțirea clasică a arbustului goji, după introducerea în cultură, o serie de autori au pus la punct diferite tehnici de microînmulțire *in vitro* precum: organogeneza directă [32, 35, 38, 64, 93] și organogeneza indirectă [61, 94, 155]

Procesul de micropropagare a speciilor genului *Lycium* pentru prima dată a fost descris de Ratushnyak și colab. (1997) obținând cultura de protoplaști și folosind ca explante grăuncioare de polen [166, 230], care ulterior a fost practicat și completat prin numeroase cercetări de alți autori [158]. În contextul studiilor analizate, putem menționa că, cercetările s-au rezumat la stabilirea metodologiei de microînmulțire, folosind ca explante inițiale meristeme din semințe, mugurii apicali sau laterali și limb foliar. Alegerea cu grijă a tipului de explant, naturii și a stadiului de dezvoltare a acestuia este important, deoarece determină frecvența de inducere a calusului și tipul de morfogeneză.

Cultura de țesuturi aplicată la arbustul goji s-a dovedit a fi o cale eficientă și rapidă de obținere a materialului săditor și în R. Moldova [263]. Această tehnică este utilizată în special când materialul biologic micropropagat este bine selectat și lipsit de virusuri [8, 265]. Micropropagarea arbustului goji implică fragmentarea lăstarilor proliferați din mugurii apicali și axilari. Lăstarii se înrădăcinesc pe medii speciale nutritive de inducere a rizogenezei. Această tehnică este o metodă eficientă pentru proliferarea rapidă și evită variația somaclonală [9]. În literatura de specialitate lucrările privind multiplicarea *in vitro* la această specie, prin procedee clasice de minibutășire prin culturi de fragmente de lăstari, sunt limitate. Totuși, lucrări științifice de multiplicare *in vitro* la arbustul goji, au fost dezvoltate de cercetători [30, 38, 60, 61, 93, 94, 134, 153, 155, 185] cu aplicarea unui șir de medii nutritive în scopul optimizării lor pentru declanșarea procesului de morfogeneză și calusogeneză.

Cercetările efectuate prin *organogeneză indirectă* unde din calusul derivat din fragment de lăstar se obțin meristemoizi, care dau naștere la plantule noi. Cel mai eficient mediu pentru multiplicarea lăstarilor a fost mediu MS suplinit cu regulatorii de creștere BAP (0,3 mg/l) și 2,4D

(0,3 mg/l). Pe acest mediu s-a observat o creștere de 100% a lăstarilor. Însă cel mai eficient mediu pentru creșterea numărului de lăstari este mediu MS suplinit cu citochinina KIN. Dezvoltarea rizogenezei (90%) (5 rădăcini la lăstar) a fost observată pe mediu MS suplinit cu regulatorii de creștere IBA (0,4 mg/l) și IAA (0,4 mg/l). Cel mai mic procentaj de regenerare s-a obținut pe mediu MS cu regulatorii de creștere KIN (0,4 mg/l) în combinație cu IAA (0,2 mg/l) [154].

*Organogeneza directă* după Osman N. și Silvestri C. [155, 185] au pus la punct un protocol eficient de micropropagare la soiul 'Ning Xia N1' pe mediu MS solid și lichid suplinit cu regulatori de creștere, în special BAP în diverse concentrații, de 0,5-3,0 mg/l și auxine (AIB sau ANA) în concentrații mici, GA<sub>3</sub> și zaharoză 3%. Pentru înrădăcinare s-au testat de obicei medii nutritive cu auxine sau fără regulatori de creștere obținându-se rate de multiplicare mari în medie 6,73 lăstari / explant cu o medie 7-9 noduri. Înrădăcinarea *ex vitro*, efectuată prin fixarea într-o soluție apoasă de IBA 100 mg/L, este tehnica preferată pentru că se obține o rată de înrădăcinare și aclimatizare înaltă [95]. Un alt mediu utilizat în special pentru cultivarea explantelor provenite din semințe de la *Lycium barbarum* este mediul Gamborg (B5). Caracteristic pentru el este conținutul mai redus de N, microelemente ca Fe, Mn, Zn în comparație cu MS, pe când conținutul de K este mai ridicat, ceea ce duce la reglarea sporită a permeabilității membranelor celulare [13, 183].

Pentru cultivarea *Lycium-ului* în condiții *in vitro* au fost utilizate și alte medii ca: WPM (Lloyd & McCown, 1980), LQ (Quoirin&Lepoivre, 1977), Nitsh (Nitsch&Nitsch, 1969), și DKW (Driver&Kuniyuki, 1984), unde cel din urmă suplimentat cu BAP 0,5 mg/l, s-au obținut cele mai bune rezultate comparativ cu celelalte medii bazale testate [185]. Protocoale eficiente de multiplicare *in vitro* prin organogeneza directă au fost efectuate și de către cercetătorii români [62] pe mediul Murashige & Skoog 1962. Concentrații diferite de BAP 0,2 și 0,5 mg/l, unde mediile au fost gelificate cu 50 g/l amidon și pH ajustat la 5,8 au favorizat o rată înaltă de multiplicare după un ciclu de cultură de 2 luni cu un rezultat de 17 lăstari/vas și o lungime de 3-4 cm. O altă metodă de înrădăcinare *in vitro*, urmată de aclimatizarea *ex vitro* în hidrocultură prin flotație sau înrădăcinarea directă *ex vitro*, minibutașii rezultați s-au plantat în pastile Jiffy7 a lăstarilor axilari regenerați din faza de multiplicare, caz în care procentele de înrădăcinare sunt de peste 90 % [30, 63]. O deosebită importanță trebuie acordată momentului transferării plantulelor din condițiile *in vitro*, în condiții naturale de viață, precum și modului în care se realizează această trecere, respectiv realizării unei acomodări treptate a neoplantulelor, la condițiile mediului septic. Șansele de supraviețuire sunt determinate de pierderile prin transpirație, datorită lipsei stratului de ceară și a activității aproape inexistente a stomatelor [12, 174].

Anterior transferării, plantulele trebuie călite la un regim de viață mai sărac în umiditate. S-a observat că reducerea umidității relative la 80% față de maximum cât este recomandat la unele

specii, este suficientă pentru a asigura formarea stomatelor funcționale și acoperirea cu un strat de ceară pentru asigurarea reducerilor pierderilor de apă. Pentru etapa *ex vitro* cel mai des sunt utilizate diferite tipuri de palete cu turbă sau mixuri (perlit, sol de gazon, turbă, vermiculit) utilizându-se individual sau amestecuri în diferite proporții [7]. Faza de *ex vitro* de obicei are loc în camere de cultivare, sere. Examinând datele din literatura de specialitate putem conchide, că studiul privind elaborarea tehnologiei de micropropagare a unor soiuri de goji și studiul anatomic-biochimic în condițiile pedoclimatice ale R. Moldova a produselor vegetale sunt de perspectivă și prezintă interes și aplicabilitate pentru agricultura țării noastre.

Obiectivul principal al acestor cercetări este, de a obține material săditor de calitate prin micropropagare ce va contribui la fortificarea genofondului GBNI (crearea colecției cu arbuști fructiferi), care ar contribui esențial la valorificarea de noi surse de materie primă vegetală pentru sectorul agro-alimentar.

## 1.6. Concluzii la capitolul 1

Analiza surselor de specialitate denotă interesul față de arbustul goji care devine tot mai popular în calitate de aliment în ultimii ani la nivel național și internațional, astfel:

1. Cultivarea arbustului goji este eficientă, atât din punct de vedere alimentar, economic cât și terapeutic. Fructul însumează numeroase proprietăți terapeutice, datorită unui conținut bogat de compuși biologic activi: polizaharide (6 tipuri de monozaharide), carotenoide, compuși fenilpropanici, flavonoide, taninuri, vitamine (tiamina, riboflavina, acidul ascorbic), acizi organici (citric, malic, fumaric), minerale (potasiu, magneziu, calciu, fier, fosfor);

2. Datorită multiplelor caracteristici goji prezintă un interes economic pentru R. Moldova, fapt ce duce la necesitatea punerii în evidență a particularităților de creștere dezvoltare și multiplicare a speciei date, utilizând diverse metode și tehnici moderne, în special cultura *in vitro*;

3. Metodele tradiționale de înmulțire a acestei culturi nu sunt rentabile și efective, astfel apare necesitatea aplicării unor metode noi, moderne ce ar facilita și eficientiza acest proces. Sporirea randamentului de obținere a materialului săditor va fi posibil prin realizarea obiectivelor ce țin de introducerea în cultura *in vitro* a speciei date, ce va permite dintr-un material biologic redus de a căpăta numărul necesar de exemplare libere de agenți patogeni, într-un timp relativ scurt;

4. În contextul studiilor analizate, se poate menționa că cercetările inițiate pentru prima dată în R. Moldova vor contribui esențial la valorificarea noilor surse de produse alimentare pentru sectorul horticul cu caractere economice valoroase.



## 2. OBIECTUL DE STUDIU ȘI METODELE DE CERCETARE

Activitățile experimentale realizate în scopul elaborării tehnologiei eficiente de micropropagare a speciei *L. barbarum* L. pentru producerea de material săditor și estimarea particularităților morfologice a soiurilor cultivate au fost realizate în cadrul Laboratorului Embriologie și Biotehnologie al Grădinii Botanice Naționale (Institut) "Alexandru Ciubotaru".

Investigațiile prin metode biochimice a taxonilor studiați, au fost realizate în Laboratoarele Farmacognozie și Botanică farmaceutică, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie "Nicolae Testemițanu" și Biochimia plantelor, Institutul de Genetică, Fiziologie și Protecția Plantelor, în decursul anilor 2016-2019. Au fost aplicate protocoale standard, promovate de literatura de specialitate, cu unele modificări, fiind optimizate și perfecționate în funcție de specificul obiectivelor de studiu.

Cercetările prezentate au fost realizate în cadrul proiectului instituțional 15.817.02.26A (2015-2019) "„Fundamentarea științifică privind elaborarea tehnologiilor de înmulțire in vitro a speciilor valoroase de interes economic pentru R. Moldova”, cu continuarea investigațiilor în proiectul de cercetare și inovare din cadrul Programelor de Stat 2020-2023 (20.80009.7007.19) „Introducerea și elaborarea tehnologiilor de cultivare convenționale și microclonale a speciilor de plante lemnoase noi”.

### 2.1. Caracteristica materialului de cercetare

**Obiectul de studiu, caracteristica generală.** În calitate de material biologic au servit soiurile de goji: 'Ning Xia N1', 'Erma', 'New Big', 'Amber Sweet', 'Licurici' și arbuștii de *L. barbarum* L. (cățina de garduri) din flora spontană a R. Moldova. Cultivarele studiate prezintă următoarele caracteristici:

▪ **'Ning Xia N1'** - considerat cel mai productiv soi, obținut de către cercetătorii din China în anul 2007. Arbust fără spini, cu creștere rapidă/viguroasă intră în rod din primul an în care este plantat față de soiurile mai vechi care încep să fie productive după 3-5 ani. Arbuștii acestui soi sunt mai rezistenți la boli și dăunători și mai bine adaptați condițiilor aspre de mediu (soluri foarte alcaline cu un pH > 9, episoade de secetă sau udare excesivă) față de cultivarele mai vechi, lăstari lungi (3-4 m). Producția pentru arbuștii de 3 ani este de 11,8 t/ha de fructe proaspete cu greutate medie de 1,29 g [96];

▪ **'Erma'** - soi de goji, omologat în 2017 de către cercetătorii din România, Stațiunea de Cercetare Horticolă Cluj-Napoca. Fructele sunt roșii, sferice, cu dimensiuni de 0,8-1,2 cm în lungime și 0,6-1 cm în diametru [316];

▪ **'New Big'** – soi obținut în Polonia, anul 2013, cu fructe mari alungite de culoare roșu-intens, diametru 1 cm, până la 2 cm lungime, mai dulci decât alte soiuri. Fructifică în iulie-noiembrie. Necesită suporturi de susținere ale plantei. Înălțimea atinge de la 2,5 m până la 3 m. Preferă locuri însorite, rezistent la îngheț. Acesta se caracterizează prin fructe de mărime mare, foarte pretabile uscării [315];

▪ **'Amber Sweet'** - cultivar nou, obținut de către cercetătorii Centrul de Cercetare (Źródło Dobrych Pnaczy) în Polonia 2016. Fructele sunt de culoare galben chihlimbar, diametru 1,5 și lungimea 2-2,5 cm. Planta începe să dea roadă după 2-3 ani de la plantare. Maturarea fructelor din august până în noiembrie. Înflorire în iunie-august. Poate fi cultivat fără suporturi. Crește destul de repede, atinge o înălțime de 2-2,5 m. Are o creștere anuală de 0,5-1 m. Preferă locurile însorite. Soiul este rezistent la îngheț [312, 314];

▪ **'Licurici'** - soi ameliorat de către cercetătorii științifici, în cadrul Laboratorului de Embriologie și Biotehnologie al GBNI. Fructele sunt roșii - portocalii, oblonge sau cilindrice cu dimensiuni de 1,8-2 cm în lungime și 7-9 mm în diametru. Cărnoase și dulci, fructele acestui cultivar se pretează foarte bine consumului în stare proaspătă.

Soiurile de goji utilizate în cercetările la nivel biotehologic, fenologic, histologic și biochimic au fost grupate după cum urmează:

- cercetările de micropropagare *in vitro*, aclimatizarea materialului vegetal, pentru soiurile: 'Ning Xia N1', 'Erma', 'New Big', 'Amber Sweet' și 'Licurici';
- măsurători fenologice/biometrice cu privire la: creșterea în înălțime a plantelor, lungimea, numărul lăstarilor și numărul total de frunze pe planta de pe lotul experimental al GBNI cu soiurile de goji 'Ning Xia N1', 'Erma' și 'Licurici';
- studiu fitochimic și anatomic a soiurilor cultivate 'Ning Xia N1', 'Erma' și 'Licurici' comparativ cu frunzele și fructele plantei din flora spontană;
- analize statistice de prelucrarea datelor.

## 2.2. Metode de cercetare

În continuare sunt descrise pe scurt metodele aplicate atât în micropropagarea și microclonarea soiurilor de goji cât și stabilirea particularităților de creștere și dezvoltare a lor în condițiile R. Moldova, care sunt dependente și diferă în funcție de scopul fiecărei etape de studiu.

## Metode biotehnologice

Metodele ce pot fi utilizate în scopul multiplicării *in vitro* la specia *L. barbarum* L. sunt numeroase și variate, atât din punct de vedere al obiectului de studiu, cât și în ceea ce privește complexitatea tehnică și metodologică.

**Tehnici de sterilizare a veselei, mediilor de cultură și materialului vegetal.** Asepsia perfectă atât a materialului biologic cât și a mediului de cultură se desfășoară în cinci zone distincte: de preparare a mediilor nutritive, de inoculare a explantelor, de micropropagare și microbutășire, de creștere a culturilor *in vitro* și zona de aclimatizare a plantelor obținute prin culturi *in vitro* [247].

**Sterilizarea veselei și mediilor de cultură.** Asepsia inventarului, încăperilor, boxelor, echipamentului, este o condiție obligatorie a reușitei unei cultivări *in vitro* [206]. Nerespectarea asepsiei duce la creerea unui mediu favorabil pentru dezvoltarea diferitor microorganisme ca: ciuperci, bacterii ș.a. Astfel, apare necesitatea de a introduce anumite mijloace de sterilizare. În dependență de obiectul sterilizat procedura s-a efectuat utilizând:

- *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 ulterioară 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 (sterilizarea materialului inițial);*
- *sterilizarea cu ajutorul razelor UV, necesară pentru nișă cu aer laminat și încăperea aseptică unde se derulează activitatea de inoculare și transfer a materialului vegetativ.*

În calitate de vase s-au utilizat: vase de sticlă cu volumul de 50 ml, retorte conice, eprubete biologice cu baza plată/rotundă și cutii Petri. Pentru pregătirea propriu-zisă a mediilor s-a folosit: baloane Erlenmeyer, Bunzen, cilindre, baloane și pahare cotate, pipete. Vasele chimic spălate s-au trecut prin apă distilată și s-au sterilizat prin expunerea la aer uscat fierbinte, la temperatura 180°C timp de 2-3 ore în etuvă. Mediile de cultură sunt repartizate în vase, acoperite cu foliole de aluminiu și se autoclavează la 120°C timp de 15-20 min [247].

**Sterilizarea încăperii aseptice și a hotei.** Timp de 2-3 ore, perimetrul din zona aseptică și inclusiv zonele de acces a fost sterilizat prin iradiere cu radiație UV. Paralel s-a efectuat și sterilizarea îmbrăcămintei și a instrumentelor de lucru amplasate în interiorul boxei. În cazul transferului materialului prin intermediul hotei, sterilizarea s-a efectuat cu raze ultraviolete timp de 1 oră minimum și apoi s-a dezinfectat toată suprafața cu alcool etilic de 96%.

***Sterilizarea instrumentelor de lucru și mediului de cultură.*** După o sterilizare prealabilă în etuvă timp de 2 ore și o prelucrare cu raze UV, 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 la flacăra spirtierii, ori de câte ori se finalizează o acțiune și începe alta. Imersarea s-a făcut în alcool de 95% [303, 308].

Mediul de cultură se sterilizează la presiunea de 0,75-1 atm, temperatura 110-120 °C în decurs de 15 minute pentru eprubete și retortemici de 25-50 ml. La sterilizarea mediului presiunea din autoclav nu trebuie de mărit mai mult de 1 atm, pentru că poate duce la distrugerea glucidelor și altor componente termolabili ai mediului. Mediul de cultură se sterilizează în aparatul Vapormatic 770 sau prin fierbere la 121 °C în decurs de 20 minute. În autoclav nu se recomandă de a diminua brusc presiunea, mai bine zis nu trebuie de deschis robinetul în întregime, deoarece asta poate duce la fierberea mediului de cultură, udarea dopurilor, iar uneori și la aruncarea lichidului din eprubete și baloane din cauza schimbării bruște a presiunii. Dopurile pentru eprubete și baloane cu mediu sunt autoclavate din timp. Nu s-au folosit dopuri de cauciuc, care pot duce la asfixierea țesutului [240].

***Sterilizarea materialului vegetal.*** Materialul biologic utilizat pentru micropropagarea soiurilor de goji în cultura *in vitro* a constituit meristemele apicale, meristeme apicale ale lăstarilor laterali, deoarece prezintă cea mai mică rată de infectare cu agenți patogeni, și fragmente de limb foliar și pețiol.

Toți inoculii au provenit de la plantele din teren deschis care ulterior au fost sterilizate conform metodelor optimizate în laboratorul de Embriologie și Biotehnologie al GBNI și metodelor descrise în literatura de specialitate [245, 247, 268]. Pentru obținerea unor plantule viguroase în cultura *in vitro* explantul prelevat trebuie să fie caracterizat printr-un anumit echilibru biochimic, planta donor să fie în stare fiziologică bună (fără boli și dăunători) [264].

***Compoziția și prepararea mediilor de cultură.*** Pentru cultivarea speciei *L. barbarum* L. *in vitro* s-au testat mai multe medii de cultivare. În acest scop au fost testate următoarele tipuri de medii nutritive pentru: inițierea culturii; micropropagarea; obținerea organogenezei din calus și mediu pentru inițierea rizogenezei (Tabelul. 2.1). Procesele de dezvoltare a plantei în cultura *in vitro* sunt dirijate în special de regulatorii de creștere utilizați în mediu.

În dependență de concentrația auxinelor și a citochininelor precum și a raportului dintre aceste categorii de hormoni depinde tipul de morfogeneză obținut. Favorizarea procesului de organogeneză fie directă sau indirectă are loc în cazul conținutului scăzut de auxine, pe când calusogeneza, rizogeneza s-a obținut prin mărirea conținutului de auxine și micșorarea de citochinine [246].

Pornind de la faptele menționate mai sus, au fost testate un șir de medii nutritive, care se deosebesc după raportul auxină/citochinină.

**Tabelul 2.1. Medii suplinite cu regulatori de creștere utilizate pentru inducerea morfogenezei**

Etapele culturii <i>in vitro</i>	Mediu de baza, 100%	Regulatori de creștere, (mg/l)	Tipul de explant utilizat
Inițierea culturii	MS modificat, agarizat B5 modificat, agarizat	BAP-0,1;0,2	meristem apical meristem apical cu primordii foliare
Mediul pentru micropropagare	MS, agarizat	Citochinine: BAP - 0,5; 0,7; Kin - 0,3; 0,5.	fragment apical fragment bazal
Mediul pentru obținerea masei calusare	MS, agarizat	Auxină: 2,4D – 0,1; 0,3 Citochinine: BAP - 0,2; 0,4;	fragmente de frunză; fragmente de pețiol.
Mediul pentru stimularea alungirii lăstarului și rizogeneză	MS, agarizat MS, lichid	Giberilină: GA <sub>3</sub> – 0,1 Auxine: AIB - 0,1 ANA – 0,1 AIA – 0,1	fragment apical fragment bazal

Pentru procesele de morfogeneză și organogeneză a plantelor, mediul de bază utilizat în cultura *in vitro* este Murashige Skoog 1962. Acest mediu se caracterizează printr-o concentrație ridicată de săruri [298, 300].

**Compoziția mediului.** Una dintre cele mai importante etape ale acestei tehnologii constă în alegerea și prepararea mediului de cultură adecvat. Mediul de cultură conține componente esențiale: compuși anorganici (apă, săruri anorganice), compuși organici, sursă de carbon organic, surse de azot organic, vitamine, fitohormoni și agent de gelificare (agar). În procesul de organogeneză conținutul de auxine trebuie să fie mai scăzut decât cel de citochinine, pe când pentru calusogeneză și rizogeneză se mărește conținutul de auxine și scade cel de citochinine [296, 298]. Astfel, în dependență de scopul propus au fost utilizate mediile descrise în Tabelul 2.2.

**Prepararea mediilor nutritive.** Pentru evitarea erorilor de aplicare a cantităților sau măsurare, în cazul substanțelor care intră în componența mediilor de cultură în concentrații de ordinul  $\mu\text{M}$  sau mM, se utilizează soluții stoc corespunzătoare fiecărei mari grupe de substanțe.

Dintre acestea, au fost realizate soluție stoc de: macroelemente, microelemente, chelat de fier, vitamine, aminoacizi și hormoni. Soluțiile-stoc au fost pregătite prin dizolvarea substanțelor chimice în apă distilată care se păstrează în sticle ermetic închise, la întuneric și temperatura de  $+5^\circ\text{C}$ . Se adaugă zaharoză, cantitățile corespunzătoare din soluțiile-stoc și se aduce totul la volumul necesar cu apă distilată.

Se ajustează pH-ul mediului 5,6-5,8, înainte de autoclavare, cu soluție de NaOH 0,1 N. Se adaugă agar 5 g/l. Se sterilizează la  $121^\circ\text{C}$  timp de 15-25 minute, în funcție de volumul vasului utilizat. Mediul se autoclavează direct în vasele de cultură [246].

**Tabelul 2.2. Componenta chimică a mediului *Murashige Skoog* (MS) și *Gamborg* (B5) [196]**

Ingrediente		Cantitatea (mg/l)	
		MS	B5
<b>Macroelemente (mg/l)</b>			
MgSO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O	Sulfat de magneziu	370	250
CaCl <sub>2</sub> x2 H <sub>2</sub> O	Clorură de calciu	440	150
KNO <sub>3</sub>	Azotat de potasiu	1900	2500
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	Azotat de amoniu	1650	-
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Ortofosfat de monopotasiu	170	-
<b>Microelemente (mg/l)</b>			
FeSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	Sulfat feros	27,8	-
Na <sub>2</sub> EDTAx2 H <sub>2</sub> O	NaEDTA	37,3	-
MnSO <sub>4</sub> x 4H <sub>2</sub> O	Sulfat de mangan	22,3	-
KI	Iodură de potasiu	0,83	0,75
CoCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	Clorură de cobalt	0,025	0,025
ZnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	Sulfat de zinc	8,6	2,0
CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O	Sulfat de cupru	0,025	0,25
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	Acid boric	6,2	3,0
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	Molibdat de natriu	0,25	0,25
<b>Constituenți organici (mg/l)</b>			
C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	Mio-inositol	100	100
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>	Acid nicotinic (niacină vitamina B3)	0,5	0,1
C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> HCl	Pirodoxină HCl (vitamina B6)	0,5	1,0
C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> ClN <sub>4</sub> OS HCl	Tiamină HCl (vitamina B1)	0,1	3,0
C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>	Glicină	2	-
C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	Zahăr alimentară	30000	30000

**Menținerea culturii de *Lycium barbarum* L. în condiții *in vitro*.** În timpul dezvoltării proceselor de morfogeneză, calusogeneză și rizogeneză au fost efectuate cercetări asupra factorilor ce influențează dezvoltarea plantei goji.

Menținerea calusului în cultură, respectiv multiplicarea acestuia cu menținerea celulelor viabile și totipotenței, necesită transferarea și subcultivarea pe medii proaspete. Astfel, periodic, la intervalul de circa patru săptămâni, calusul și plantulele au fost fragmentate și subcultivate pe medii proaspete. Fragmentarea calusului constă în divizarea inoculului și înlăturarea părților necrotizate. Pentru a testa creșterea calusului și menținerea lui în cultura *in vitro*, a fost inițiat un nou experiment, care a constat din pasarea calusului pe trei variante de medii. Această procedură s-a efectuat periodic la 3-4 săptămâni. În timpul desfășurării experiențelor au fost efectuate 5 pasaje. Au fost realizate observații asupra proceselor declanșate în perioada menționată, fiind determinați factorii, care au influențat calusogeneza și morfogeneza. Astfel, au fost înregistrați următorii indici:

- explantele cultivate pe mediile de cultură;
- explantele cu răspuns calusogenetic pozitiv;
- explante cu răspuns morfogenetic;
- frecvența calusogenezei, determinată după numărul de explante ce au format calus;

- frecvența organogenezei, estimată ca numărul explantelor ce au inițiat calus raportat la numărul explantelor.

Regeneranții obținuți au fost decupați de la suprafața calusului și transferați pe medii pentru înrădăcinare. Pentru inducerea formării lăstarilor multipli, calusul morfogenetic obținut din segmentele nodale a fost transferat pe mediul MS suplimentat cu concentrații variate în combinație cu acidul ANA, în concentrație de 0,5 mg/l. Concentrația de zaharoză utilizată a fost de 30%.

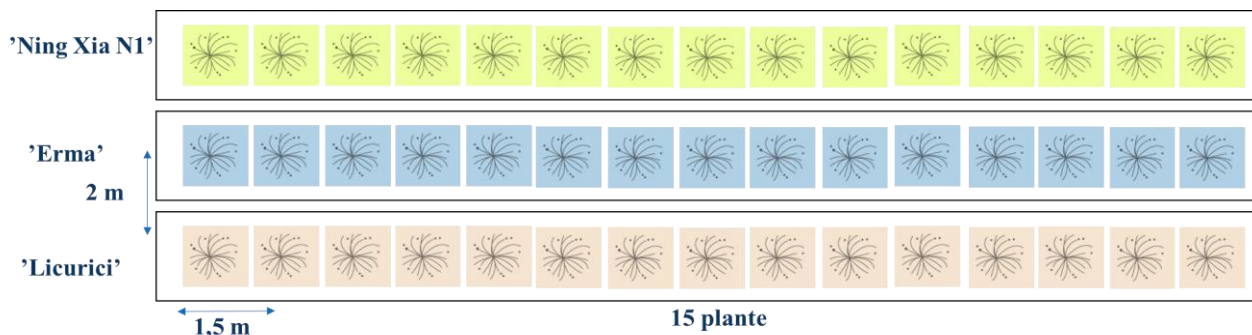
**Transferul vitroplantulelor din condițiile *in vitro* în *ex vitro*.** În condiții *ex vitro* au fost transferate plantule cu rădăcini deja dezvoltate precum și plante cu calus. Pentru transferul *ex vitro* au fost pregătite 2 tipuri de substrat: perlit și sol de gazon+turbă (2:1). Solul, perlitul și turba au fost sterilizate și autoclavate la presiunea de 210 bar, timp de 90 minute, la temperatura de 121°C în termostatul Systec DB - 150. Plantulele transferate pe mediul agarizat, au fost, cu atenție, spălate cu un get de apă pentru a înlătura agarul. Toate plantele, cât și substraturile, au fost sterilizate cu soluție de KMnO<sub>4</sub>. Containerele în partea de jos sunt găurite pentru a se scurge în afară excesul de apă. Fiecare container a fost acoperit cu folie transparentă perforată de polietilenă cu menținerea temperaturii în ceață dispersată de 22-25 °C. Plantele după necesitate au fost umezite și aerisite.

Când plantele au început să inițieze lăstari folia de polietilenă a fost înlăturată, iar plantele au fost plantate în ghivece. Substratul din ghivece a fost format din sol de gazon+turbă+nisip (1:1:0,25). Plantele au fost transferate în seră pentru adaptare iar după etapa de aclimatizare au fost plantate în teren deschis experimental. Ulterior au fost efectuate cercetări biometrice asupra plantelor din teren deschis, de un an și în anul II de vegetație.

**Înființarea minicolecției de arbuști goji.** În scopul de a diversifica colecția arbuștilor fructiferi cu cele mai valoroase și productive soiuri, în toamna anului 2016 ulterior completată primăvara în anul 2017, s-a plantat soiurile de goji precum 'Ning Xia N1', 'Erma' și 'Licurici' pe lotul experimental al GBNI.

Înființarea minicolecției de goji a fost inițiată cu selectarea terenului spre direcția nord-sud pentru crearea unui regim favorabil de iluminare și aerisire a lotului.

*Pregătirea solului și plantarea.* Plantele obținute *in vitro*, nu au fost tratamente fitosanitare, iar pe sol nu au fost aplicate substanțe fertilizatoare. Singurele lucrări efectuate au fost cele de întreținere periodică a terenului (combaterea buruienilor prin plivit și prășit). Materialul săditor, obținut din vitroculturi, a fost de 1-2 ani, cu tulpina de 40-45 cm și rădăcini bine dezvoltate și sănătoase. Distanțele de plantare sunt de 2 m între rândurile de plante și de 1,5 m între plantele de pe rând (Figura 2.1).



**Fig. 2.1. Schema amplasării soiurilor de goji în GBNI**

Plantarea s-a efectuat în teren pregătit (arat, discuit), în gropi de 40/40/40 cm. 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 3-5 l de apă la fiecare planta pe perioada lunilor de vară. Pentru susținerea plantelor, tulpinile au fost leagăte pe suporturi de lemn cu înălțime de 2,5m.

### **Metode biometrice**

Caracteristicile biometrice în cultura *in vitro* au fost studiate prin indicii: *numărul lastarilor proliferați din meristeme apicale, masă calusară și înălțimea plantulelor regenerate*, iar studiul biometric al plantelor în terenul experimental a fost realizat în perioada de vegetație 2016-2019 conform a 4 parametri morfologici: *înălțimea plantelor, numărul de ramuri pe plantă, lungimea ramurilor pe plantă și numărul de frunze pe plantă* [307].

Măsurările liniare au fost efectuate cu rigla.

### **Metode microscopice de cercetare**

Pentru examinarea la microscopul optic, au fost preparate secțiuni transversale *semifine* și *fine* ale frunzelor de *L. barbarum* L. spontan și soiurile cultivate pe preparate superficiale din material (frunze) javelizat prin metode standard de incluzionare a materialului biologic fixat pe lame port-obiect [250, 258]. Pregătirea secțiunilor transversal includ următoarele procesele de:

1. **plasare** între două jumătăți ale măduvei de soc a fragmentului zonei mediane al laminei frunzei de 15-20 mm;
2. **secționări** succesive cu lama, deasupra unui vas cu apă distilată;
3. **colectarea** celor mai fine secțiuni și fixate pe lame port-obiect acoperite cu lamele uscate și curate;
4. **examinarea** preparatului astfel pregătit la microscop.

Preparatele superficiale din material javelizat cu soluție NaOH 3% sau cloralhidrat, care pătrunde ușor în țesuturi, înlătură aerul, ulterior induce umflarea granulele de amidon și se extind. Clorofilele și substanțele albuminoase se distrug, iar țesuturile colorate devin mai deschise,



cristalele rămân fără schimbări [252]. Uleiurile grase și volatile se contopesc în picături mari, și treptat se dizolvă. Pregătirea preparatelor includ următoarele etape:

1. **fierberea** frunzelor uscate sau proaspete timp de 5-7 ore, astfel fiind supuse procedurii de diferențiere a țesuturilor în soluția de NaOH 3% sau cloralhidrat conform metodicii;
2. **fixarea** pe lame port-obiect acoperite cu lamele uscate și curate;
3. **examinarea** preparatului la microscop.

Preparatele microscopice au fost provizorii. Examinarea micropreparatelor a fost realizată la microscopul optic binocular Optica *Microscopes* (Italia) cu cameră digitală de fotografiat, cuplat la calculator. Măsurătorile au fost efectuate pe secțiuni transversale cu puterea de mărire a obiectivului x10, x40, cuplat la cameră digitală la calculator. Examenul microscopic a fost realizat în laboratorul de Embriologie și Biotehnologie al Grădinii Botanice Națională (Institut) „Alexandru Ciubotaru”.

### Metode biochimice

În calitate de produs vegetal au servit părțile aeriene (frunze și fructe) de *L. barbarum* L. din flora spontană și cultivată, recoltate în perioada de fructificare în stare proaspătă sau uscate în mod natural. Astfel, identificarea calitativă al flavonoidelor a fost efectuată prin reacții chimice specifice (soluție de amoniac, acid sulfuric concentrat, soluție de acetat de plumb bazic 25%, soluție de 1% de vanilină în acid clorhidric concentrat, acid clorhidric și zinc) [256, 276]. Taninurile au fost identificate prin reacții analitice de colorare și sedimentare (soluție de gelatină 1 %, soluție de alauni de fier și amoniu, soluție acid acetic 10% și acetat de plumb de 10%, soluție de clorură de aluminiu și cristale de nitrat de sodiu și acid clorhidric 0,1n) [245, 248].

Analiza cantitativă a flavonoidelor și taninurilor a fost efectuată prin spectrofotometrie (SM). Ulterior, s-au analizat caracteristicile biochimice ale fructelor spontane și cultivate (conținutul procentual de zahăr total, aciditate și vitamina C) prin metode de spectrofotometrie și titrimetrie.

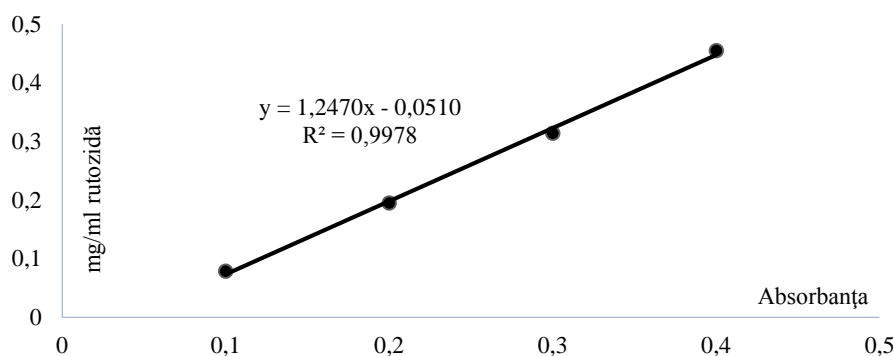
**Determinarea calitativă și cantitativă a flavonoidelor.** Flavonoidele reprezintă un grup de substanțe chimice de origine vegetală înrudite, derivați ai 2-fenilbenzopiranului (flavonului) sau 3-fenilbenzopiranului (izoflavonului), având la bază scheletul C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>. Ele constituie o mare parte din pigmenții naturali, care asigură culoarea organelor vegetale [249, 251]. Pentru efectuarea studiului calitativ din produsul vegetal se pregătește un extract alcoolic. Flavonoidele sunt foarte diverse și frecvent sunt prezente ca agliconi sau formă heterozidică, partea glucidică fiind reprezentată prin glucoză, ramnoză, arabinoză, galactoză, xiloză, acid glucuronic etc. În fructele de goji, flavonoidele se întâlnesc și ca dimeri reprezentând biflavonoide cu însușiri farmacologice [100].

Studiul calitativ și cantitativ se bazează pe caracteristicile fizico-chimice ale flavonoidelor, care chimic sunt destul de labile. Prin urmare reprezintă substanțe solide, cristalizate, colorate în nuanțe vii de diferite intensități, lipsite de gust și miros. Culoarea derivaților flavonici este datorată grupărilor cromofore  $>C=C=C<$ . Gruparea hidroxilică 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 [18, 276].

Determinarea calitativă a flavonoidelor a fost efectuată în baza extractelor hidroalcoolice. Pentru obținerea extractului a fost mărunțit 1 g de material biologic (frunze și fructe), s-a plasat într-un balon cotat de 25 ml, apoi s-a adăugat 10 ml de alcool etilic. Balonul s-a unit cu refrigerentul ascendent și s-a încălzit la baie de apă 10 minute din momentul fierberii alcoolului în balon. Soluția extractivă caldă s-a filtrat. Apoi s-a recurs la efectuarea reacțiilor de identificare chimice specifice cu: amoniac, acid sulfuric concentrat, soluție de acetat de plumb bazic 25%, soluție de 1% de vanilină în acid clorhidric concentrat, acid clorhidric și zinc [266].

Studiul cantitativ în extractele din produsele vegetale de *L. barbarum* cultivat și flora spontană s-a realizat conform recomandărilor metodice de specialitate [246, 252, 276]. Pentru aceasta a fost obținut extractul hidro-alcoolic din frunzele și fructele analizate. Pentru realizarea scopului propus am avut nevoie de pregătirea extractului. Aproximativ 1 g de produs vegetal (proba exactă) mărunțit s-a plasat într-un balon conic cu capacitatea de 100 ml, s-a adăugat 50 ml alcool etilic de 70%. Balonul conic s-a unit la refrigerent și s-a încălzit pe baie de apă fierbinte (fierbere moderată) timp de 90 minute. După aceasta balonul a fost lăsat să se răcească până la temperatura camerei, s-a cântărit, s-a adăugat alcool până la masa inițială. Extracția s-a filtrat prin vată și a fost lăsată să se răcească timp de 30 minute (*soluția I*).

Din acest amestec s-a luat 10 ml de extras obținut din produsul vegetal și s-a turnat într-un balon cu capacitatea de 25 ml și s-a adus la cotă cu alcool etilic 50%, soluția s-a agitat 2-3 min, iar după omogenizare s-a lăsat în repaus 10 minute. Filtrarea s-a efectuat prin hârtia de filtru (*soluția II*). Următorul amestec (*soluția III*) s-a adăugat un volum 5 ml *soluția II* într-un balon de 25 ml și s-a adus la cotă cu 5 ml de acetat de sodiu, 3 ml de clorura de aluminiu și alcool etilic, s-a agitat până la omogenizare. Rezultatele (absorbanta soluției de rutozidă) au fost citite cu ajutorul spectrofotometrului la o lungime de undă de 430 nm pentru *soluția III*. În calitate de lichid de compensare s-au utilizat 5 ml de soluție II, 8 ml de apă distilată și alcool etilic de 50%. 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 (Figura 2.2).



**Fig. 2.2 Curba de calibrare cu valorile absorbantei și concentrațiile de rutozidă pentru dozarea flavonoidelor în extractele vegetal**

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

$$C = h \cdot x \cdot 10 \cdot \frac{a \cdot 10}{100}$$

Unde:  $x$  - valoarea corespunzătoare absorbantei la lungimea de undă 430 nm;

$a$  - masa produsului vegetal luat pentru analiză.

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

**Determinarea calitativă și cantitativă a substanțelor tanante.** Principiul metodei de identificare a taninurilor se bazează pe reacția chimică calitativă de identificare (cu gelatină, alăuni de Fe și amoniu, soluție acid acetic și a acetatului de Pb, soluție de clorură de aluminiu cristale  $\text{NaNO}_3$  și  $\text{HCl}$  și a fost aplicată conform metodelor [260, 276]. Pentru prepararea soluțiilor în efectuarea analizei reacțiilor calitative din produsul vegetal se pregătește un extract apos. La 1 g de produs vegetal mărunțit se adaugă 100 ml de apă. Se încălzește la baie de apă 20-30 minute, se strecoară prin vată, iar extractul obținut se folosește la efectuarea reacțiilor calitative.

Determinarea cantitativă a substanțelor tanante s-a efectuat prin 3 metode, principiul metodei include 2 soluții. Pentru determinarea cantitativă a substanțelor tanante s-a luat 1,0 g produs vegetal în 100 ml apă clocotită și s-a fiert pe baie de apă timp de 30 minute. Apoi, după răcire s-a filtrat într-un balon cotat de 100 ml prin hârtie de filtru, astfel, s-a obținut *soluția 1*.

*Soluția 2* - la 1,0 g de material biologic mărunțit s-a adăugat 10 ml de etanol, s-a extras la reflux timp de 10 minute, s-a filtrat prin hârtia de filtru.

**Dozarea prin metoda titrimetrică (I metodă).** Pentru dozarea prin metoda titrimetrică s-au luat într-un balon de 2,5 ml din extractul obținut (*sol. 1*), 187,6 ml apă distilată și 6,2 ml acid indigosulfonic. S-a titrat cu soluție de permanganat de potasiu 0,1 M până la virajul culorii din albastru în galben-auriu. Formula de calcul:

$$x = \frac{(V - V_1) \cdot 0,004157 \cdot 100 \cdot 100 \cdot 100}{m \cdot V_3 \cdot (100 - \omega)}$$

în care:  $V$  – volumul permanganatului de potasiu de 0,1N luat pentru titrare, ml;

$V_1$  – 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;

$V_3$  – volumul extractului luat pentru titrare, ml.

Dozarea prin metoda permanganatometrică (II metodă) Într-un balon, s-au luat 20 ml din sol. 1 și s-a adăugat gelatină 1% în clorura de sodiu de 10%, precipitând substanțele tanante. Apoi s-a filtrat prin filtru de hârtie într-un balon cotat.

Pentru titrare s-a luat 2,5 ml soluție preparată, 187,5 ml apă distilată și 6,2 de acid indigosulfonic. S-a titrat cu permanganat de potasiu 0,1 N, la agitare intensă, până la culoarea galben – aurie stabilă.

Formula de calcul:  $x = x_1 - x_2$

unde:  $x_1$  – cantitatea totală de polifenoli;  $x_2$  – cantitatea altor substanțe.

Dozarea prin metoda spectrofotometrică (III metodă). Din extractul obținut ( $x$ ) s-au luat 5 ml de extract și s-a introdus într-un balon cotat de 50 ml. S-a adus până la cotă cu alcool etilic de 70 %, obținînd *soluția 1*. Într-un balon cotat de 25 ml s-a luat 2,5 ml de soluția 1. Apoi s-a măsurat absorbanta *soluției 2* la spectrofotometru la lungimea de undă 275 nm. Rezultatele s-au calculat după formula:

$$x = \frac{Dx \cdot Mst \cdot 100 \cdot 50 \cdot 25 \cdot 2,5 \cdot 100}{Dst \cdot Mx \cdot 5 \cdot 2,5 \cdot 50 \cdot 100}$$

în care:  $Mst$  – masa taninei, g;

$Mx$  – masa produsului vegetal, g;

$Dst$  – densitatea optică a taninei;

$Dx$  – densitatea optică a soluției de analizat.

**Determinarea cantitativă a acidului ascorbic (vitamina C)**. Principiul metodei se bazează pe proprietatea lui de a reduce 2,6-diclorfenoindofenol în mediu alcalin unde are culoarea albastră, în mediu acid unde are o culoare roșie, iar la reducere se decolorează. Reducerea are loc la interacțiunea cu acidul ascorbic. Pentru analiza cantitativă se pregătește un extract după cum urmează: la 2,5 g de produs vegetal se adaugă treptat 75 ml de apă distilată. Se macerează 10 minute, apoi se amestecă, se centrifughează și se filtrează. Într-un balon conic de 50 ml se adaugă 1 ml de soluție de 2% de acid clorhidric apoi 1 ml extract obținut și 13 ml apă. Se titrează din microbiuretă cu soluție de 0,001 N de 2,6 - diclorfenolindofenolat de sodiu până la apariția culorii roz care persistă 0,5-1 min. Titrarea se face cel mult 2 min. În cazul culorii intensive ale centrifugatului sau a filtratului ori a conținutului sporit de acid ascorbic (2,6-diclorfenolindofenolat de sodiu se cheltuie peste 2 ml) determinat prin titrarea de probă, ele se diluează înainte de titrare de 2 și mai multe ori [275, 276].

Pentru 1 ml de soluție 0,001 N de 2,6 - diclorfenolindofenolat de sodiu corespunde 0,000088 g de acid ascorbic. Conținutul procentual al acidului ascorbic ( $x$ ) în raport cu produsul vegetal uscat se calculează după formula:

$$X = \frac{V \cdot F \cdot 0,000088 \cdot V_1 \cdot 100 \cdot 100}{m \cdot V_2 \cdot (100 - w)}$$

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

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

$V_1$  – volumul extractului corespunzător probei de produs vegetal, ml;

$m$  – masa probei de produs vegetal luată pentru analiză, g;

$V_2$  – volumul extractului luat pentru titrare, ml;

$W$  – pierderea prin masă a produsului vegetal la uscare, %.

**Determinarea acidității totale titrabilă.** Metoda se bazează pe titrarea soluției de testare cu o soluție standard de 0,1 N hidroxid de sodiu în prezența fenolftaleinei [320].

S-a omogenizat 5 grame de material vegetal cu o cantitate mică de apă cu temperatura până la 80°C. Masa măcinată s-a transferat într-un balon de 100 ml, volumul extractului s-a adus la cotă cu de 50 ml apă distilată fierbinte și a fost lăsat timp de 1 oră pe baie de apă la 80°C cu agitare constantă. După timpul specificat, extractul s-a răcit și filtrat printr-o pâlnie Schott. Extractul este transferat cantitativ într-un balon volumetric, volumul este ajustat la 50 ml cu apă distilată. După omogenizare, din acest amestec s-au luat 20 ml soluție într-un balon conic pentru titrare, s-a adăugat 100 μl soluție de 1% de fenolftaleină și s-a titrat cu o soluție de hidroxid de sodiu 0,1 N, cu agitare continuă până când se obține o culoare roz care nu dispare timp de 30 secunde. Concentrația acidului citric, g/l este determinată de formula:

$$(X) = (V_1 * C * M) / V_0$$

Unde:  $V_0$  - este volumul eșantionului de probă prelevat pentru titrare, 20 ml;

$V_1$  - volum de soluție de hidroxid de sodiu, care a mers la titrare, ml;

$V_2$  – volumul la care s-a adus eșantionul, ml;

$C$  concentrația exactă de hidroxid de sodiu, (0,1 g/mol);

$m$  - greutatea probei, gr;

$M$  - masa molară a acidului citric = 64,0.

Fracția în masă a acizilor titrați calculată pe acid tartric, malic sau citric,

% - este determinată după formula:  $X1 = ((V_1 * V_2 * C * M) / (m * V_0)) * 0,1$ .

**Determinarea conținutului de zahăr total %.** Pentru a determina conținutul de zahăr total s-a pregătit o soluție de 15% glicerat de cupru. S-au luat 1,0 ml de extract filtrat într-o eprubetă, s-au adăugat 10 ml glicerat de cupru, s-a agitat și s-a încălzit într-o baie de apă la 70°C timp de 6 minute. Apoi tubul este răcit în apă rece și este introdus un lichid limpede în cuvă pentru a determina densitatea optică a soluției. Cantitatea de zaharuri reducătoare din obiectul de testare (A,%) este calculată după formula:  $A = (c * V * 100\%) / (m * 1000)$

unde:  $C$  - este conținutul de zahăr, găsit din curba de calibrare;

$V$  - este volumul hotei obținute din probă;

$m$  - este masa probei în grame.

Densitatea optică a soluțiilor cercetate este determinată spectrofotometric la o lungime de undă de 582 nm [321].

**Prelucrarea statistică a datelor experimentale.** Rezultatele obținute au fost prelucrate statistic prin calcularea următorilor parametri: media aritmetică ( $\bar{x}$ ), dispersia ( $s^2$ ), abaterea standard (SD), eroarea mediei ( $s\bar{x}$ ), coeficientul de variație (CV, %). Toate datele sunt prezentate ca medie  $\pm$  eroarea standard a mediei [301]. Rezultatele experimentale fiind prelucrate cu utilizarea pachetului de programe a testului ANOVA, urmat de testul comparațiilor multiple și analizate prin analiza varianței și a testului Duncan și Bonferroni, care indică prin diferite litere majuscule în grafice diferența statistic semnificativă ( $p < 0,05$ ) dintre soiuri. Folosind instrumentele de analiză ale aplicației Microsoft Office Excel 2013 prin intermediul softului statistic XLSTAT. [141].

### 2.3. Concluzii la capitolul 2

1. Stabilirea mediilor eficiente pentru inițiere/stabilizare, multiplicare, rizogeneză, calusogeneză/caulogeneză și aclimatizare a speciei *L. barbarum* L. în cultura *in vitro*, (cu sau fără regulatori de creștere);
2. Descrierea protocolului de sterilizarea veselei și a materialului vegetativ în scopul obținerii unor plante viguroase, realizată cu prudență pentru evitarea infectării inoculilor;
3. Utilizarea metodelor biotehnologice, biometrice, fenologice, biochimice, anatomice și analiza statistică de prelucrare a datelor;
4. metodologia generală a cercetării științifice este prezentată în Figura 2.3.

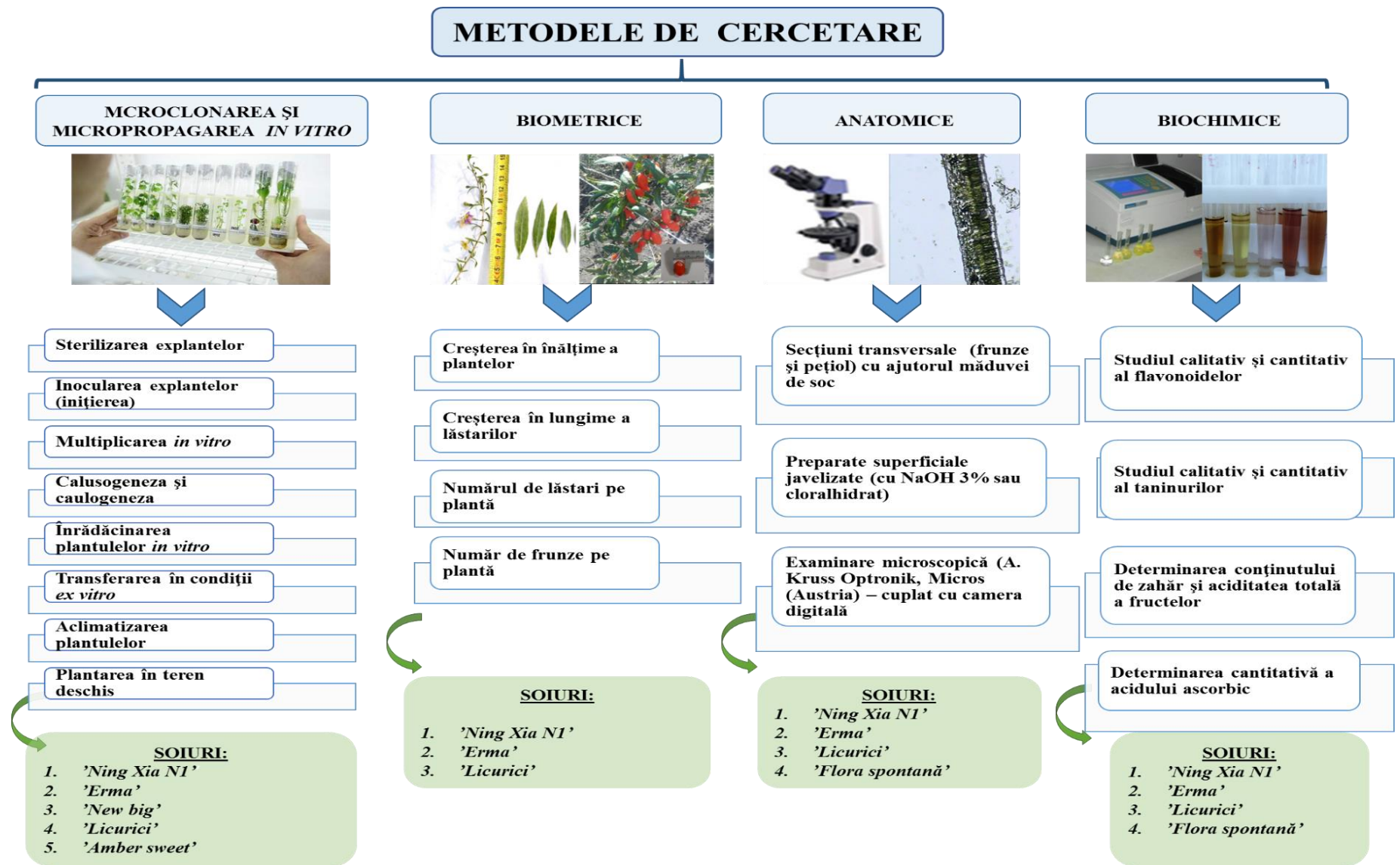


Fig. 2.3. Metodologia de cercetare prezentată schematic

### 3. MICROPROPAGAREA ȘI DEZVOLTAREA *IN VITRO* A SOIURILOR DE GOJI

Cunoașterea tehnicilor de micropropagare a plantelor horticole, explorează un domeniu de avangardă al horticulturii și agriculturii ce este primordială în obținerea unui material săditor cu înaltă valoare biologică care răspunde unor criterii importante. Principalele avantaje ale metodei sunt: rata de multiplicare imensă, uniformitate genetică, calitate înaltă, fiind totodată și o metodă de eliberare de agenți patogeni a materialului săditor. În acest sens s-a urmărit elaborarea tehnologiei optimizate de multiplicare *in vitro* bazate pe metode simple, accesibile, eficiente, utilizate în prezent pe scară largă în domeniul micropropagării, respectiv minibutășirii *in vitro* [8, 64, 247]. În favoarea multiplicării vegetative *in vitro* pledează în mod foarte convingător trei aspecte principale: \* este o metodă de înmulțire, caracterizată printr-o productivitate excepțională; \* posibilitatea de a obține plante libere de contaminări ceea ce permite readucerea și \* menținerea materialului vegetal în stadiul juvenil.

Aceste aspecte marchează superioritatea micropropagării comparativ cu metodele clasice de înmulțire vegetativă (butășire, marcotaj etc). Astfel, ca prim obiectiv de obținere a unei eficiențe sporite de micropropagare a soiurilor de goji, a fost de a stabili medii de bază suplinite cu diverse combinații de fitohormoni (citochinine, auxine și mai puțin gibereline) pentru etapele de: inițiere, multiplicare și rizogeneză *in vitro*. Așadar, s-au studiat medii pentru inducerea morfogenezei și calusogenezei la cinci soiuri de goji: 'Ning Xia N1', 'Erma', 'New big', 'Amber sweet' și 'Licurici', fructele cărora au valoare nutrițională pentru consumatori și importanță economică pentru producători și țară.

#### 3. 1. Inițierea și stabilizarea culturilor *in vitro* a arbustului de goji

Faza de inițiere și stabilizare a culturilor *in vitro* presupune, sterilizarea materialului biologic, izolarea explantelor și inocularea acestora pe un mediu de inițiere. Mediile de inițiere sunt, în general, variante ale mediilor standarde cu modificări, recomandate pentru specia *L. barbarum* L. În această fază este importantă realizarea strictă a procedeeleor cultivării aseptice și inițierea proliferării inoculilor.

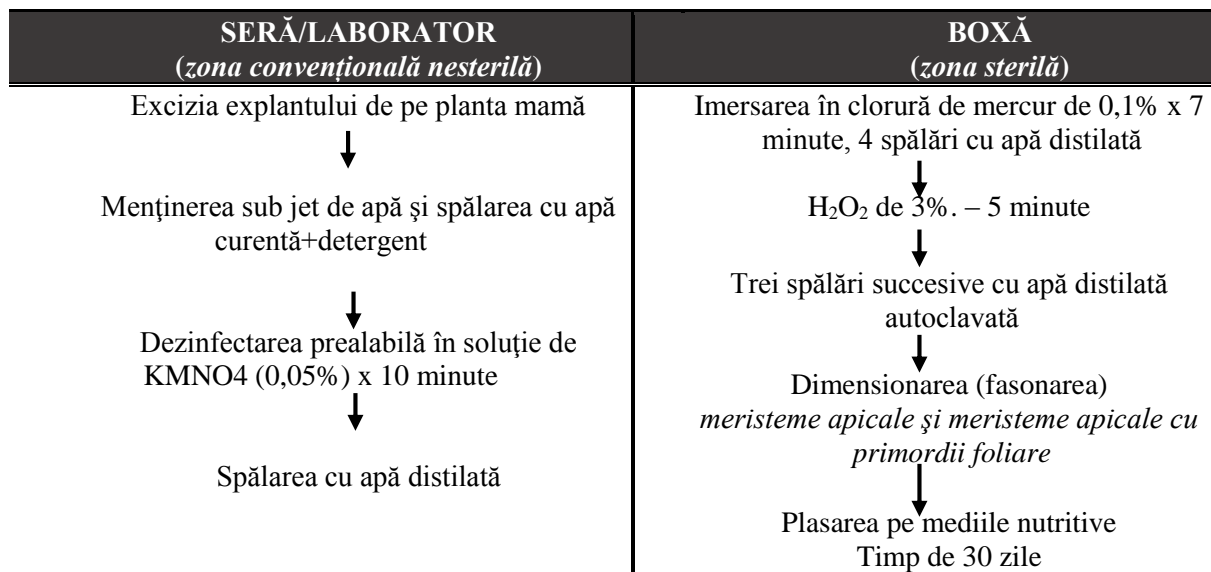
Materialul biologic a fost prelevat de la plante-donor, din colecția Grădinii Botanice Naționale (Institut) „Alexandru Ciubotaru” din R. Moldova.

**Prelevarea explantului.** Materialul vegetal utilizat pentru inițierea de culturi *in vitro* pentru micropropagare trebuie să conțină structuri cu capacitate organogenă (meristeme, muguri etc.). Explantele au fost prelevate de la plantele tinere. Astfel, pentru obținerea unor plantule viguroase în cultura *in vitro*, o condiție esențială, este dirijată de alegerea bună a explantului ce se caracterizează printr-un echilibru biochimic dependent de vârsta plantei donor, stadiul fiziologic



al acesteia, organul la al cărui nivel a fost efectuată prelevarea precum structura și dimensiunile explantului prelevat [246]. În calitate de explante au fost testate: meristeme apicale cu primordii foliare, meristeme apicale, fragmente de lăstar, fragmente de limb foliar și fragmente de rădăcini. Inocularea acestora s-a realizat în perioada de creștere intensă a țesuturilor în lunile aprilie - octombrie. În perioada latentă a plantelor lunile decembrie-martie fragmentele de lăstari apicali, au o viabilitate și regenerare a explantelor mai redusă. Un rol important în prelevarea unui material de lucru optim pentru culturile *in vitro* îl are etapa de recoltare, evitând perioadele de latență la speciile vizate [114].

**Asepsizarea (sterilizarea) materialului biologic.** Materialul biologic prelevat, în laborator se detașează de la fiecare ramură, meristemele apicale plasându-le în pahare *Berzelius*. Explantele au fost spălate de 4-5 ori cu apă + detergent, după care pentru sterilizarea se adaugă Tween 20 de 1% timp de 1 minut, cu rol protector, și permite evitarea pătrunderii reagenților în interiorul vaselor xilemice, fapt ce ar provoca deteriorarea structurilor și diminuarea viabilității lor [285], se spală cu apă de la apeduct până la înlăturarea detergentul. În pahar se adaugă apă distilată cu 2-3 picături de KMnO<sub>4</sub> de 0,05%, materialul se lasă în această soluție timp de 10 minute și se transportă în boxă (zona sterilă). Strategia de sterilizare a materialului biologic pentru inocularea *in vitro* este redată în Figura 3.1.



**Fig. 3.1. Schema de prelevare și asepsizarea explanților de goji, cu sterilizantul optim clorură de mercur de 0,1%**

În boxă se înlătură apa distilată și se adaugă clorură mercurică de 0,1%, timp de 7 minute. După înlăturarea clorurii de mercur, meristemele apicale au fost clătite de 4 ori cu apă distilată autoclavată. Ulterior, explantele să nu se oxideze și pentru o sterilizare mai eficace au fost clătite cu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 3%. – 5 minute, apoi cu apă distilată autoclavată. Urmează operațiunea de fasonare a

inoculilor sub lupă binocular-microscop MPS-10, de dimensiuni – 2-5 mm pentru meristeme apicale și 4-7 mm pentru meristeme apicale cu primordii foliar, care se efectuează foarte atent și cu mișcări precise pentru a evita deteriorarea suprafețelor.

**Testarea reagenților chimici.** Pentru a eficientiza asepsizarea materialului biologic au fost testați agenți sterilizanți ca: hipocloritul de natriu, hipocloritul de calciu, alcoolul etilic, clorura de mercur (Tabel 3.1). Ca rezultat al cercetărilor efectuate privind inițierea culturilor de goji s-a stabilit că cea mai potrivită perioadă de colectare a fragmentelor de lăstari este în lunile mai - iunie, utilizând drept sursă de material meristeme apicale cu și fără primordii foliare 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 mari, apoi a necrotizat, iar fragmentele de rădăcini nu au avut răspuns morfogenetic pozitiv.

**Tabelul 3.1. Agenți sterilizanți utilizați la asepsizarea materialului biologic**

Agent dezinfectant	Concentrații utilizate (%)	Meristeme apicale		
		Durata sterilizării (minute)	Viabilitatea plantulelor (%)	Grad de dezinfecție (%)
<b>Hipocloritul de natriu</b>	5	15	26	60
	7		15	75
	10		5	80
<b>Hipocloritul de calciu</b>	4	15	30	55
	6		19	56
	8		5	78
<b>Alcoolul etilic</b>	70	15	10	89
<b>Clorura de mercur</b>	0,01	5	35	91
		<b>7</b>	<b>85</b>	<b>91</b>
		15	27	95

Cea mai eficientă s-a dovedit a fi clorura de mercur cu o rată de viabilitate a plantulelor de 85%, cu concentrația de 0,01% și timp de expunere 7 minute pentru meristeme apicale și meristeme apicale cu primordii foliare, succedată de clătiri cu apă autoclavată și soluție de 3% de peroxid de hidrogen (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), pentru soiurile: 'Ning Xia N1', 'Erma', 'New Big', 'Amber Sweet' și 'Licurici'. În același timp, ceilalți agenți sterilizanți s-au dovedit a fi necorespunzători întrucât au apărut infecții de origine micotică și bacteriană la toate explantele inoculate. Indiferent de tipul de explant inițiat, se estimează că avem o stabilizare a culturilor în primele 14 zile de la inoculare, după această perioadă, infecțiile care survin sunt puse pe seama infecțiilor latente.

**Mediul de cultură.** Cercetările ce țin de selectarea unor medii nutritive optime destinate inoculării arbustului goji, sunt echilibrate după componența în macro- și microelemente, cu scopul

de a obține regenerarea inoculilor prelevați. Pentru identificarea unui mediu nutritiv optim au fost studiate particularitățile de regenerare a inoculilor pe diferite medii nutritive. S-au testat două variante a mediilor nutritive cum ar fi: MS (Murashige-Skoog) și B5 (Gamborg) suplinite cu regulatorul de creștere BAP (benzilaminopurină) în concentrație de 0,1 mg/l și 0,2 mg/l (Tabelul 3.2.):

- 1) V1 - MS modificat, lipsit de regulatori;
- 2) V2 - B5 modificat, lipsit de regulatori de creștere;
- 3) V3 - MS+BAP (0,1 mg/l);
- 4) V4 - MS+BAP (0,2 mg/l);
- 5) V5 - B5+BAP (0,1 mg/l);
- 6) V6 - B5 BAP (0,2 mg/l);

**Tabelul 3.2. Compoziția mediului Murashige-Skoog și Gamborg modificat**

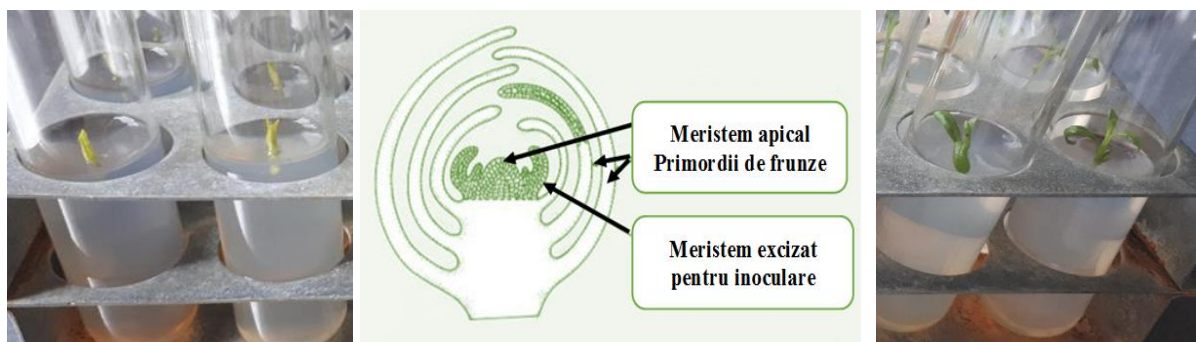
Componența	Cantitatea, mg/l	
	Murashige-Skoog	Gamborg
Macroelemente	concentrație 1/2	concentrație 1/2
Microelemente	concentrație întreagă	concentrație întreagă
FeNaEDTA	36,7 mg/l	36,7 mg/l
FeNaEDDHA	-	-
Myo-inozitol	50 mg/l	50 mg/l
Vitamina B1	0,5 mg/l	0,5 mg/l
Vitamina B6	0,5 mg/l	1 mg/l
Acid nicotinic	0,5 mg/l	1 mg/l
BAP	0,1; 0,2	0,1; 0,2
Zahăr alimentară	35 g/l	35 g/l
Agar	6 g/l	6 g/l
pH	5,8	5,8

*Notă:* BAP – Benzilanimopurina, marcate cu gri reduse în jumătate.

Datorită fenomenelor evidente de vitrificare și apariția culorii violete la nivelul frunzelor și tulpinelor plantulelor, la mediile MS și B5 au fost modificate concentrațiile de inozitol 50 mg/l, zahăr 35 mg/l și agar 6 mg/l.

**Inocularea.** Explantele de diferite dimensiuni (5 – 7 mm) au fost inoculate în condiții aseptice pe medii nutritive proaspăt pregătite (Anexa 1, Figura 1.1). Pasajele s-au realizat la intervale de 3-5 săptămâni în dependență de inocul și compoziția mediului nutritiv. Toate pasajele s-au efectuat pe medii nutritive proaspăt pregătite solide, în condiții aseptice. Inocularea s-a efectuat în două etape:

- fasonarea explantelor în condiții aseptice utilizând instrumente sterile;
- plasarea verticală a explantelor pe suprafața mediului de cultură (Figura 3.2).



**Fig. 3.2. Inițierea culturii cu meristeme și primordii foliare**

*Notă:* stânga– meristeme apicale; mijloc – reprezentarea schematică a meristemului; dreapta – meristeme laterale cu primordii foliare

Inocularea a fost efectuată în trei repetări câte 6 fitoinoculi, pentru fiecare soi în parte cu menținerea lor în camera de creștere.

**Factorii fizici.** Camera de creștere este destinată incubării și creșterii în condiții optime a inoculilor, în vederea asigurării dezvoltării acestora. La alegerea temperaturii optime și a 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:* 25-27 °C±2 °C;
- *regimul de iluminare:* lumina fluorescentă albă cu intensitate de 2000 lucși;
- *fotoperioada:* 16 ore lumină/8 ore întuneric;
- *umiditatea aerului* 50 – 70%.

Analiza mediilor de cultură MS 100% și B5, suplinit cu aceleași concentrație de citochinină BAP de 0,1 mg/l și 0,2 mg/l, sub aspectul formării neoplantulelor a demonstrat că, pe mediul B5 s-a evidențiat un grad mai mic comparativ cu MS 100%, având diferențe semnificative la nivelul parametrilor observați. Rezultatele înregistrate atestă faptul, că după 30 zile de cultivare în condiții *in vitro*, cea mai bună evoluție au avut explantele de tip meristem apical pe mediul MS suplinit cu BAP 0,2 mg/l.

Astfel, datele privind rată înaltă de plantule inițiate cu o frecvență de 94,4% o atestă soiurile 'New Big' și 'Licurici', urmată de soiurile 'Amber Sweet' cu 85,8%, 'Ning Xia N1' 77,7% și 'Erma' cu 80,2% (Tabelul 3.3). Compoziția mediului de bază B5 (Gamborg, 1968) modificat și suplimentat cu citochinina BAP cu 0,1-0,2 mg/l în faza de inițiere a culturii *in vitro* a soiurilor de goji a declanșat o frecvență mai scăzută, până la 55% de neoplantule formate. Aceste date ne vorbesc despre faptul, că frecvența inițierii culturii *in vitro* este influențată de tipul explantului, mediul de cultură și componența sa hormonală.

**Tabelul 3.3. Influența compoziției mediilor de cultură asupra inițierii culturii *in vitro* la soiurile de goji, după 30 zile**

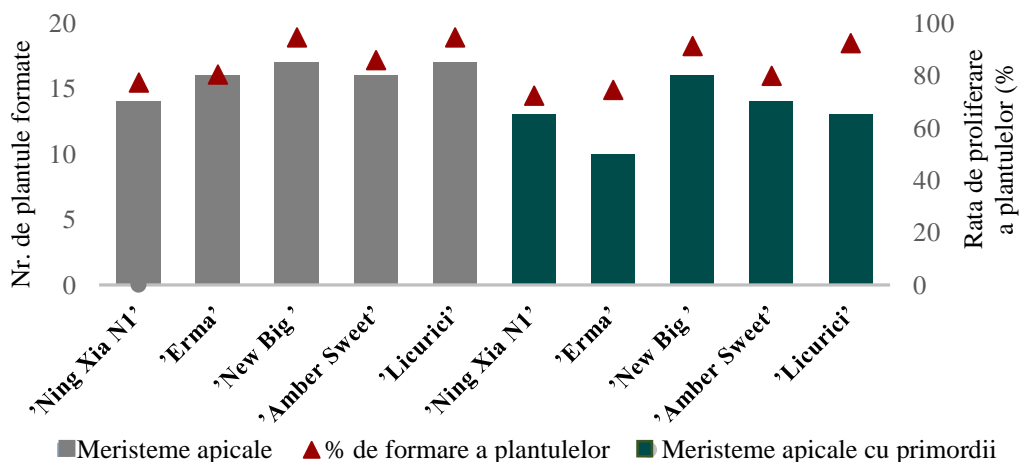
Soiul	Variante	Originea țesuturilor explantate							
		Meristeme apicale				Meristeme apicale cu primordii foliare			
		Nr. explante prelevate	Explante fără evoluție	Plantule inițiate		Nr. explante prelevate	Explante fără evoluție	Plantule inițiate	
nr.	%			nr.	%				
Ning Xia N1	V1	18	15	3	16,6	18	15	5	27,7
	V2	18	12	6	33,3	18	11	7	38,8
	V3	18	9	9	50,0	18	10	8	44,4
	<b>V4</b>	<b>18</b>	<b>4</b>	<b>14</b>	<b>77,7</b>	<b>18</b>	<b>5</b>	<b>13</b>	<b>72,2</b>
	V5	18	10	8	44,4	18	8	10	55,5
	V6	18	11	7	38,8	18	7	11	61,1
Erma	V1	18	11	7	38,8	18	11	7	38,8
	V2	18	12	6	33,3	18	9	9	50,0
	V3	18	5	13	72,2	18	4	14	77,7
	<b>V4</b>	<b>18</b>	<b>2</b>	<b>16</b>	<b>88,8</b>	<b>18</b>	<b>10</b>	<b>8</b>	<b>44,4</b>
	V5	18	9	9	50,0	18	8	10	55,5
	V6	18	14	4	22,2	18	13	5	27,7
New Big	V1	18	12	6	33,3	18	10	8	44,4
	V2	18	13	5	27,7	18	10	8	44,4
	V3	18	11	7	38,8	18	6	12	66,6
	<b>V4</b>	<b>18</b>	<b>1</b>	<b>17</b>	<b>94,4</b>	<b>18</b>	<b>2</b>	<b>16</b>	<b>88,8</b>
	V5	18	8	10	55,5	18	6	12	66,6
	V6	18	10	8	44,4	18	7	11	61,1
Amber Sweet	V1	18	14	4	22,2	18	13	5	27,7
	V2	18	15	3	16,6	18	8	10	55,5
	V3	18	11	7	38,8	18	5	13	72,2
	<b>V4</b>	<b>18</b>	<b>2</b>	<b>16</b>	<b>88,8</b>	<b>18</b>	<b>4</b>	<b>14</b>	<b>77,7</b>
	V5	18	11	7	38,8	18	14	4	22,2
	V6	18	10	8	44,4	18	12	6	33,3
Licurici	V1	18	13	5	27,7	18	14	4	22,2
	V2	18	14	4	22,2	18	13	5	27,7
	V3	18	7	11	61,1	18	11	7	38,8
	<b>V4</b>	<b>18</b>	<b>1</b>	<b>17</b>	<b>94,4</b>	<b>18</b>	<b>5</b>	<b>13</b>	<b>72,2</b>
	V5	18	10	8	44,4	18	11	7	38,8
	V6	18	11	7	38,8	18	11	7	38,8

Notă: V1 – MS modificat, lipsit de regulatori; V2 – B5 modificat, lipsit de regulatori de creștere; V3 – MS+BAP 0,1 mg/l; V4 – MS+BAP 0,2 mg/l; V5 – B5+BAP 0,1 mg/l; V6 – B5 BAP 0,2 mg/l.

Mediul de bază Murashige-Skoog s-a dovedit a avea o compoziție minerală favorabilă micropropagării prin lăstărire axilară a soiurilor de goji comparativ cu mediul Gamborg. Pentru toate cinci soiuri de goji V4 (MS suplinit cu 0,2 mg/l BAP), a dus la valori ridicate ale ratei de multiplicare, asociate cu o vigoare sporită a lăstarilor regenerați.

Astfel, la soiul 'Ning Xia N1', rata medie de inițiere calculată la sfârșitul celor 30 zile a indicat obținerea unui număr de 14 plantule inițiate din meristeme apicale și 13 plantule din

meristeme cu primordii foliare. La soiul 'Erma' și soiul 'Amber Sweet', prin utilizarea aceluiași mediu de cultură a fost obținut un număr de 16 plantule inițiate din meristeme apicale și 10 plantule din meristeme cu primordii foliare. La soiurile 'New Big' și 'Licurici' pe același mediu de cultură a fost obținut un număr maxim de 17 plantule inițiate per final (Figura 3.3).



**Fig. 3.3. Influența mediului V4 asupra procesului de inițiere *in vitro***

Notă: V4 - Murashige-Skoog suplinit cu citochina MS+ BAP 0,2 mg/l

De asemenea, putem afirma, că lipsa citochininei BAP din mediu nutritiv, duce nemijlocit la reducerea esențială a capacității regenerative a explantelor de a prolifera plantule.

Concluzionând asupra rezultatelor de mai sus, putem releva că există o strânsă corelație între mediul de cultură și aportul regulatorilor de creștere în procesul de inițiere a culturii *in vitro*, influențate într-o măsură mai mică de organele donatoare. Trebuie menționat faptul că, inițierea culturilor de țesuturi *in vitro* necesită formarea unui mediu de bază cu o anumită formulă minerală, care să suporte și să stimuleze o diviziune celulară rapidă a explantului meristematic [255].

Formula minerală este suplimentată cu citochinine în cazul nostru pentru a iniția creșterea explantelor. În continuare se vor prezenta variantele de medii nutritive de cultură testate, care se deosebesc după conținutul de micro-, macroelemente și citochinine, raportul auxină/citochinină și auxină. Microlăstarii obținuți după faza de inițiere a culturii *in vitro* au fost divizați și transferați pe mediile de multiplicare, în șapte variante experimentale determinate de combinația și concentrația hormonilor de creștere.

Favorizarea procesului de microclonare s-a obținut prin mărirea conținutului citochinine și realizarea unei combinații hormonale favorabile citochinine, auxine și giberiline. Rizogeneza s-a indus cu concentrație mică de auxine și pe un mediu fără hormoni. Astfel, în dependență de scopul propus au fost utilizate următoarele medii (Tabelul 3.4):

1. Medii pentru microclonare (proliferarea lăstarilor) și micropropagare plantulelor;
2. Medii pentru rizogeneza plantulelor.

**Tabelul 3.4. Concentrațiile și combinațiile regulatorilor de creștere utilizați, pentru inducerea microclonării, stimulării alungirii și rizogenezei la soiurile de goji**

MS 100%	Variante medii												
	Microclonare							Stimularea alungirii lăstarului și rizogenezei					
	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12	M13
<i>Citochinine, mg/l:</i>	0,5	0,7	-	-	0,2	0,2	0,2	-	-	-	-	-	-
BAP													
KIN			0,5	0,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Auxine, mg/l:</i>	-	-	-	-	0,2	-	-	-		0,2	0,5	-	-
AIB													
AIA	-	-	-	-	-	0,2	-	0,2	0,5	-	-	-	-
ANA	-	-	-	-	-	-	0,2	-	-	-	-	0,2	0,5
<i>Giberiline, mg/l:</i>	-	-	-	-	0,1	0,1	0,1	-	-	-	-	-	-
GA <sub>3</sub>													

Notă: **MS**- mediul Murashige&Skoog, (1962); **BAP**- benzil aminopurină; **Kin**- kinetină; **ANA**- acid alfa-naftil acetic; **IBA**- acid indolil butiric; **AIA** – acid indolil acetic; **GA<sub>3</sub>**- acid giberelic

### 3.2. Acțiunea citochininelor asupra ratei de multiplicare la soiurile de goji

Multiplicarea la scară comercială a unui număr mare de specii de plante prin tehnici de cultură *in vitro* reprezintă una dintre aplicațiile de succes ale acestei tehnologii, practică în numeroase laboratoare și apreciată pe piața globală ca o industrie extrem de profitabilă. Beneficiile pe termen lung ale acestei biotehnologii derivă din creșterea durabilității, profitabilității și competitivității la nivel internațional, dar mai ales din posibilitatea multiplicării clonale a plantelor. Influența compoziției mediului de cultură asupra ratei de multiplicare constituie o etapă deosebit de importantă în fluxul tehnologic *in vitro*, de care depinde realizarea într-un timp cât mai scurt a unui număr mare de neoplantule identice cu planta mamă, excluzând variabilitatea somaclonală [8, 38, 257]. Faza de multiplicare se realizează pe mai multe subculturi cu o durată de 3-4 săptămâni. Astfel, următorul aspect principal este consacrat creșterii ratei de multiplicare în condițiile menținerii stabilității genetice a materialului biologic

**Influența citochininelor** asupra ratei de multiplicare *in vitro*, servesc la menținerea viabilității celulelor, susținând capacitatea de supraviețuire a explantelor inoculate, favorizând formarea și creșterea lăstarilor. Prin urmare s-a realizat, mărirea cantității de citochinine din mediu pentru dezvoltarea mugurilor laterali, adventivi și creșterea rapidă din ei a lăstarilor.

Pentru testarea răspunsului la prezența citochininelor în mediul de cultură, au fost utilizați fitoregulatorii BAP și KIN, care conform literaturii de specialitate [60, 206] prezintă interes, grație acțiunii lor extrem de efective asupra creșterii și dezvoltării explantelor de goji în cultura *in vitro*. Astfel, au fost testate patru variante de medii nutritive cu concentrațiile: 0,5 mg/l; 0,7 mg/l de



fiecare citochinină (Tabelul 3.5). Acțiunea citochininelor asupra procesului de microclonare la soiurile goji au fost inițiate din meristeme apicale. Astfel, prin asocierea datelor pentru toate soiurile de goji s-a constatat, că nu sunt reacții diferențiate condiționate de soi, relevând faptul că procesul de multiplicare *in vitro* nu trebuie individualizat, deoarece se caracterizează prin faptul că fiecare cultivar nu are un specific al reacției față de activitatea hormonală, din structura mediilor de cultură prestate.

**Tabelul 3.5. Efectul citochininelor asupra multiplicării soiurilor de goji**

Soiul	MS 100% Citochinina (mg/l)		Nr. de lăstari (m±n)		Înălțimea lăstarilor, cm (m±n)	
	BAP	Kin	După:		După:	
			20 zile	35 zile	20 zile	35 zile
Ning Xia N1	<b>0,5</b>	<b>0,0</b>	<b>9,17 ±0,17</b>	<b>14,11±0,31</b>	<b>2,31±0,04</b>	<b>3,17±0,10</b>
	0,7	0,0	8,78±0,23	13,06±0,30	2,25±0,06	2,49±0,10
	0,0	0,5	7,11±0,23	8,50±0,25	2,08±0,03	2,29±0,04
	0,0	0,7	6,17±0,17	7,44±0,19	1,91±0,05	2,03±0,04
Erma	<b>0,5</b>	<b>0,0</b>	<b>9,53±0,30</b>	<b>14,72±0,31</b>	<b>2,6±0,12</b>	<b>3,25±0,09</b>
	0,7	0,0	8,22±0,20	16,00±0,27	3,03±0,12	3,46±0,05
	0,0	0,5	7,00±0,30	9,06±0,40	2,09±0,05	2,39±0,06
	0,0	0,7	6,50±0,24	8,06±0,22	1,91±0,05	2,47±0,05
New Big	<b>0,5</b>	<b>0,0</b>	<b>13,28±0,56</b>	<b>16,11±0,65</b>	<b>3,18±0,14</b>	<b>4,01±0,08</b>
	0,7	0,0	12,06±0,49	14,00±0,26	2,99±0,13	3,33±0,11
	0,0	0,5	7,61±0,29	9,78±0,49	2,57±0,13	3,04±0,13
	0,0	0,7	4,44±0,19	9,06±0,37	2,16±0,07	2,55±0,07
Amber Sweet	<b>0,5</b>	<b>0,0</b>	<b>17,39±0,11</b>	<b>22,06±0,58</b>	<b>4,09±0,07</b>	<b>4,26±0,10</b>
	0,7	0,0	15,06±0,35	17,33±0,39	3,64±0,07	3,98±0,09
	0,0	0,5	7,06±0,34	8,94±0,34	2,91±0,08	3,33±0,06
	0,0	0,7	7,00±0,35	9,06±0,41	1,86±0,07	2,10±0,07
Licurici	<b>0,5</b>	<b>0,0</b>	<b>19,61±0,44</b>	<b>20,17±0,51</b>	<b>3,88±0,08</b>	<b>4,04±0,11</b>
	0,7	0,0	15,89±0,42	19,11±0,45	3,07±0,07	3,51±0,07
	0,0	0,5	7,17±0,23	9,17±0,32	2,46±0,06	3,01±0,07
	0,0	0,7	6,78±0,31	9,22±0,36	2,40±0,03	2,90±0,05

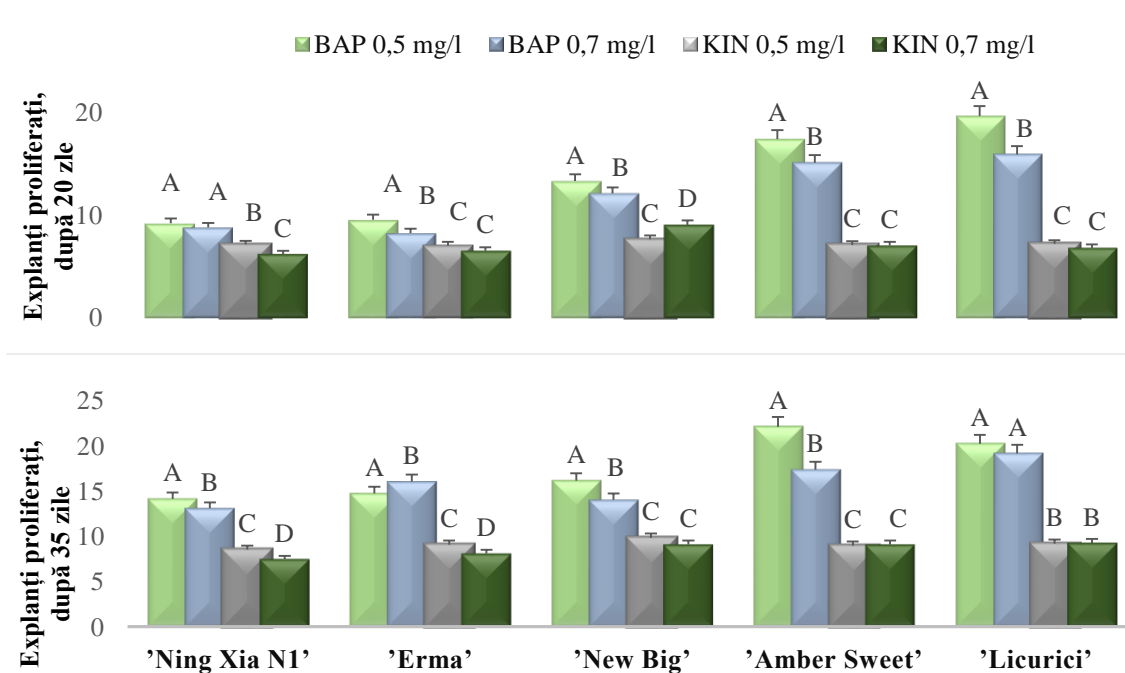
Notă: m – media, n – abaterea standardă

Rezultatele înregistrate în experimentele de regenerare al lăstarilor la soiurile de goji, reflectă cu claritate rolul important pe care compoziția mediului de cultură îl deține în ansamblul factorilor care determină exprimarea potențialului regenerativ. Indiferent de combinația regulatorilor de creștere, rata de multiplicare a fost pozitivă pentru toate cultivarele. La cantități mai sporite de citochininele BAP și KIN cu concentrația de 0,7 mg/l, plantulele au prezentat o vigoare extrem de redusă, asociată frecvent cu fenomenul de vitrifiere, ceea ce a dus la pierderea unui procent important de lăstari, în subculturi succesive creșteri neregulate ale lăstarului.

Cantitatea optimă dovedindu-se a fi 0,5 mg/l pentru ambele citochinine cu o dezvoltare ridicată. Cu toate acestea, rezultatele optime pentru multiplicare după numărul de plantule dezvoltate de la un explant s-au obținut pe mediul suplinit cu regulatorul de creștere BAP cu



concentrația de 0,5 mg/l (Anexa 1, Figura 1.2). La plasarea pe acest mediu de cultură, se mărește considerabil inducerea mugurilor laterali pe axul plantulei, ceea ce favorizează o dezvoltare peste 20 lăstari formați per explant inițial. Ulterior această lăstare servește în calitate de sursă de material biologic pentru subculturi succesive. Mai târziu a urmat capacitatea de înrădăcinare *in vitro* și de aclimatizare la condițiile din seră. Începând cu primele zile de inoculare s-au realizat observații în procesul de creștere și microclonare al explantelor inoculate. După prima săptămână de cultivare la nivelul explantelor s-au atestat primele semne ale reacției lor. În următoarea săptămână de cultivare, la nivelul explantelor s-a atestat o rată de proliferare de ordinul zecilor de lăstari/explant. În figura 3.4 sunt prezentate rezultatele de sinteză privind influența mediului de bază asupra numărului de lăstari obținuți după 20 și 35 de zile, relevant în acest sens fiind diferența de la 2 până la 8 lăstari formați per explant inițial calculată între variantele experimentale definite de mediul MS, respectiv cu concentrațiile 0,5 mg/l; 0,7 mg/l de citochininele BAP și KIN la toate soiurile studiate.



**Fig. 3.4. Proliferarea și microclonarea lăstarilor de goji pe mediul de bază nutritiv MS cu diferite concentrații de citochinine BAP și KIN (mg/l).**

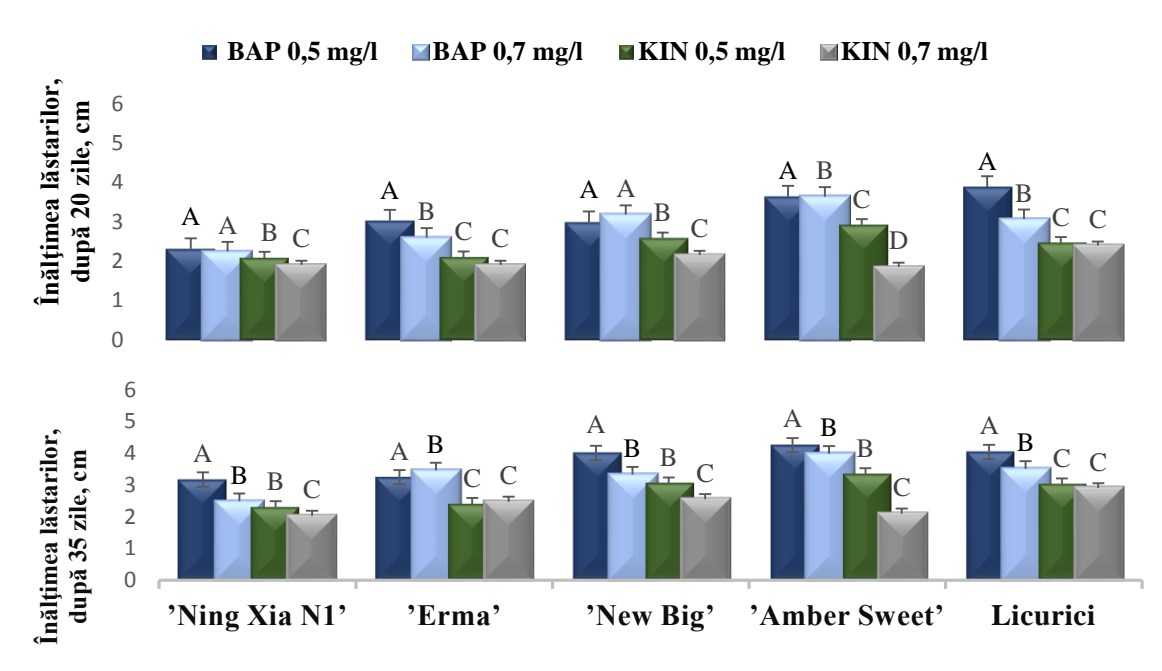
Notă: analiza statistică realizată prin testul ANOVA, (barele reprezintă abaterea standard; A, B, C: interpretarea semnificației diferențelor, cu ajutorul testului Duncan, ( $p < 0,05$ ) dintre soiuri.

Totuși, s-a observat diferențe semnificative ale valorilor ratei de multiplicare, care au fost atribuite influenței mediului de bază. Vigoarea mai ridicată a lăstarilor multiplicați pe variantele experimentale caracterizate de mediul nutritiv suplinit cu citochinina BAP de 0,5 mg/l, indică faptul că este cea mai favorabilă concentrație pentru microclonarea soiurilor de goji după 20 de zile, respectiv 35 de zile de la inițierea culturilor *in vitro*.

Determinarea numărului mediu de lăstari formați per explant inițial variază de la 20,17 la soiul 'Licurici' până la 22,06 soiul 'Amber Sweet'. Deși la soiurile 'Ning Xia', 'Erma' și 'New Big', numărul de lăstari nu diferă esențial (14,11; 14,72; respectiv 16,11), aceste diferențe sunt statistic semnificative ( $p < 0,05$ ).

De asemenea, concomitent s-au monitorizat parametrii de creștere, respectiv înălțimea vitroplantulelor. Astfel, în urma biometrizărilor efectuate la 20 și 35 de zile de la microclonare, pe mediu de cultură MS 100% suplinit cu aceleași citochinine în aceleași concentrații putem afirma că fiecare mediu M1, M2, M3 și M4 vitroplantulele au crescut în înălțime, cea mai proeminentă creștere fiind înregistrată pe mediu M1 (Anexa 1, Figura 1.3-1.4).

Înălțimea plantulelor după 20 zile se evidențiază la 'Amber Sweet' (4,09 cm), cu diferențe semnificative față de toate soiurile. 'Amber Sweet', 'New Big' și 'Licurici' au plantulele cele mai înalte (4,26, 4,04 și respectiv 4,01 cm;  $p < 0,05$ ), comparativ cu soiurile 'Erma' și 'Ning Xia', ce se diferențiază statistic cu plantule mai scurte respectiv unde înălțimea tulpiniței atinge 3,25 și 3,17 cm după 35 de zile (Figura 3.5).



**Fig. 3.5. Înălțimea (cm) lăstarilor pe medii suplinate cu citochininele BAP și KIN**

Notă: analiza statistică realizată prin ANOVA, (barele reprezintă abaterea standard; A, B, C, D: interpretarea semnificației diferențelor, cu ajutorul testului Duncan,  $p < 0,05$ ) dintre soiuri.

Ca rezultat al investigațiilor efectuate, s-a evidențiat faptul că, odată cu diminuarea concentrației de citochinină BAP la 0,5 mg/l, lungimea lăstarului se extinde, iar cu sporirea concentrației BAP-ului de 0,7 mg/l scade nesemnificativ înălțimea lăstarului, aceeași legitate se evidențiază și la citochinina KIN de aceleași concentrații. Dacă luăm în considerație faptul că, diferențele dintre variantele experimentale cu concentrații mai mici și cele cu concentrații mai mari

de citochinine sunt semnificative pentru  $p < 0,05$  (conform testului Duncan), putem afirma că rezultatele obținute de noi sunt similare celor raportate de alți cercetători [60, 185].

Întru menținerea explantelor în cultura *in vitro* s-au creat condiții necesare pentru microclonare, și anume: fotoperiodismul 16 ore lumină 8 ore obscuritate; temperatura aerului de  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  și intensitatea luminii de 2500 lucși, umiditatea aerului 70%.



**Fig. 3.6. Lăstari regenerați pe mediul MS suplimentat cu 0,5 mg/l BAP, după 30 zile**

Rezultatele obținute sugerează că citochininele stimulează creșterea meristemelor, în special în cazul în care ele se află în latență, precum și generarea de mugurași. Concentrațiile mici de citochinina BAP favorizează și stimulează formarea de plantule la soiurile de goji, fapt ce constituie o modalitate de obținere rapidă a unui număr sporit de minibutași de o uniformitate genetică, multiplicați prin metode *in vitro* (Figura 3.6). Studiul a relevat că suplimentarea citochininei BAP în mediul MS, influențează semnificativ formarea lăstarului, dar inhibă alungirea rădăcinii [14, 31, 41].

### **3.3. Influența combinației și concentrației regulatorilor de creștere asupra ratei de multiplicare și procesul de creștere *in vitro* la vitroculturile de goji**

Combi-nația sinergetică a auxinei, citochininei și giberilinei ( $\text{GA}_3$ ) promovează procesele de organogeneză la explantele cultivate *in vitro* prin influențarea proceselor fiziologice, cum ar fi raportul auxină și citochinină este mărit se induce rizogeneză și dacă raportul este subunitar se induce lăstărirea cu formațiuni calusale. Astfel, manipularea acestei balanțe influențează reușita direcționării proceselor de formare a tulpinițelor și a procesului de rizogeneză la țesuturile cultivate [79, 89, 208].

Astfel, sporirea cantității de auxină determină orientarea proceselor de morfogeneză spre rizogeneză în timp ce creșterea proporției de citochinină induce formarea de mugurași și lăstarași [43, 212].

Rezultatele înregistrate în experimentele de microclonarea a celor cinci soiuri de goji, reflectă cu claritate rolul important pe care suplینirea mediului de cultură îl deține în exprimarea potențialului regenerativ. O dovadă concludentă în acest sens fiind efectul diferit al combinațiilor de hormoni în medii de bază cu concentrație diferită. Astfel, divizarea și transferul lăstarilor de goji pe medii de cultură proaspete, păstrând mediu de bază MS 100%, suplinit cu variante hormonale din grupul citochininelor (BAP), auxinelor AIB, ANA, AIA, și giberilinelor (GA<sub>3</sub>), a scos în evidență rezultate favorabile, cu formule specifice ale hormonilor de creștere.

Combinațiile a trei tipuri de regulatori de creștere: citochinine, auxine și giberiline (BAP+AIB+GA<sub>3</sub>, BAP+AIA+ GA<sub>3</sub>, BAP+ANA+GA<sub>3</sub>) fiecare fiind suplimentat cu diverse concentrații de 0,3+0,2+0,1 mg/l, au a dat rezultate optime privind rata de multiplicare. Auxinele selectate (ANA, AIB, AIA) pe lângă rolul de stimulare a rizogenezei, în concentrații mici de 0,1-0,2mg/l intervin și în procesele de diviziune și elongație a celulelor [289]. Toate tipurile de auxine s-au luat în concentrații mai de 0,2 mg/l (Tabelul 3.6).

**Tabelul 3.6. Influența combinației și concentrației hormonilor de creștere, asupra ratei de multiplicare *in vitro*, după 35 zile**

Soiul	Combiનાcia de regulatori de creștere MS 100% + Citochinina + Auxina + Giberilina (mg/l)					
	M5		M6		M7	
	BAP +AIB+ GA <sub>3</sub> 0,2 + 0,2 +0,1 mg/l		BAP +ANA+ GA <sub>3</sub> 0,2 + 0,2 +0,1 mg/l		BAP +AIA+ GA <sub>3</sub> 0,2 + 0,2 +0,1 mg/l	
	Numărul de lăstari (m±n)	Înălțimea lăstarului, cm (m±n)	Numărul de lăstari (m±n)	Înălțimea lăstarului, cm (m±n)	Numărul de lăstari (m±n)	Înălțimea lăstarului, cm (m±n)
<b>Ning Xia N1</b>	2,72±0,19	1,68±0,06	<b>4,56±0,29</b>	<b>2,00±0,05</b>	1,61±0,11	2,00±0,05
<b>Erma</b>	2,50±0,17	2,03±0,06	<b>4,94±0,36</b>	<b>2,61±0,08</b>	2,00±0,17	3,00±0,08
<b>New Big</b>	3,50±0,24	1,89±0,04	<b>6,94±0,29</b>	<b>3,63±0,07</b>	2,61±0,20	2,78±0,06
<b>Amber Sweet</b>	4,39±0,23	2,35±0,05	<b>5,06±0,41</b>	<b>3,27±0,07</b>	2,78±0,18	2,52±0,08
<b>Licurici</b>	4,56±0,32	2,31±0,04	<b>5,22±0,31</b>	<b>3,61±0,08</b>	5,22±0,31	3,61±0,08

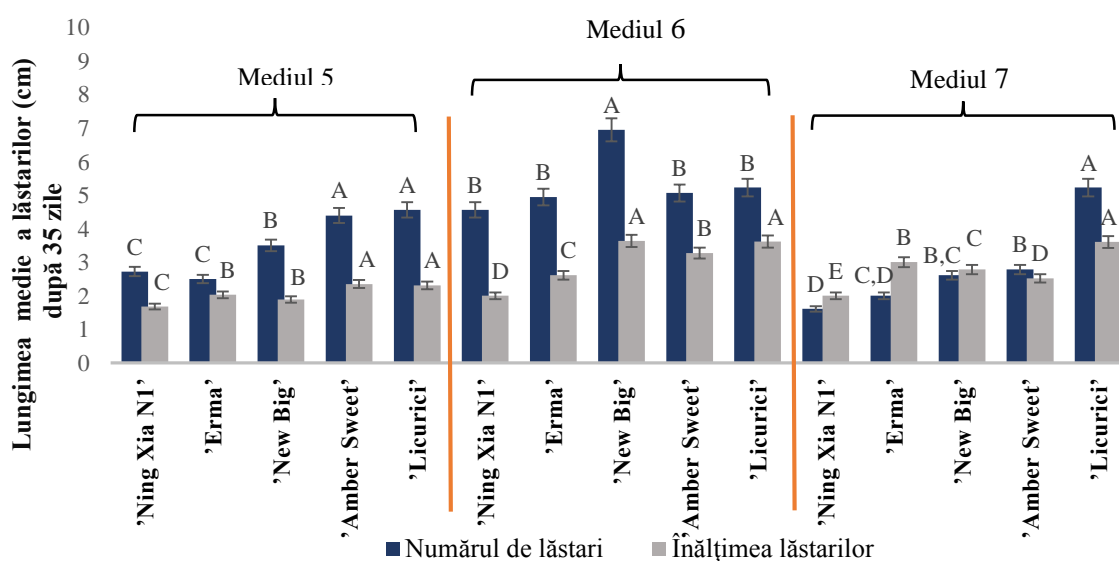
Notă: m – media, n – abaterea standardă

Giberilina în doză de 0,1 mg/l, stimulează alungirea lăstarilor precum și diferențierea lemnului și a cambiului, fiind recomandată după stabilizarea culturii de meristeme [60, 286, 302, 304, 310]. Divizarea și transferul lăstarilor pe medii de cultură proaspete a variantelor

experimentale, a evidențiat interacțiunea favorabilă dintre soiurile studiate cu formule specifice ale hormonilor de creștere, după cum este evidențiat în Figura 3.8.

Suplimentarea mediului de cultură M5 cu 0,2 BAP mg/l + 0,2 AIB mg/l + 0,1 GA<sub>3</sub> mg/l, a dus la rezultate favorabile la soiurile 'Ning Xia N1' și 'Erma', multiplicarea realizându-se cu o rată egală cu 2,72 și 2,50 lăstari formați per explant inițial, per subcultură. Aceeași combinație a hormonilor de creștere la soiurile 'New big', 'Amber Sweet' și 'Licurici' a manifestat o rată mai înaltă de multiplicare cu 3,50, 4,39 și respectiv 4,56 lăstari formați per explant inițial.

Cele mai bune rezultate s-au obținut pe mediul M6 cu balanța hormonală compusă din 0,2 BAP mg/l + 0,2 ANA mg/l + 0,1 GA<sub>3</sub> mg/l, care a avut un efect semnificativ ( $p < 0,05$ , conform testului Duncan) asupra ratei de micropropagare față de celelalte combinații de fitohormoni. Numărul mediu de lăstari proliferați per explant inițial a fost ridicat la valori de 4,56 și 4,94 pentru soiurile 'Ning Xia N1' și 'Erma', cea mai sporită proliferare de lăstari se evidențiază la soiurile 'New big' de 6,94, urmat de 'Amber Sweet' - 5,06 și 'Licurici' - 5,22 lăstari proliferați (Figura 3.7).



**Fig. 3.7. Influența combinației și concentrației hormonilor de creștere asupra creșterii și proliferării *in vitro* la soiurile de goji**

Notă: **Mediul 5** - BAP (0,2 mg/l) + AIB (0,2 mg/l) + GA<sub>3</sub> 0,1 (mg/l); **Mediul 6** - BAP (0,2 mg/l) + ANA (0,2 mg/l) + GA<sub>3</sub> (0,1 mg/l); **Mediul 7** - BAP (0,2 mg/l) + AIA (0,2 mg/l) + GA<sub>3</sub> (0,1 mg/l).

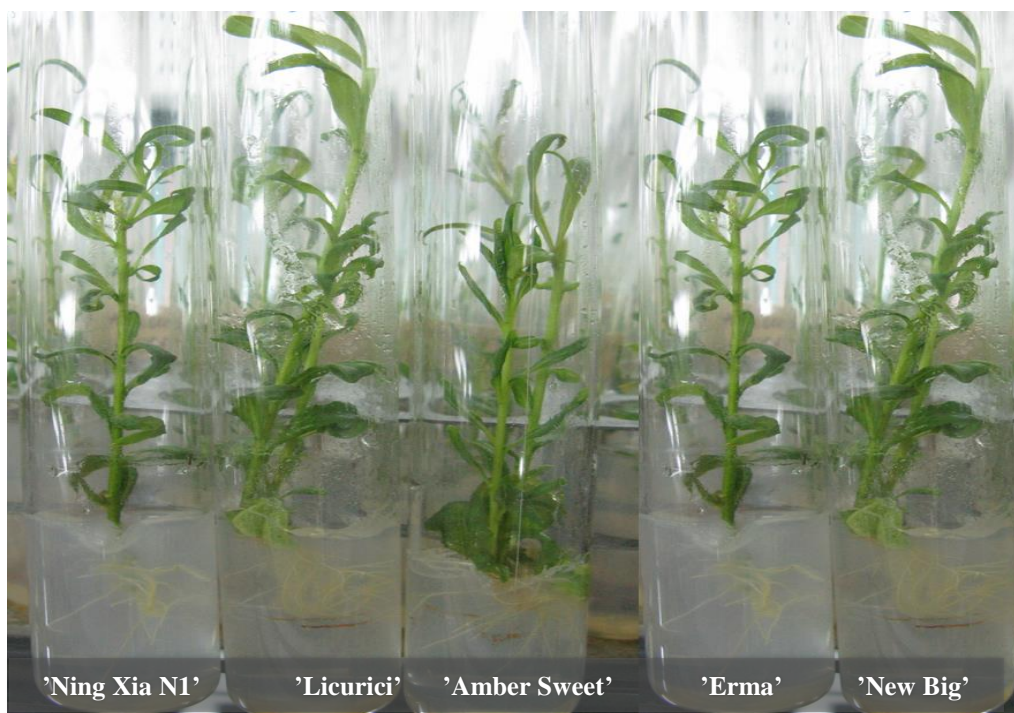
analiza statistică realizată prin ANOVA, (barele reprezintă abaterea standard; A, B, C, D: interpretarea semnificației diferențelor, cu ajutorul testului Duncan,  $p < 0,05$ ) dintre soiuri.

Concentrații mai mari de auxine, induc formarea de calus, aspect ce nu recomandă cercetătorii științifici în procesele de multiplicare clonală *in vitro* [155]. Combinația regulatorilor de creștere pe mediul M5 a influențat pondere scăzută de proliferare a lăstarilor pentru soiuri generând în mediu 2-4 lăstari, cu o lungime de 2,3 cm. Influența balanței hormonale asupra



creșterii în înălțime a microlăstarilor de goji a fost analizată după trei săptămâni de la transferul microlăstarilor pe mediul de multiplicare.

Concentrația balanței hormonale a mediului M7 a relevat o pondere mai scăzută a parametrilor studiați față de mediile M5 și M6. Astfel, proliferarea lăstarilor prezintă diferențe statistice semnificative ( $p < 0,05$ ) la soiul 'Licurici' în mediu de 5,22 de lăstari, față de soiurile 'Amber Sweet', 'New Big', 'Erma' și 'Ning Xia N1' (2,78; 2,61; 2; 1,61 lăstari). Lungimea minimă s-a constatat la soiul 'Ning Xia N1' de 2 cm per explant și soiurile 'Amber Sweet' și 'New Big' cu o lungime 2,52 cm și 2,78 cm. Soiul 'Licurici' a dezvoltat o creștere maximă a lăstarului de 3,61 cm (Figura 3.8).



**Fig. 3.8. Stimularea lăstării axilare pe mediul M6, după 30 zile**

Generalizând datele obținute în studiu menționăm că prin experimentele efectuate a trei tipuri de regulatori din grupul citochininelor, auxinelor, giberelinelor, a fost creată o balanță hormonală în raport de 2:2:1 semnificative pentru  $p < 0,05$  (conform testului Duncan), folosind ca explante inițiale meristeme din mugurii apicali și laterali. Putem afirma că rezultatele obținute de noi sunt similare celor raportate de alți cercetători, care au sugerat pentru micropropagarea plantelor de goji aceleași combinații ale regulatorilor de creștere [124, 129].

Analizând influența balanței hormonale asupra capacității de multiplicare se constată că, începând cu a doua subcultivare a crescut rata de multiplicare pentru varianta experimentală M6, creșterea fiind semnificativă la toate soiurile studiate. Astfel, suplینirea cu 0,2 mg/l BAP, 0,2 mg/l ANA și 0,1 mg/l GA<sub>3</sub>, a avut un efect semnificativ asupra ratei de micropropagare. În acest context,

trebuie menționat faptul că, citochinina, auxina și giberilina au fost utilizate cu eficiență ridicată la goji și alți arbuști fructiferi, în special pentru microclonarea plantelor [109, 189] sau la inducerea de calus și regenerarea de plante prin organogeneză indirectă [154].

De asemenea, efectul cumulativ favorabil al BAP, ANA și GA<sub>3</sub> asupra proliferării lăstarilor *in vitro*, a fost raportat și la alte specii de plante, precum *Dendrathera grandiflora* [90], *Solanum quitoense* [86], *Eucalyptus benthamii* [16] și *Vaccinium angustifolium* [42]. După a șaptea subcultură valorile ratei de multiplicare calculate pentru această variantă experimentală s-au menținut ridicate, la toate soiurile.

### **3.4. Influența auxinelor în procesul de creștere și rizogeneză la soiurile de goji**

Faza de înrădăcinare sau de pregătire a materialului pentru trecerea la condiții *ex vitro* este o fază importantă care constă în reducerea lăstării axilare, stimularea alungirii lăstarilor, inducerea formării sistemului radicular sau chiar formarea rădăcinilor. Etapa de înrădăcinare, se referă la unele modificări în compoziția mediului de cultură și la schimbarea condițiilor de cultură.

Dacă în etapa de microclonare au predominat auxinele, citochininele și giberilinele în concentrații mici. În etapa de rizogeneză se recomandă reinstalarea dominației apicale la nivelul tulpinilor generate *in vitro* și înrădăcinarea acestora prin suplinirea mediului de baza cu auxine [65]. Auxinele au rol foarte important în formarea rădăcinilor plantelor, administrate în concentrație scăzute. Paciorek și colab. (2005) afirmă că concentrația mare de auxină exogenă inhibă creșterea rădăcinilor, deoarece inhibă controlul auxinei endogene în plante [157].

Pornind de la ipoteza că mediul de cultură utilizat pentru multiplicarea lăstarilor derivați din meristeme poate să influențeze semnificativ procesul de rizogeneză *in vitro*, experiențele care au vizat determinarea capacității de înrădăcinare a vitroplantelor au fost organizate în funcție de mediul de multiplicare.

Prin urmare, rata de înrădăcinare a lăstarilor (raportul procentual dintre numărul lăstarilor înrădăcinați și numărul total de lăstari transferați pe mediu de înrădăcinare), numărul și lungimea rădăcinilor formate au fost determinate diferențiat, fiecărei variante de mediu de multiplicare corespunzându-i cele trei variante de mediu de înrădăcinare pentru fiecare taxon.

#### **Inducerea procesului de rizogeneză.**

Efectul cumulativ al conținutului endogen de fitohormoni și compoziția mediului de cultură este semnificativ în procesul de stimulare a rizogenezei. De altfel, diferențele de răspuns rizogenetic manifestate între explantele regenerare pe medii de multiplicare cu compoziție diferită sub aspectul balanței hormonale, ar putea fi explicate prin conținutul endogen de fitohormoni asimilați în etapa anterioară de proliferare *in vitro* [49, 112, 160].

Pentru inducerea sistemului radicular, s-a testat mediul de bază MS 100% și MS 50%, lichid și agarizat suplimentat cu concentrații reduse de regulatori de creștere din grupul auxinelor (0,2 mg/l, 0,5 mg/l de AIB, AIA, ANA) (Tabelul 3.7).

**Tabelul 3.7. Influența auxinelor în procesul de creștere și rizogeneză la soiurile goji, după 21 de zile**

Mediul	MS 100% + Auxină (mg/l)			formare a rădăcinilor			Lungimea lăstarului, (cm)
	AIB	AIA	ANA	nr de plante total/înrădăcinate/%			
<b>Ning Xia N1</b>							
M8	0,2	–	–	36	13	36,11	7,53 ± 0,15
M9	0,5	–	–	36	10	27,78	7,42 ± 0,09
M10	–	0,2	–	36	19	52,78	6,12 ± 0,12
M11	–	0,5	–	36	14	38,89	5,08 ± 0,26
<b>M12</b>	–	–	<b>0,2</b>	36	33	91,67	<b>11,60 ± 0,39</b>
M13			0,5	36	30	83,33	8,81 ± 0,63
<b>Erma</b>							
M8	0,2	–	–	36	17	47,22	7,66 ± 0,14
M9	0,5	–	–	36	15	41,67	7,33 ± 0,13
M10	–	0,2	–	36	17	47,22	8,77 ± 0,29
M11	–	0,5	–	36	11	30,56	8,33 ± 0,18
<b>M12</b>	–	–	<b>0,2</b>	36	34	94,44	<b>12,24 ± 0,36</b>
M13			0,5	36	31	86,11	10,87 ± 0,36
<b>New Big</b>							
M8	0,2	–	–	36	13	36,11	6,46 ± 0,14
M9	0,5	–	–	36	11	30,56	6,46 ± 0,19
M10	–	0,2	–	36	16	44,44	6,04 ± 0,17
M11	–	0,5	–	36	14	38,89	4,72 ± 0,15
<b>M12</b>	–	–	<b>0,2</b>	36	35	97,22	<b>13,44 ± 0,22</b>
M13			0,5	36	33	91,67	9,18 ± 0,22
<b>Amber Sweet</b>							
M8	0,2	–	–	36	21	58,33	7,67 ± 0,10
M9	0,5	–	–	36	20	55,56	7,49 ± 0,09
M10	–	0,2	–	36	25	69,44	7,01 ± 0,13
M11	–	0,5	–	36	23	63,89	6,19 ± 0,22
<b>M12</b>	–	–	<b>0,2</b>	36	36	100,00	<b>13,89 ± 0,28</b>
M13			0,5	36	34	94,44	9,62 ± 0,30
<b>Licurici</b>							
M8	0,2	–	–	36	17	47,22	7,52 ± 0,16
M9	0,5	–	–	36	13	36,11	7,16 ± 0,09
M10	–	0,2	–	36	25	69,44	8,29 ± 0,12
M11	–	0,5	–	36	25	69,44	7,23 ± 0,12
<b>M12</b>	–	–	<b>0,2</b>	36	36	100,00	<b>13,89 ± 0,28</b>
M13			0,5	36	33	91,67	12,42 ± 0,23

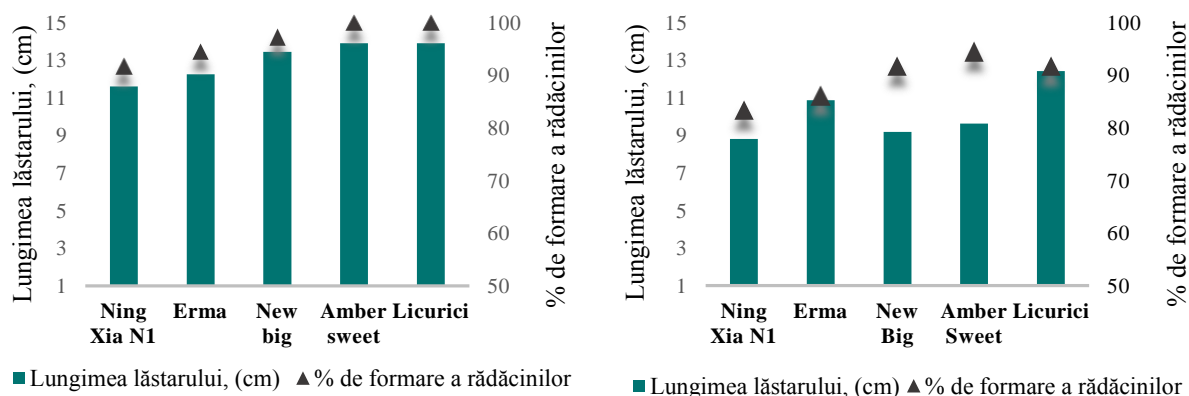
Notă: valorile sunt prezentate sub forma  $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$  (media aritmetică ± eroarea mediei)

Soiurile de goji cercetate au avut un răspuns morfogenic pozitiv și efectiv în ceea ce privește creșterea lăstarului, formarea frunzelor, vigurozitatea lăstarului, formarea procesului de rizogeneză. Aceste rezultate au scos în evidență o corelație pozitivă între compoziția minerală a



mediului de bază MS 100% folosit pentru multiplicarea explantelor și capacitatea lăstarilor de înrădăcinare la soiurile: 'Ning Xia N1', 'Erma', 'New Big', 'Amber Sweet' și 'Licurici'. Rata de înrădăcinare fiind cuprinsă între intervalurile 40,3 - 100 %.

Analiza datelor prezentate cu privire la influența concentrațiilor de auxine relevă faptul că pe mediul de cultură M12 rata de înrădăcinare este de 95% pentru toate soiurile de goji. În cazul plantulelor regenerate pe variantele M10 și M11, cu auxina AIA în concentrații de 0,2 mg/l și 0,5 mg/l, rata de înrădăcinare este de 46%, respectiv 73,3 %. Pe mediu M12 s-a observat inițierea rădăcinuțelor în decurs de 14 zile de la transferul *in vitro*, iar peste 20-25 de zile se remarcă o creștere considerabilă a plantulei, care deja poate fi folosită ca material de butășire pentru o pasare ulterioară, iar partea inferioară a plantulei o transferăm la *ex vitro*. Mediul suplinit cu AIB cu aceleași concentrație de 0,2 a prezentat valori ale ratei de înrădăcinare cuprinsă între 40,4% și 74,6% (Figura. 3.9).

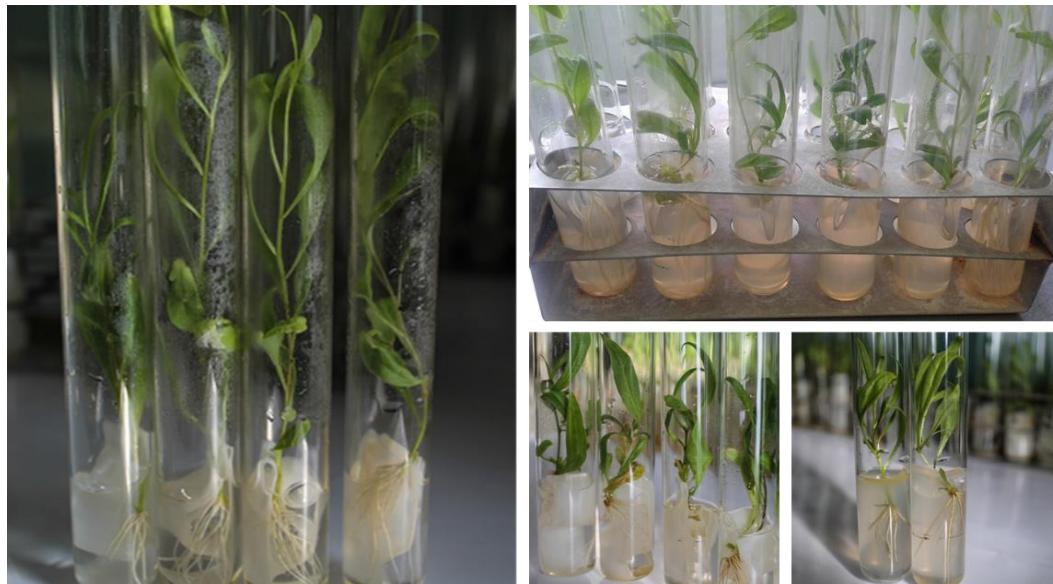


**Fig. 3.9. Capacitatea de înrădăcinare a soiurilor de goji pe mediul MS 100%, ANA de 0,2 mg/l (stânga) și 0,5 mg/l (dreapta)**

Mediul nutritiv MS 50% suplimentat cu auxina ANA de 0,2 mg/l, s-a utilizat pentru conservare, pe o anumită perioadă. Înrădăcinarea îndelungată a soiurilor 'Ning Xia N1', 'Erma', 'New Big', 'Amber Sweet' și 'Licurici' după 30 de zile a depășit doar 16%, iar o creștere sporită a procesului de înrădăcinare de peste 90%, s-a înregistrat după 60 zile (Anexa 3, Figura 3.1).

De asemenea, o altă metodă de conservare este micropropagarea prin culturi de microbutași. Folosind partea apicală și bazal de minibutaș, fiind alcătuite din unul-două internoduri, segmentul de explant trebuie să fie cât mai viguros și sănătos, astfel obținem un material săditor calitativ. Lungimea mini-butașului pentru micropropagare este de 2,0-2,5 cm. Este foarte important ca lăstarul să fie viguros, ca să asigure procesul de micropropagare cu succes. Odată ce lăstarul a atins lungimea de 10,0-12,0 cm este supus butășirii și transferat pe alt mediu nutritiv pentru micropropagarea ulterioară (Figura 3.10).

În acest mod în intervalul de 30-40 zile randamentul de material biologic se mărește de 5-7 ori. Astfel, de strategii de microbutașire, au fost efectuate și la alți arbuști fructiferi, obținându-se 8000 plante dintr-un singură plantulă, într-un an ceea ce oferă o bună stabilitate genetică a materialului obținut [57, 83, 87].



**Fig. 3.10. Înfrădăcinarea plantulelor pe medii nutritive suplinate cu auxine la soiul 'Licurici'**

Creșterea concentrației mai mare de 0,2 mg/l a auxinelor are un efect negativ asupra lungimii lăstarului și o rată de înfrădăcinare mai mică. Rezultate similare au fost obținute de Kobayashin A. și colab. prin aplicarea concentrațiilor mai mari (0,2 sau 0,5 mg/l) de auxine selectate: ANA, AIB și AIA. După trei săptămâni lungimea lastarilor a fost mică (2-3 cm) comparativ cu concentrațiile optime de auxine [81, 116, 287].

### **3.5. Organogeneza *in vitro* la soiurile de goji (cultura de calus)**

Majoritatea plantelor cultivate, în special acelea, care se înmulțesc vegetativ, întotdeauna sunt supuse infecțiilor, provocate de viruși și de microorganisme patogene. Bolile plantelor duc la micșorarea productivității și calității lor. Numeroase studii, au stabilit, că la plantele libere de patogeni, productivitatea poate fi mărită cu 30% [58, 162, 229]. Pe lângă utilizarea culturii de meristeme, o altă metodă de însănătoșire a plantelor, aplicată pe larg la multe culturi, constă în multiplicarea clonală cu folosirea culturii de calus. Calusul este o masă neorganizată de celule, diferențiate cu o capacitate variabilă de proliferare, care apare în urma unei răniri mecanice suferită de plantă ca formă de apărare și regenerare celulară [180, 297, 309].

Cultura de calus este încă în studiu și știința urmează să răspundă la o serie de întrebări ce țin de evoluția culturilor de calus, a stabilității genetice a plantelor obținute din culturile de calus,

motiv pentru care, deși este prima cultură încercată a biotehnologiilor horticole *in vitro*, ea are încă multe necunoscute [99, 170].

Este folosită mai rar în scopurile obținerii materialului săditor *in vitro*, deși are părțile ei pozitive, precum și anumite avantaje cum ar fi: efectivă și economă, deoarece în precesul înmulțirii din fiecare celulă de calus individuală, în condiții favorabile, pot să formeze muguri adventivi (merestemoizi), care dau naștere plantelor noi; plantele obținute se deosebesc genetic și morfofiziologic, ceea ce dă posibilitatea amelioritorilor să efectueze selectarea plantelor după unele caractere valoroase și să aprecieze comportarea lor în câmp. Prin cultura de calus au fost înmulțite mai multe specii horticole: *Actinidia arguta*, *Rubus idaeus*, *Rubus fruticosus*, *Fragaria sp.* etc [97, 203, 281].

În contextul celor menționate, ne-am propus în cadrul acestei lucrări să obținem material săditor omogen și necontaminat de goji și prin cultura de calus. În scopul cercetării acțiunii citochininelor și auxinelor asupra proceselor morfogenetice la nivel de calus la specia *L. barbarum* au fost inițiate culturi de calus din sursa de explant: disc de limb foliar, segment de pețiol. Pentru testarea răspunsului la prezența citochininelor și auxinelor în mediul de cultură, au fost utilizați fitoregulatorii BAP și 2,4D în diferite corelații și proporții, care conform literaturii de specialitate [114] prezintă un interes deosebit, datorită acțiunii lor extrem de efective asupra creșterii și dezvoltării explantelor de goji în cultura *in vitro*.

Inițial au fost experimentate șapte variante de medii nutritive cu concentrațiile: control (0 mg/l); citochinina: BAP (0,1 mg/l; 0,3 mg/l) și auxina: 2,4D (0,3 mg/l; 0,5 mg/l; 1,0 mg/l). Inițierea proceselor de calusogeneză la *L. barbarum* L. este determinată de așa factori ca: tipul explantului, mediul nutritiv, regulatorii de creștere și pH-ul mediului. În urma investigațiilor efectuate s-a determinat, că pe mediul BAP în combinație cu 2,4D în diferite concentrații majoritatea explantelor au produs calus. Datorită acestor medii s-a declanșat procesul de formare a masei calusale și de regenerare din el a meristemoizilor, ulterior și a neoplantulelor.

Inducerea calusogenezei și regenerării de lăstari din calus la soiurile de goji 'Ning Xia N1', 'Erma', 'New Big', 'Amber Sweet' și 'Licurici', a fost inițiată atât din fragmente de pețiol (5-7 mm lungime), cât și din fragmente de frunză (3-5 mm diametru), recoltate de la plantule regenerate *in vitro*. Plantele donor de la care s-au excizat frunzele au fost cultivate pe mediul MS 100% suplinit cu 0,2 mg/l ANA, pentru ca microplantulele să asimileze o cantitate mai mare de fitohormoni, iar explantele să aibă un potențial sporit de regenerare a lăstarilor. Acest studiu s-a efectuat în 3 repetări, pe perioada lunilor aprilie – mai, a câte 36 probe timp de 30 zile. Mediile nutritive pentru calusogeneză s-au preparat conform metodelor descrise în [290, 291]. Pentru menținerea culturilor calusare a soiurilor cercetate, în cultura *in vitro*, este necesar respectarea

următoarelor condiții de cultivare: temperatura de  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ , fotoperiodismul de 16 ore lumină și umiditatea aerului în încăperea nu mai joasă de 65% [29, 134]. După 10 zile de la inoculare s-a constatat inițierea și dezvoltarea proeminențelor de celule calusare pe toate mediile de cultură.

**Procesul organogen la goji.** Ca rezultat al testărilor efectuate privind obținerea plantulelor din calus s-a urmărit scopul de a determina durata perioadei de calusogeneză și organogeneză la explantele din frunzele și pețiolul vitroculturilor de goji. Calusul dezvoltat din discul limbului foliar și segmente de pețiol pe mediile experimentale  $M_1$ - $M_7$ , în diferite combinații și concentrații al regulatorilor de creștere a indus proliferarea celulară, evidențiată inițial, prin deformarea explantelor somatice, ce variază ca formă, culoare și consistență (Tabelul 3.8). În varianta martor, după 14 zile s-au observat primele procese de necrotizare, care au avut loc în zona de rănire a fragmentelor de frunză și a segmentelor de pețiol, după următoarele 20 de zile, necroza explantelor somatice fiind totală.

**Tabelul 3.8. Influența fitohormonilor asupra inițierii și dezvoltării calusului la diferite tipuri de explante la soiurile de goji 'Ning Xia N1', 'Erma', 'New Big', 'Amber sweet' și 'Licurici', după 35 zile**

Mediu: MS 100% 2,4D + BAP mg/l	Tipul explantului (segmente)	Culoarea calusului	Consistența calusului 1-4
$M_1$ : 0,0 + 0,0	Pețiol	-	-
	Frunză	-	-
$M_2$ : 0,3+0,1	Pețiol	Verde-albicios	++
	Frunză	Verde-albicios	++
$M_3$ : 0,3 + 0,3	Pețiol	Verde-albicios	++
	Frunză	Verde-albicios	++
$M_4$ : 0,5+ 0,1	Pețiol	Verde	+++
	Frunză	Verde	+++
$M_5$ : 0,5 + 0,3	Pețiol	Verde	++
	Frunză	Verde-albicios	++
<b><math>M_6</math>: 1 +0,1</b>	<b>Pețiol</b>	<b>Verde intens</b>	<b>++++</b>
	<b>Frunză</b>	<b>Verde</b>	<b>+++</b>
$M_7$ : 1 +0,3	Pețiol	Verde- brun	++
	Frunză	Verde-brun	++

Notă: Auxină (2,4D) +Citochinină (BAP); +: Foarte puțin calus, ++: Calus minor, +++: Calus moderat, ++++: Calus omogen.

Un calus friabil, morfogen a fost bine dezvoltat după aproximativ 40 - 45 zile de la inocularea *in vitro* a explantelor somatice. Țesutul calusal s-a format la suprafața mediului nutritiv formând o masă amorfă de celule parenchimatice cu pereți subțiri, fără o anumită structură anatomică. Masa de calus a avut diferite culori: verde, verde-albicios, verde cu nuanțe gălbui. Conform datelor din literatură, calusul generat din fragmente de limb foliar și pețiol manifestă astfel de culori, deoarece celulele conțin clorofilă [69, 158]. Diferite mase calusare formate au fost menținute pe aceleași medii nutritive (fără divizarea și subcultivarea acestora), până la formarea lăstarilor. Probabil, că

este o consecință a prezenței în cantități sporite a hormonilor de creștere în zonele de rănire [107], stimulând astfel proliferarea celulară. Calusogeneza a fost inițiată în special în zona de rănire a explantelor, și uneori dispersat pe suprafața acestora.

Deoarece scopul propus de noi este nu doar obținerea calusului propriu-zis, dar nemijlocit proliferarea lui, cel mai bine răspunde la calusogeneză fragmentele de pețiol, pe mediul M<sub>6</sub> cu adaos 2,4D (1,0 mg) în combinație cu BAP (0,1 mg), cu o valoare de 100 %, iar din disc de limb foliar un procent mediu de 55,7% (Anexa 2, Figura 2.1) pentru toate soiurile de goji. Eficiența căruia s-a dovedit prin rezultatele care depășesc datele din literatura de specialitate [176].

Explantatele din fragmente de limb foliar cultivate pe mediul M<sub>6</sub>, s-au gofrat și s-au mărit în dimensiuni după 14-20 zile de la inoculare. La periferia limbului apar proeminențe sferice de calus verde, unele verde-albicios. Studiul de sinteză privind inițierea și proliferarea calusului are loc prin formarea meristemoizilor sau noduli embriogeni, care devin centre morfogene [193].

Centrele morfogene se află la suprafața masei calusare inițiate din masele proembriogene, iar la periferii sunt protejate de celulele parenchimatice ale calusului care au pereții mai îngroșați. Calusul generat pe mediul M<sub>6</sub> este optic dens, compact și morfogen. 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 inițiază formarea meristemoizilor [306]. Dezvoltarea mai viguroasă a centrelor morfogene depinde de anumiți factori: durata perioadei de cultivare a calusului, regulatori de creștere, sezon, stadiul de dezvoltare al plantei, partea plantei cercetate, precum și de factorii externi (lumina, umiditate și temperatura) [181].

Mediile: M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, M<sub>3</sub>, M<sub>4</sub>, M<sub>5</sub>, M<sub>7</sub> suplinit cu BAP și 2,4D în cantități de (0,1; 0,3, 0,5; 1 mg/l) combinate între ele, din fragment de frunză și pețiol, a dezvoltat masă calusară nonregenerativă de consistență friabilă. Fiind în totalitate non-morfogen, calusul începe să necrotizeze după 35-40 zile. Observațiile efectuate asupra caracteristicii calusului au scos în evidență faptul, că culoarea lui este de un verde gălbui în cazul explantelor din pețiol și un verde puțin mai intens pentru limbul foliar. În dependență de tipul explantului, s-a constatat o variație a consistenței calusului format, fiind mai puțin pronunțată pentru pețiol.

### **Regenerarea de neoplantule din calusuri menținute pe medii de cultură agarizate**

Un aspect important este de a determina modul de dezvoltare a diferitor tipuri de explante în timpul derulării proceselor morfogenetice la nivel de calus, axată pe componența mediului de cultură și fitohormonilor, prin evidențierea modului de apariție a lăstarilor. Observațiile efectuate au scos în evidență faptul, că geneza lăstarilor diferă de la un tip de explant la altul. În cazul calusului derivat din pețiol s-au format 2- 3 lăstari situați în partea apicală, fapt menționat și în lucrările lui Osman (2013) [154]. La etapa dată, cercetările au urmărit studierea comportării diferitor tipuri de

explante, în faza menționată, ce au constat în determinarea numărului și lungimii lăstarilor regenerați, pe fiecare lăstar aparte.

Procesul de proliferare a calusului și de inițiere a procesului morfogenetic este mai pronunțat la explantele de pețiol, deși primele apariții au fost semnalizate la explantele cu origine din limb foliar. Este important de menționat, că în timpul cultivării *in vitro* nu toate centrele meristematice au evoluat în minilăstari. Reducerea semnificativă a numărului de lăstari regenerați poate fi cauzată de un șir de factori endogeni, exogeni, de numărul pasărilor, de condițiile de cultură și de vârsta calusului. Apariția lăstarilor la nivel de calus derivat din segment de pețiol a avut loc din diferite centre meristematice, formând astfel o rozetă a câte 6-8 minilăstari (Anexa 2, Figura 2.2). Astfel, proliferarea calusului este diferită, în funcție de cultivarul analizat.

Cea mai bună proliferare a fost observată în cazul cultivarului 'New Big' cu un număr maxim de lăstari de 8,22, urmat de cultivarele: 'Erma', 'Licurici', 'Amber Sweet' cu un număr mediu de lăstari proliferați 7,17; 7,50 și 7,94. Valori minime înregistrează și cultivarul 'Ning Xia N1' de 6,83 lăstari. Este important de menționat, că lăstarii s-au format, în special de-a lungul nervurilor, date confirmate și de Hu (2008) [222]. Au fost generate plantule, din limb foliar la soiurile 'Ning Xia N1' cu un număr mediu de 1,89 lăstari, 'Licurici' 3,28 lăstari și 'Amber Sweet' cu în număr mediu de 3,39 lăstari, pe când pentru soiurile 'Erma' și 'New Big' dezvoltarea de lăstari a fost nulă (Tabelul 3.9).

**Tabelul 3.9. Caulogeneza din disc de limb foliar și segment de pețiol, după 30 zile**

Mediul	Soiul	Numărul explantelor care au format calus		Lungimea plantulelor din pețiol (cm)	Lungimea plantulelor din foliar (cm)
		segment de pețiol	disc de limb foliar		
M <sub>6</sub>	Ning Xia N1	6,83±0,17	1,89±0,22	1,55 ±0,06	1,15 ±0,11
	Erma	7,17±0,48	Nu sa dezvoltat	2,48 ±0,14	-
	New Big	8,22±0,19	Nu sa dezvoltat	2,48 ±0,10	-
	Amber Sweet	7,94±0,27	3,39±0,28	2,87 ±0,08	2,89 ±0,21
	Licurici	7,50±0,27	3,28±0,35	3,06 ±0,35	2,19 ±0,09

Notă: valorile sunt prezentate sub forma  $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$  (media aritmetică ± eroarea mediei); M<sub>6</sub> - 2,4D 1 mg/l + BAP 0,1 mg/l.

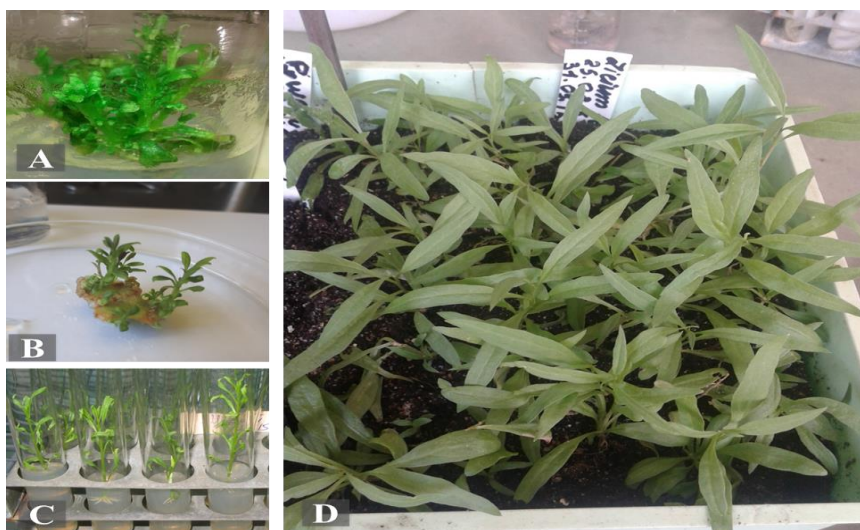
Comparativ cu inducerea și proliferarea calusului, caulogeneza s-a desfășurat cu o frecvență relativ medie pentru soiurile de goji. Numărul mediu al explantelor din pețiol care au dus la regenerarea de muguri și lăstari adventivi fiind de 1,55 cm la soiul 'Ning Xia N1', 'Erma' și 'New Big' de 2,48 cm, 'Amber Sweet' 2,87 cm și respectiv 'Licurici' în mediu de 3,06 cm.



Caulogeneză atestată pe mediul adiționat cu 2,4D de 1 mg/l și BAP 0,1 mg/l, la soiurile 'Amber Sweet' a înregistrat lungimea maximă a lăstarilor de 2,95 - 2,95 cm, urmat de soiurile 'New Big' cu 2,47 cm și 'Licurici' 2,54 cm, soiul 'Ning Xia N1' cu cea mai mică lungime de 1,47 cm.

Analiza rezultatelor experimentale au evidențiat influența favorabilă a mediului de cultură suplimentat cu 2,4-D și BAP în raport 1,0:0,1 mg/l (mediul M<sub>6</sub>) asupra calusogenezei la soiurile: 'Ning Xia N1', 'Erma', 'New Big', 'Amber Sweet' și 'Licurici'. Numărul calusurilor care au regenerat lăstari, precum și numărul plantulelor neformate a fost determinat după două luni de cultură *in vitro*, când a fost remarcată îmbătrânirea calusului, iar frecvența de regenerare de lăstari nu a mai înregistrat nici o modificare (Anexa 2, Figura 2.1).

Lăstarii obținuți la nivelul calusului au fost prelevați de pe acesta și au fost inoculați pe medii de cultură proaspete la interval de 4 săptămâni. Pentru creșterea și înrădăcinarea *in vitro* a lăstarilor s-a folosit mediul de bază MS 100% și auxina ANA de (0,2 mg/l) ca și în cazul plantelor obținute prin cultura de meristeme (Anexa 2, Figura 2.3). Rizogeneză a dat rezultate satisfăcătoare. Formarea acestora a fost vizibilă după 14 zile de cultivare (Figura 3.11). Sistemul radicular este bine dezvoltat, tulpină formată din câteva internoduri.



**Fig. 3.11. Regenerarea lăstarilor din calusul derivat din fragment de frunză, pe mediul M<sub>6</sub> la soiul 'Erma', după 14 - 30 zile**

*Notă:* **A** - dezvoltarea lăstarilor din masa calusară cu origine de pețiol; **B** - dezvoltarea lăstarilor din masa calusară cu origine de limbul foliar; **C** înrădăcinarea plantulelor în condiții *in vitro*; **D** - plantule acclimatizate.

Dezvoltarea acestor plantule sunt identice cu creșterea și formarea rizogeneză, comparativ cu plantele obținute tradițional din meristeme prin micropropagare. Rezultatele obținute confirmă faptul, că o dezvoltare satisfăcătoare au avut explantele cu origine din limb foliar, iar cea mai bună comportare a fost atestată la explantele provenite din pețiol. Plantulele obținute din masa calusală, pe mediul M<sub>6</sub> sunt sănătoase, robuste, viguroase, nu se contaminatează în cultura *in vitro* după pasări ulterioare și nici la transfer *ex vitro*. Plantele regenerate au fost transplantate în ghivece după 14

zile și transferate în seră, pentru creșterea și dezvoltarea ulterioară, timp de o lună plantulele au fost menținute în seră. Plantele regenerate purtau trăsături morfologice normale ca și planta donor.

### **3.6. Aclimatizarea materialului săditor obținut prin cultura *in vitro***

Aclimatizarea *ex vitro* este etapa finală a micropropagării. În această fază se efectuează trecerea treptată a plantulelor de la condițiile de viață artificiale, neobișnuite, din cultura *in vitro* în condiții de asepsie strictă, temperatură controlată și umiditate foarte ridicată circa 90-95% la condițiile obișnuite din seră (*ex vitro*) sau câmp, apropiate de condițiile naturale. Această fază intermediară este necesară pentru vitroculturile ce nu pot supraviețui în cazul transferului direct în condiții naturale, deoarece nu prezintă caracteristicile fiziologice necesare. În timpul fazei de aclimatizare are loc dezvoltarea normală a plantulelor și dobândirea caracteristicilor fiziologice care le asigură supraviețuirea în condiții de mediu normale, necontrolate artificial [63, 65, 122]. Principala problemă a plantulelor cultivate *in vitro* este inexistența unor formațiuni adecvate care să le asigure supraviețuirea în condiții naturale de umiditate. Astfel, nu există o cuticulă adecvată, stomate funcționale, care ar permite reglarea transpirației. Principalul factor de mediu care trebuie controlat în mod artificial în faza de aclimatizare este umiditatea aerului, pentru a preveni deshidratarea plantulelor [32, 38]. În procesul de adaptare a plantulelor în condiții *ex vitro* se ține cont în mare măsură de substraturile în care se plasează plantulele înrădăcinate și de respectarea factorilor de mediu strict controlați în special: temperatura, gradul de umiditate gradul de luminozitate, valoarea pH-ului, compoziția substratului [29, 52].

Aclimatizarea plantulelor de goji s-a realizat prin metode clasice (substrat solid și umiditate atmosferică ridicată). Au fost testate și utilizate trei tipuri de substrat (Tabelul 3.10).

Aclimatizarea eficientă a plantulelor de goji s-a realizat în două etape în decursul a 30-40 de zile:

- *etapa I* - Plantulele de goji (minibutașii) cu o lungime de 2,5 cm înrădăcinate *in vitro* s-au transferat în caserole de plastic cu cele trei substraturi fiecare separat, în condiții de seră. Menținerea umidității de 70-90% se face prin acoperirea acestora cu folii de polietilenă transparentă, perforată și se descoperă gradual, timp de 2 săptămâni până apar primele 2 frunzulițe la apexul plantei (Anexa 4, Figura 4.1). Aerisirea se face de 2-3 ori pe zi, se pulverizează în ceață cu apă deionizată și se mențin la temperatura aerului de 23-25°C.
- *etapa II* - Caserolele cu plantule de goji, care au atins 5-7 cm în lungime și au 5-7 frunze formate s-au transferat pe un substrat compus din sol de gazon, turbă, nisip, în proporții de 1:0,25:0,25, în vase vegetative de 500 ml, sub un carcas de pânză, amplasat ca soarele să pătrundă doar dintr-o direcție.



**Tabelul 3.10. Influența substratului asupra aclimatizării plantelor de goji**

Substratul	Soiul	Totalul de plante		
		Nr. total de plante transferate în etapa <i>ex vitro</i>	Nr. de plante aclimatizate	% de aclimatizare
V1	'Ning Xia N1'	36	29	80,5
	'Erma'	36	31	86,1
	'New Big'	36	34	94,5
	'Amber Sweet'	36	33	91,6
	'Licurici'	36	33	91,6
V2	'Ning Xia N1'	36	15	41,6
	'Erma'	36	17	47,2
	'New Big'	36	23	63,8
	'Amber Sweet'	36	19	52,7
	'Licurici'	36	20	55,5
V3	'Ning Xia N1'	36	18	50,0
	'Erma'	36	22	61,1
	'New Big'	36	28	77,7
	'Amber Sweet'	36	24	66,6
	'Licurici'	36	23	63,8

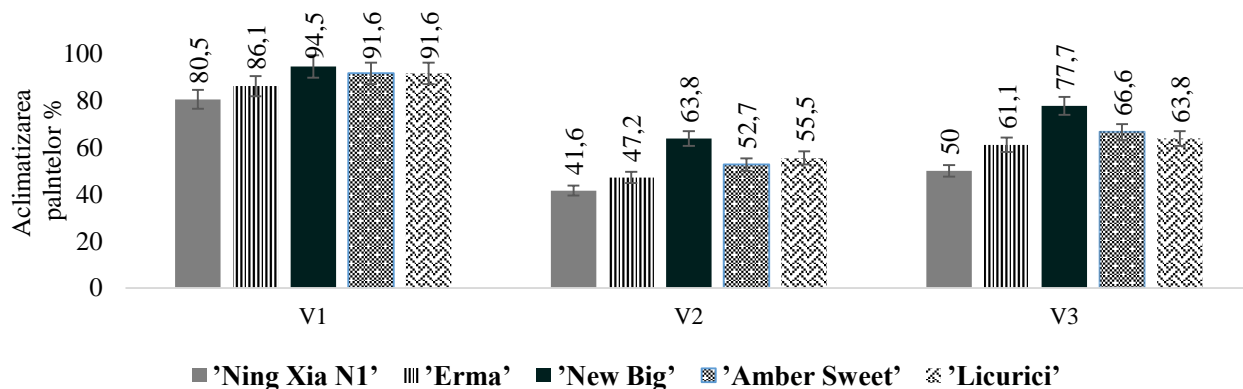
Pentru aclimatizarea definitivă, plantele se mențin timp de 15-20 de zile. Adaptarea la condițiile de mediu *ex vitro* impune reducerea treptată a umidității atmosferice la (Figura 3.13).



**Fig. 3.13. *Lycium barbarum* L în etapa a II-a de aclimatizare, după 30 zile**

Observațiile fenotipice și analiza rezultatelor înregistrate, au arătat că cel mai efectiv substrat s-a dovedit a fi V1, amestecul de substrat din sol de gazon, turbă, perlit, nisip și mranită în proporții de 1:0,5:0,25:0,25:1. Astfel, din reprezentarea grafică a datelor (Figura 3.14) se observă că peste 90% de plante au fost aclimatizate la soiurile 'New Big', 'Amber Sweet' și 'Licurici', urmat de soiurile 'Ning Xia N1' și 'Erma' cu peste 80 – 85 %. Plantele de goji sădite pe substratul V3, a înregistrat o pondere de circa 75%, urmat de varianta V2 cu 60% de plante aclimatizate la toate soiurile de goji (Anexa 5, Figura 5.1).

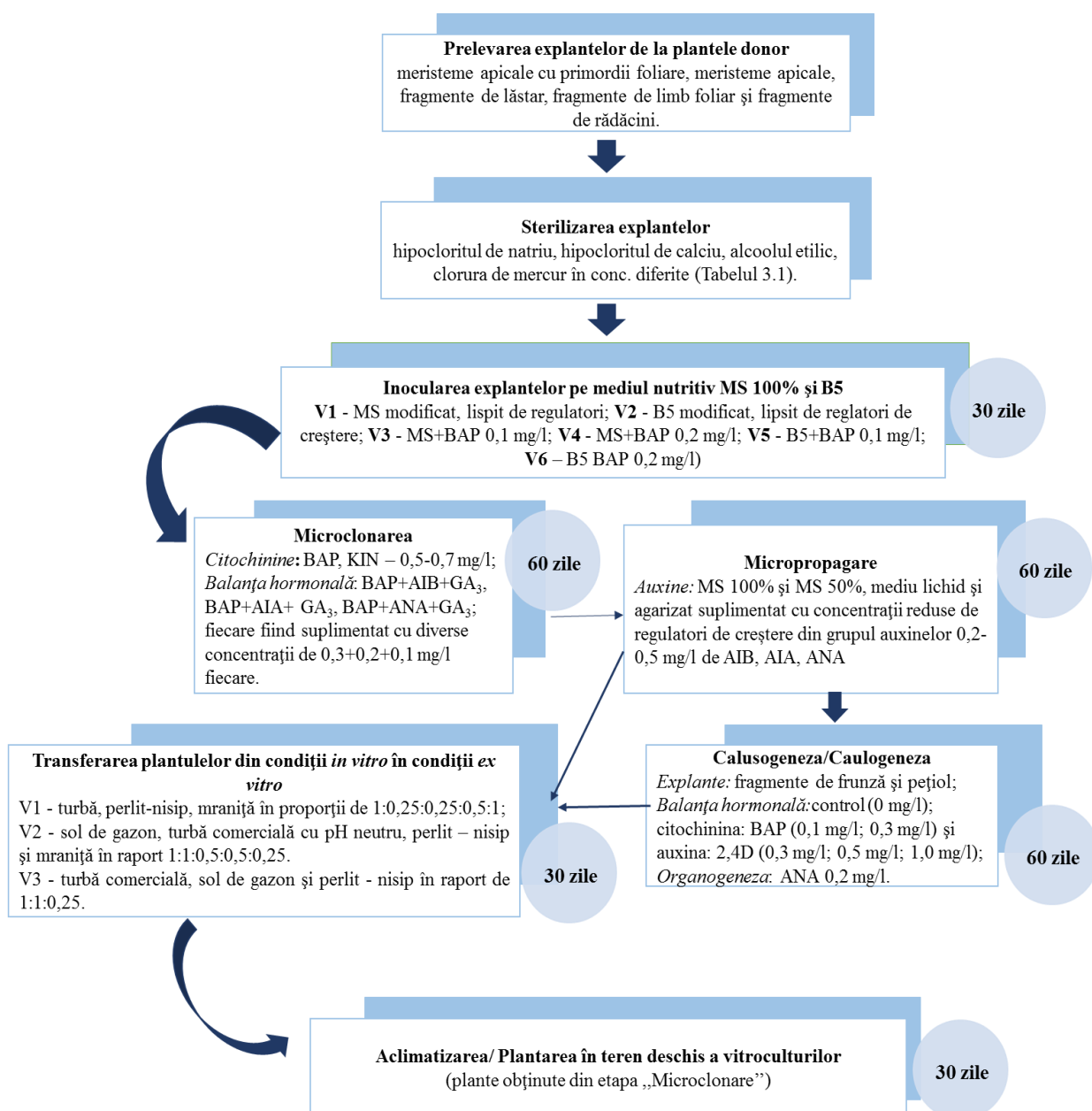
Aclimatizarea plantulelor trebuie să fie un proces lent, care să permită adaptarea treptată a plantelor de la condițiile *in vitro* la cele *ex vitro*, ceea ce presupune adaptarea la o umiditate relativ scăzută, cu dezvoltarea mecanismelor de închidere și deschidere a stomatelor și la accelerarea procesului fotosintetic [29, 60, 294].



**Fig. 3.14. Aclimatizare soiurilor de goji în I etapă**

Tratamentele fitosanitare cu fungicide și tratamentele cu soluții nutritive s-au efectuat cu scopul de a favoriza creșterea plantei în ansamblu și dezvoltarea sistemului radicular. Un alt factor important este protejarea de dăunători. 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 goji este musculița albă de seră (*Trialeuroides vaporariorum*). Pentru protejarea împotriva dăunătorilor s-a utilizat preparatul *Actara*, însă nu se recomandă umezirea în exces a plantelor în a doua jumătate a zilei, deoarece, noaptea se multiplică și produc intensiv sporii micotici (*Mycosphaerella rubi*) [159].

După procesul de aclimatizare, plantele au fost transferate pe terenul experimental (mini colecția de arbuști fructiferi) urmărind procesul de adaptare a lor în condițiile pedoclimatice (descrise în Capitolul 4). Datele obținute și prezentate în acest capitol relevă informații utile precum: selectarea mediilor de cultură, adecvate pentru fiecare etapă de cultivare aplicând combinații speciale de nutrienți, aseptizarea, inocularea, microclonarea și micropropagarea vitroplantulelor de goji. Urmat de procesul *ex vitro*, care se efectuează pe substraturi testate în II etape de aclimatizare și plantarea în terenul experimental, ulterior fiind corelate cu particularități biologice, anatomice și biochimice. În Figura 3.15 este redată totalitatea proceselor ce au avut loc la nivelul explantelor de goji în vederea producerii de material săditor, permițând astfel obținerea plantelor inițiale absolut sănătoase.



**Fig. 3.15. Etapele cultivării *in vitro* a speciei *Lycium barbarum L.***

### 3.8. Concluzii la capitolul 3

1. Introducerea soiurilor 'Ning Xia N1', 'Erma', 'New Big', 'Amber Sweet' și 'Licurici' *in vitro*, a fost efectuată cu succes, grație cercetărilor realizate privind elaborarea protocolului de aseptizare a materialului biologic. Testarea unui șir de sterilizanți a fost realizată experimental. În calitate de agent sterilizant efectiv s-a evidențiat clorura de mercur de 0,01 %, cu o durată optimă de tratare de 7 minute, pentru toate tipurile de explant.

2. Inițierea și stabilizarea culturii *in vitro* la soiurile de goji a fost marcată la explantele de tip meristem apical urmată de meristeme apicale cu primordii foliare, inoculate pe mediu de cultură MS 100% și B5, modificat (mio-inozitol - 50 mg/l, zaharoză - 35 g/l, agar - 6 g/l, pH 5,8) cu adaos

de BAP – 0,2mg/l cu diferențe semnificative la nivelul plantulelor inițiate pe mediul MS 100%. Astfel, datele privind rata înaltă de plantule inițiate cu o frecvență de 94,4% la soiurile 'New Big' și 'Licurici', urmată de soiurile 'Amber Sweet' cu 83,3%, 'Ning Xia N1' 77,2% și 'Erma' cu 80,2%.

3. Influența citochininei BAP 0,5 mg/l a determinat rata de proliferare sporită, acestea depășind în mediu 22,06 de lăstari/explant pentru soiul 'Amber Sweet', urmat de 'Licurici' cu 20,17, 'New Big' - 16,11, 'Erma' 14,72 și 'Ning Xia' 14,11 lăstari formați. Deși la soiurile cercetate, numărul de lăstari nu diferă esențial, aceste diferențe sunt statistic semnificative, iar citochinina KIN în concentrațiile de 0,5 și 0,7 mg/l a determinat o rată de multiplicare inferioară celor obținute cu BAP 0,5 mg/l. Regenerarea de plantule pe mediul BAP cu 0,7 mg/l a înregistrat rate de multiplicare nesemnificative, vitrificate și cu formarea de calus la baza plantulelor.

4. Combinațiile și concentrațiile de regulatori de creștere asupra ratei de multiplicare și procesului de creștere *in vitro* s-a dovedit a fi optima varianta BAP 0,2 mg/l + ANA 0,2 mg/l + GA<sub>3</sub> 0,1 mg/l, care a determinat rate de proliferare rezonabile și lăstari relativ bine dezvoltați și totodată a asigurat rate de multiplicare inferioare celor obținute cu BAP de 0,5 mg/l. Astfel, numărul mediu de lăstari regenerați a fost ridicat la valori de 4,56 la soiul 'Ning Xia N1' și de 4,94 la soiul 'Erma'. Cea mai sporită proliferare de lăstari se evidențiază la soiurile 'New Big' de 6,94, urmat de 'Amber Sweet' - 5,06 și 'Licurici' cu 5,22.

5. Înfrădăcinarea *in vitro* și creșterea în lungime a plantelor a fost indusă pe mediu nutritiv MS 100%, suplinit cu auxine AIB, AIA, ANA cu concentrații de – 0,2 – 0,5 mg/l fiecare și MS-50% modificat. S-a remarcat mediul M12 de 0,2 mg/l ANA, în care procentul de înfrădăcinare a depășit 90% la toate soiurile de goji. Mediul MS 50% adăugat cu aceeași concentrație de ANA, s-a dovedit a fi rentabil, optim și eficient pentru conservarea materialului de goji.

6. Pentru inducerea calusogenezei și proliferarea plantulelor din masa calusară, s-a evidențiat mediu optim MS 100% adăugat cu regulatorii de creștere 2,4D de 1,0 mg/l și BAP 0,1 mg/l. Evoluția cea mai bună, au prezentat-o explantele de tip pețiol comparativ cu cele din limb foliar, la toate soiurile luate în studiu.

7. Aclimatizarea plantelor înfrădăcinate *in vitro* s-a realizat în două etape. Au fost testate și utilizate trei tipuri de substrat, dintre care substratul V1 compus din sol de gazon, turbă comercială, perlit, nisip și mranită în raport 1:0,5:0,25:0,25:1 s-a dovedit a fi cel mai eficient, asigurând un procent de aclimatizare sporit, de peste 90% la toate cele 5 soiuri de goji. Perioada de aclimatizare optimă este pe parcursul lunilor de primăvară, vară și toamnă.

#### **4. STUDIUL MORFO-ANATOMIC ȘI BIOCHIMIC COMPARATIV AL SPECIEI *LYCIUM BARBARUM L.***

Cercetarea particularităților biologice de creștere și studiul fitochimic prin identificarea și dozarea substanțelor biologice active a speciei *L. barbarum L.* sunt puține și incomplete, de aceea este oportună efectuarea unor cercetări mult mai ample. Prin aceste cercetări se urmărește adaptarea individuală a soiurilor de goji în condițiile pedoclimaterice ale R. Moldova, cum ar fi: schimbări morfologice, anatomice, fiziologice și biochimice. Creșterea valorii economice a speciei se datorează proprietăților nutriționale și terapeutice multiple recunoscute pe plan mondial [145, 178, 192].

Astfel, în cadrul investigațiilor prezentate în acest capitol s-au urmărit următoarele aspecte:

- *studierea fazelor de vegetație a taxonilor studiați;*
- *determinarea parametrilor morfologici: înălțimea plantelor, numărul de ramuri per plantă, lungimea ramurilor, numărul de frunze la faza vegetivă;*
- *elucidarea indicilor morfo-anatomici (frunza de mijloc a tulpinei) a soiurilor de goji comparativ cu specia din flora spontană, în contextul rezistenței la condițiile nefavorabile;*
- *analiza calitativă și cantitativă a unor compuși biochimici utili.*

##### **4.1. Aspecte fenologice ale arbuștilor din specia *Lycium barbarum L.***

Perioada de vegetație reprezintă secvență din ciclul biologic anual în care procesele fiziologice se manifestă cu intensitate sporită și produc modificări anatomo-morfologice vizibile [296].

Parcursul fazelor de vegetație ale plantelor din specia *L. barbarum L.* s-a înregistrat pe baza observațiilor efectuate la ieșirea plantelor din stadiul de dormanță în primul an (martie 2017) și respectiv anul doi al culturii (aprilie 2018).

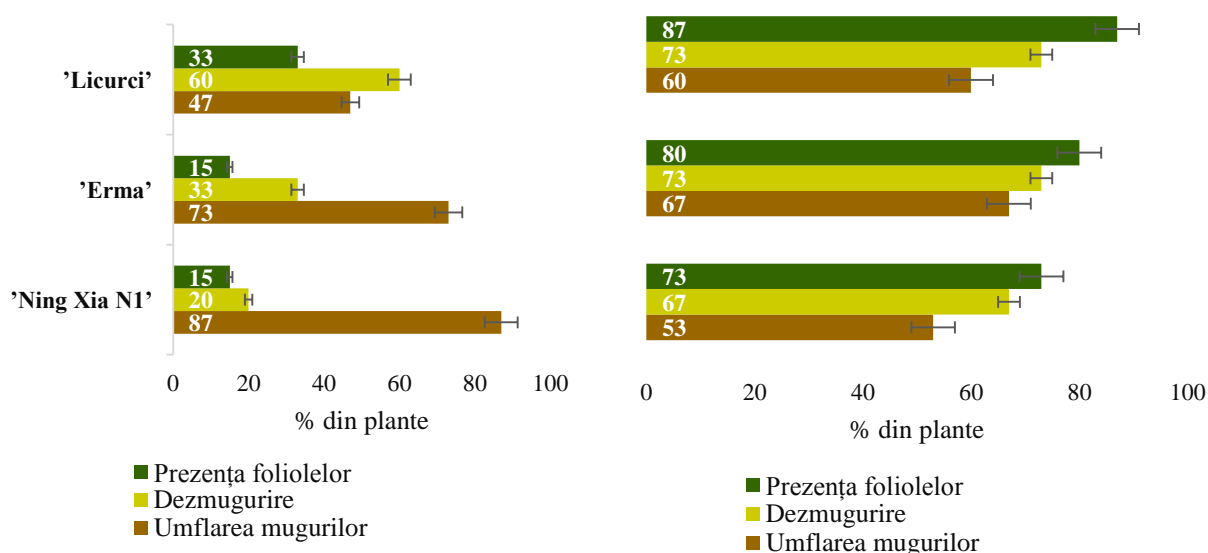
Ca rezultat al cercetărilor efectuate s-a constatat că după ieșirea din stadiul de repaus, mugurii vegetativi parcurg fenofazele într-un ritm alert începând cu prima decadă a lunii martie. Mugurii vegetativi ai plantelor pe aceeași ramură a unei plante, la aceeași dată, pot fi în stadii diferite. Spre exemplu, 87% din plante soiului 'Ning Xia N1' parcurgeau faza de umflare a mugurilor, 20% din plante parcurgeau faza de dezumugurire și 15% prezentau foliole. În ceea ce privește apariția primilor butoni florali, aceștia au fost observați, încă din 2017, pe la mijlocul lunii iunie. Tot în această lună, dar la sfârșitul ei, au apărut și primele flori pe unele plante. Arbuștii au continuat să înflorească până la sfârșitul lunii noiembrie al respectivului an dar fructe nu s-au dezvoltat.

Soiurile 'Erma' și 'Licurici' au avut un debut mai lent al fazelor de vegetație față de cele din anul următor 2017 (Figura 4.1):

- ✓ 47%-73% din plante parcurgeau faza de umflare a mugurilor;
- ✓ peste 33% - 'Erma' și 60% - 'Licurici' din plante parcurgeau faza de dez mugurire;
- ✓ 33% plante a soiului 'Licurici' prezenta foliole, iar soiul 'Erma' 15%.

În 2017, pentru soiul 'Ning Xia N1', prima înflorire a fost observată în luna august, iar ultimele flori au apărut la sfârșitul lui noiembrie, la fel ca și în cazul soiurilor 'Licurici' și 'Erma'. În cel de-al doilea an de la plantare (2018), la începutul lunii aprilie, arbuștii de goji a toate celor trei soiuri studiate, se aflau deja într-un stadiu avansat de parcurgere al fazelor de vegetație:

- ✓ 53%-60% din plante parcurgeau faza de umflare a mugurilor;
- ✓ 67%-73% din plante parcurgeau faza de dez mugurire;
- ✓ 73%-87% din plante prezentau foliole.



**Fig. 4.1. Fazele de dezvoltare a organelor vegetative în anul 2017 (stânga) și în anul 2018 (dreapta)**

Anul următor (plante de II ani 2018), primii butoni florali au apărut la începutul lunii mai la soiurilor 'Licurici' și 'Erma', cu câteva zile mai devreme decât în cazul plantelor soiului 'Ning Xia N1'. După apariția butonilor florali, au apărut și primele flori, iar înflorirea a durat până la începutul lunii noiembrie (până la primele înghețuri).

Menționăm faptul că pe arbuștii de goji a soiurilor studiate, cele trei faze ale mugurilor vegetativi (umflarea mugurilor, dez mugurirea și prezența foliolelor) se regăsesc simultan atât după ieșirea acestora din dormanță, cât și pentru toată perioada de vegetație, înflorire și fructificare.

Contrar anilor precedenți, în 2018, arbuștii de goji 'Licurici' au avut un ritm de parcurgere al fazelor vegetative mai dinamic decât cel al arbuștilor 'Ning Xia N1' și 'Erma'. Astfel, la

începutul lunii aprilie, arbuștii de 'Licurici' se aflau deja într-un stadiu mai avansat de parcurgere al fazelor de vegetație decât arbuștii 'Ning Xia N1' și 'Erma'.

La fel ca și în anul precedent, în 2018, arbuștii 'Licurici' au înflorit mai devreme decât cei de 'Ning Xia N1' și 'Erma'. Astfel că, primele flori au fost observate spre sfârșitul lunii aprilie, aproape cu o lună mai devreme decât în cazul celorlalte două soiuri.

În vederea stabilirii fazelor de dezvoltare a florilor, a mai fost studiată și repartizarea mugurilor, butonilor florali și florilor pe cele 3 segmente ale plantei: bază, median și vârf. S-a constatat faptul, că aproximativ 80% din butonii florali, mugurii și florile acestor arbuși au avut o distribuție mediană, 10% au fost repartizate pe segmentul terminal și doar 5% pe cel bazal. Aceste rezultate au fost valabile pentru toate soiurile în perioadele mai și iunie-iulie ale anului 2017.

În concluzie, se poate afirma faptul că cele trei soiuri au avut o dinamică relativ similară a parcurgerii fazelor vegetative. Menționăm că soiul 'Licurici' a avut un debut mai tardiv în 2017, dar în 2018 a ajuns să le depășească pe celelalte soiuri. Similar, data primei înfloriri a fost mai târzie în 2017 pentru 'Licurici' comparativ cu soiurile 'Ning Xia N1' și 'Erma', însă în 2018 soiul 'Licurici' a fost cel care a înflorit primul. În ceea ce privește perioada de înflorire, toate trei soiuri au continuat să formeze flori până la sfârșitul lui noiembrie, fapt ce denotă, că în zona R. Moldova, perioada de înflorire și fructificare este mai îndelungată decât cea menționată în literatura de specialitate pentru alte zone geografice [139].

#### **Dinamica florală a soiurilor studiate în cadrul speciei *Lycium barbarum* L.**

În scopul introducerii și aclimatizării speciilor noi valoroase este necesar cunoașterea caracteristicilor și dinamica înfloririi pentru cercetarea particularităților biologice ale plantelor. Fiecare specie are adaptări particulare la condițiile de mediu, cum ar fi: schimbări morfo-anatomice și fiziologice ale florii pentru asigurarea polenizării, sau tipul agentului de polenizare [269].

*Particularitățile înfloririi.* Înflorirea este numită etapa de dezvoltare a florii, care începe cu apariția și deschiderea corolei florilor până la ofilirea ei, îndată ce are loc maturizarea androceului și gineceului. Studierii dezvoltării acestor etape la plante li se acordă o atenție specială [272]. Astfel, cercetarea și dinamica morfologiei florilor celor trei soiuri și celei din flora spontană de *L. barbarum* L. studiate a corespuns cu descrierile prezentate în literatura de specialitate. Mai mult, nu au existat diferențe notabile între cele două biotipuri, decât doar lungimea staminelor astfel ca plantele cultivate având o lungime mai mare de 2-3 mm față de arbustul din flora spontană. Așa cum am menționat anterior, pe arbustul de *Lycium* se pot întâlni simultan toate fazele de dezvoltare ale florilor și fructelor (Figura 4.2).





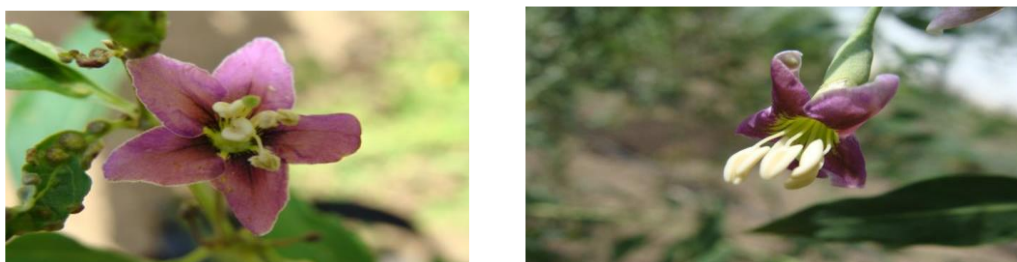
**Fig. 4.2. Fazele de dezvoltare ale florilor de goji cultivat de la mugure florifer, buton floral, înflorire, sfârșitul înfloririi (*stânga*), legarea fructului, până la faza de dezvoltare a fructului (*dreapta*), Iulie 2018**

Florile arbuștilor apar în zona nodurilor, fiind solitare sau în inflorescențe de câte 3-5. Florile sunt infundibuliforme, având 5 petale de o culoare lila deschisă până la un mov intens sau chiar purpuriu. Spre sfârșitul ciclului lor de dezvoltare, florile își pierd treptat culoarea devenind alb-gălbui (Figura 4.3).



**Fig.4.3. Floare de goji cultivat aflată la începutul ciclului său de dezvoltare (*stânga*), sfârșitul ciclului său de dezvoltare (*dreapta*)**

De asemenea, toate florile de *Lycium* au prezentat o serie de dungi închise la culoare ce contrastau cu centrul lor mai deschis. Cum am menționat mai sus, o diferență minoră între cele două biotipuri a fost observată în tendința petalelor florilor din flora spontană care sunt mai reflexe decât cele ale plantelor cultivate (Figura 4.4). Florile au câte 5 stamine mai lungi decât corola la plantele cultivate și stamine mai scurte la florile plantelor din flora spontană, însă anterele sunt dehiscente cu o formă orbiculară la ambele biotipuri.



**Fig. 4.4. Floare de *Lycium barbarum* L. din flora spontană cu petale puternic reflexe (*stânga*), floare de *Lycium barbarum* L. cultivat cu petale foarte puțin reflexe (*dreapta*)**



Similar descrierilor din literatura de specialitate, a fost observat faptul că spre sfârșitul ciclului de viață al florilor arbuștilor de *L. barbarum* L. din câmpul experimental, acestea își apropie anterele de stigmat pentru a înlesni procesul de polenizare (de obicei prin autopolenizare).

#### 4.2. Biometria organelor vegetative ale arbustului de *Lycium barbarum* L.

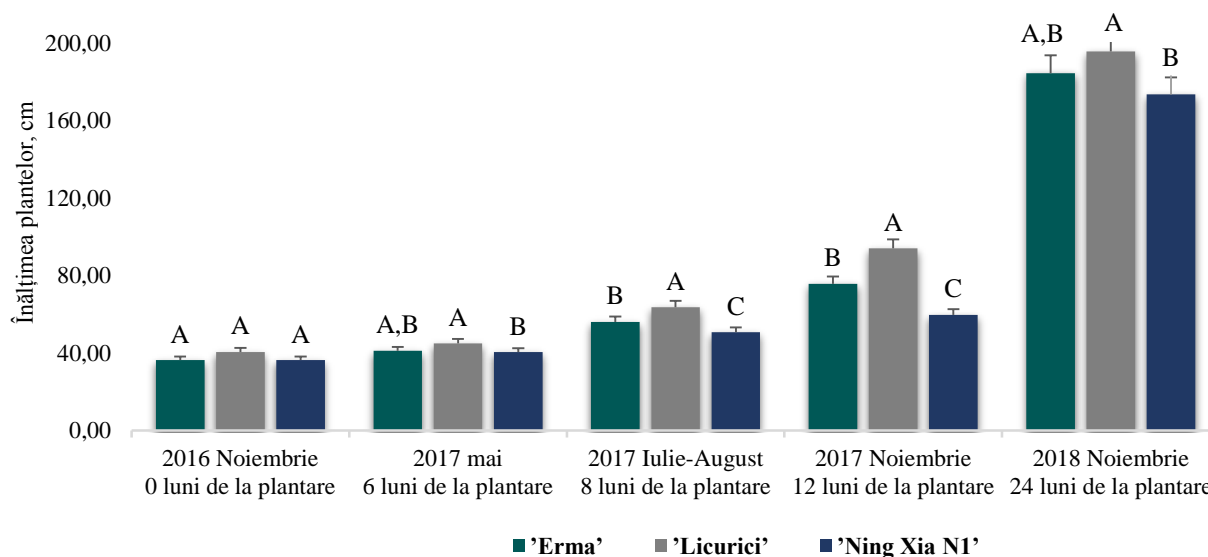
În ceea ce privește caracteristicile biologice ale arbuștilor din specia *L. barbarum* L., în perioada 2016-2018 au fost urmăriți indicatori precum: înălțimea plantei, numărul de lăstari, lungimea lăstarilor și numărul de frunze pe plantele arbuștilor de goji cultivați (Tabelul 4.1).

**Dinamica creșterii în înălțime a plantelor.** Particularitatea studiată a manifestat diferențe semnificative între taxoni, în funcție de perioada analizată (Figura 4.5).

*La plantare (18.11.2016),* înălțimea medie a plantelor din ghivece a fluctuat între 40-50 cm.

*După 6 luni de la plantare (mai 2017),* înălțimea plantelor de *L. barbarum* L. a variat între 45 cm și 55 cm pentru soiul 'Ning Xia N1' 'Erma' și 'Licurici'. Unele plante au avut ramuri ce s-au rupt sub greutatea zăpezii de peste iarnă ce a avut peste 45 cm înălțime în unele porțiuni ale câmpului experimental.

*După 8 luni de la plantare (iulie-august 2017),* s-a observat o dinamică pozitivă de dezvoltare a indicilor biometrici. Cel mai evidențiat indice este înălțimea plantelor caracterizându-se cu o viteză de creștere impunătoare. La sfârșitul lunii iulie înălțimea plantelor atinge valori variate între 55 cm și 60 cm pentru soiurile goji.



**Fig. 4.5. Histograma înălțimii (cm) plantelor pe parcursul a doi ani de la plantare, la cele trei soiuri de goji**

*Notă:* analiza statistică realizată prin ANOVA, (barele reprezintă abaterea standard; A, B, C, D: interpretarea semnificației diferențelor, cu ajutorul testului Bonferroni,  $p < 0,05$ ) dintre soiuri.

Analiza de varianță unifactorială a relevat diferențe semnificative ( $p < 0,05$ ) între soiuri, a înălțimii medii a plantelor după 6 luni de la plantare de 44,87 cm pentru 'Licurici', 41,00 cm pentru 'Erma' și respectiv față de soiul 'Ning Xia N1' cu înălțimea de 40,33 cm.

Semnificativ distincte una față de cealaltă au fost plantele soiului 'Licurici' și 'Ning Xia N1'. O diferență mai puțin semnificativă a fost între soiul 'Licurici' și 'Erma'.

*După 12 luni de la plantare (noiembrie 2017)*, înălțimea plantelor cu vârsta de 1 an, variază în mediu, de la 56,6 soiul 'Ning Xia N1', 75,67 cm 'Erma' până la 93,87 cm pentru 'Licurici'. Deși la înălțime plantele nu diferă esențial, aceste diferențe sunt statistic semnificative ( $p < 0,05$ ).

*După 24 luni de la plantare (noiembrie 2018)*, analiza comparativă a înălțimii arbuștilor după 2 ani de la plantare denotă faptul că, la soiului 'Licurici' înălțimea medii a plantelor este de 195,53 cm și 'Erma' 184,33 cm, ce a scos în evidență diferențe nesemnificative statistic, ale creșterii plantelor cu excepția soiului 'Ning Xia N1' de 173,47 cm. Acest soi a înregistrat repetat, valori ale înălțimii plantelor mai mici decât celelalte două soiuri.

Generalizând datele de observație și în cei doi ani soiurile 'Erma' și 'Licurici' au avut o creștere în înălțime mai pronunțată decât soiul 'Ning Xia N1'. Valorile acestor soiuri având, deasemenea și o distribuție mai normală decât în cazul soiului 'Ning Xia N1'.

Menționăm faptul, că plantele lăsate să crească fără nici o intervenție asupra arhitecturii lor, în vederea studierii tendinței naturale de dezvoltare (tufă), au avut mai multe tulpini: între 1 și 5. Arbuștii de goji au avut în medie o singură tulpină. Ritmul de creștere al plantelor din lotul experimental relevă faptul, că pe perioada 2016-2018 arbuștii de *Lycium* au avut o creștere în mediu de 0,36 – 0,55 m/an, valoare ce corespunde cu cea menționată în literatura de specialitate (0,5 m/an) [273].

**Tabelul 4.1. Biometria plantelor speciei *Lycium barbarum* L. (soiurilor 'Ning Xia N1', 'Erma' și 'Licurici') în perioada de vegetație mai-noiembrie 2017 – 2018**

Soiul	Parametrii biometrici	Anii de cercetare							
		2017 Mai 6 luni de la plantare		2017 Iulie-August 8 luni de la plantare		2017 Noiembrie 12 luni de la plantare		2018 Mai - Noiembrie (18* -24** luni) de la plan.	
		Parametrii statistici							
		Media	Coef. de variatie-V%	Media	Coef. de variatie-V%	Media	Coef. de variatie-V%	Media	Coef. de variatie-V%
'Ning Xia N 1'	Înălțime plantă** (cm)	40,33±2,53	13,44	50,67±2,61	11,01	59,6±2,90	10,40	173,47±3,87	4,77
	Nr. lăstari pe pl. *	2,80±0,36	27,66	9,20±0,78	18,13	18,47±0,73	8,41	22,60±1,73	16,37
	Lungime lăstarilor (cm)	14,81±0,89	12,87	14,93±0,78	11,17	17,67±0,42	5,09	4,99±0,46	19,86
	Nr. de frunze pe pl.	161,53±12,13	16,06	-	-	-	-	650,4±38,08	12,52
'Erma'	Înălțime plantă** (cm)	41,00±2,22	11,59	56,00±1,92	7,33	75,67±1,91	5,40	184,33±9,19	10,66
	Nr. lăstari pe pl. *	4,93±0,62	27,05	11,67±0,70	12,82	23,33±1,76	16,09	22,73±1,34	12,60
	Lungime lăstarilor (cm)	15,41±1,18	16,37	15,97±0,91	12,16	21,07±1,04	10,53	6,83±0,84	26,19
	Nr. de frunze pe pl.	171,07±4,32	5,40	-	-	-	-	876,2±110,93	27,08
'Licurici'	Înălțime plantă** (cm)	44,87±2,26	10,75	63,60±1,89	6,34	93,87±3,11	7,09	195,53±2,67	2,92
	Nr. lăstari pe pl. *	6,27±0,45	15,34	12,60±1,40	23,77	27,4±1,40	10,90	34,73±3,67	22,60
	Lungime lăstarilor (cm)	16,40±0,68	8,87	17,55±0,67	8,18	23,13±0,93	8,62	7,67±0,31	8,59
	Nr. de frunze pe pl.	195,47±5,06	5,54	-	-	-	-	1000±71,37	15,26

Notă: datele sunt prezentate sub forma mediei±eroarea valorii medii

**Dinamica dezvoltării de ramuri pe plantă.** Creșterea ramurilor de *L. barbarum* L. în primul an de dezvoltare a fost studiată pe fiecare plantă în dinamică. Cele mai reprezentative etape în acest studiu au fost: luna mai, perioada iunie-august și luna noiembrie.

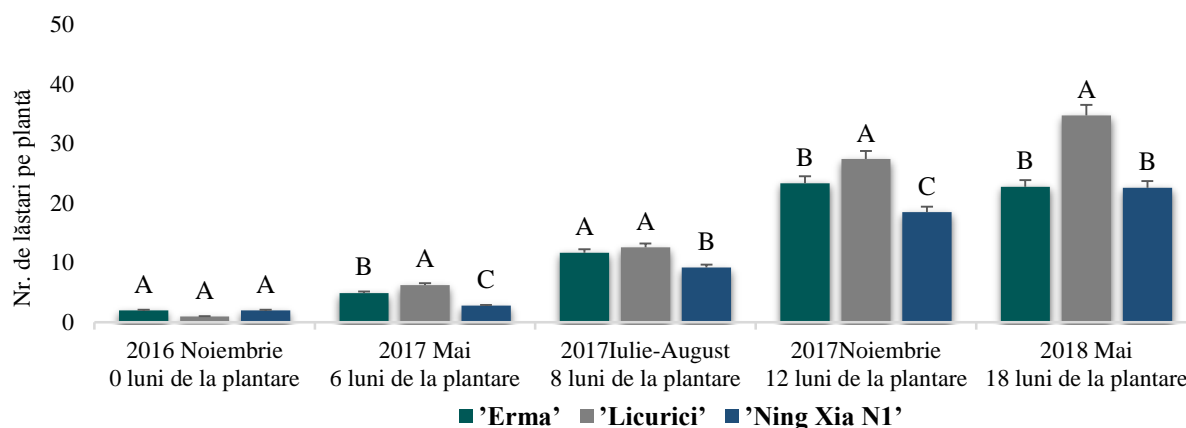
- Luna mai –începutului creșterii ramurilor;
- Lunile iulie-august – au reprezentat etapa de creștere intensivă a ramurilor;
- Luna noiembrie – a marcat încetarea creșterii ramurilor.

**Numărul ramurilor.** În ceea ce privește numărul ramurilor de *L. barbarum* L. după 6 -24 luni de la plantare se modifică odată cu creșterea plantelor și dau dovadă de dezvoltarea intensă (Figura 4.6). Acest indice practic a avut valori asemănătoare cu mici devieri în cele trei perioade de vegetație.

După 6 luni de la plantare (mai 2017), la sfârșitul lunii mai, numărul de ramuri variază, în mediu, de la 2,80 ('Ning Xia N1'), 4,93 ('Erma') până la 6,27 ('Licurici'), aceste diferențe sunt statistic semnificative ( $p < 0,05$ ).

După 8 luni de la plantare (iulie-august 2017), valoarea minimă cu numărul mediu de ramuri pentru 'Ning Xia N1' a fost de 9,20 manifesta diferențe semnificative comparativ cu soiurile 'Licurici' cu 12,60 și 'Erma' 11,67 ambele dezvoltând numărul maximal de lăstari.

După 12 luni de la plantare (noiembrie 2017), numărul de ramuri al plantelor după 1 an de la plantare a relevat o diferență semnificativă între soiuri, astfel, plantele de soiul 'Ning Xia N1' au un număr de ramuri în mediu de 18,47, mai mic în comparație cu soiurile 'Erma' și 'Licurici' (22,73 respectiv 34,73). Pentru toți taxonii, a fost observată o tendință pronunțată a plantelor de a se ramifica.



**Fig. 4.6. Histograma numărului de ramuri pe plantă pe parcursul a doi ani de la plantare, la cele trei soiuri de goji**

Notă: analiza statistică realizată prin ANOVA, (barele reprezintă abaterea standard; A, B, C, D: interpretarea semnificației diferențelor, cu ajutorul testului Bonferroni,  $p < 0,05$ ) dintre soiuri.

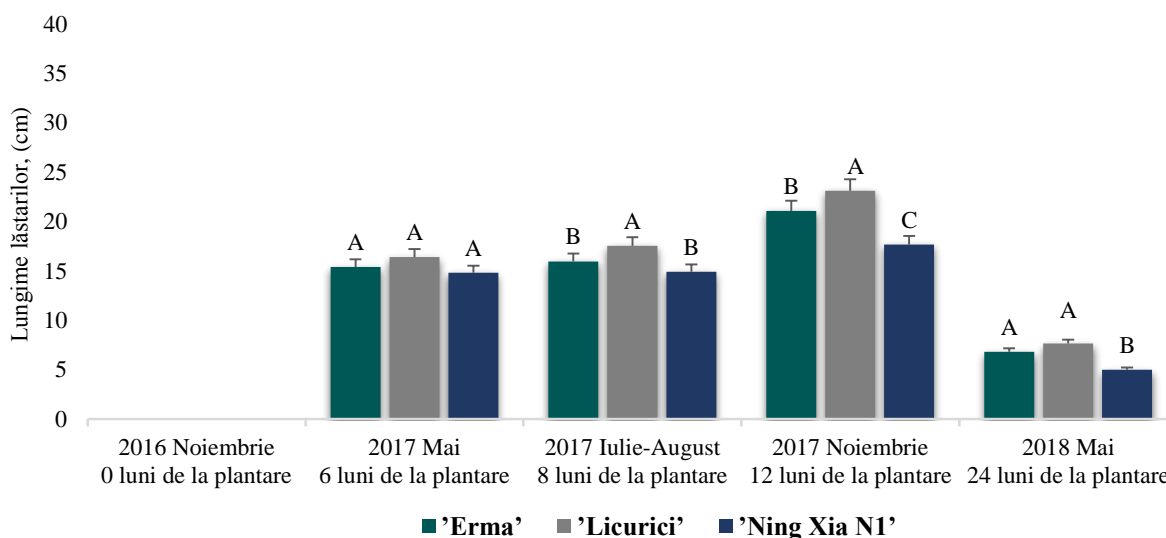
După 18 luni de la plantare (mai 2018), se evidențiază numărul ramurilor la soiul 'Licurici' de 34,73, cu diferențe semnificative față de soiurile 'Erma' și 'Ning Xia N1' (22,73 respectiv 22,60).

În același timp, au fost observați și măsurați toți drajonii taxonilor studiați, apăruiți până în acel moment. Astfel, s-a observat că plantele au drajonat exclusiv în anul 2018, anul anterior nefiind observat niciun drajon. În total, au fost observați 10 drajoni la soiul 'Ning Xia N1', 5 la soiul 'Erma', în medie câte 2 pe plantă, cu înălțimi cuprinse între 1 cm și 20 cm față de planta mamă. Soiul 'Licurici' a dezvoltat un singur drajon cu o înălțime de 10 cm.

**Lungimea ramurilor.** Lungimea și numărul frunzelor sunt indicatori importanți în formarea masei vegetale și în dinamica de creștere a plantei. Lungimea lăstarilor de *L. barbarum* L. este un alt parametru morfologic studiat, care de asemenea a evidențiat diferențe semnificative, între soiuri (Figura 4.7).

După 6 luni de la plantare (mai 2017) – în primul an de la plantare, nu a fost observată o diferență semnificativă a soiurilor de goji, prin calcularea amplitudinilor aferente acestor lungimi.

După 8 luni de la plantare (iulie-august 2017) se evidențiază lungimea ramurilor la soiurile 'Erma' și 'Licurici' cu 15,97 respectiv 17,55 cm, ce prezintă diferențe statistic semnificative ( $p < 0,05$ ) față de față de 'Ning Xia N1' 14,93 cm.



**Fig. 4.7. Histograma lungimii ramurilor (cm) pe parcusul a doi ani de la plantare, la cele trei soiuri de goji**

Notă: analiza statistică realizată prin ANOVA, (barele reprezintă abaterea standard; A, B, C, D: interpretarea semnificației diferențelor, cu ajutorul testului Bonferroni,  $p < 0,05$ ) dintre soiuri.

După 12 luni de la plantare (noiembrie 2017), în ceea ce privește anul 2017, valorile indicatorului lungimea medie a lăstarilor, s-au remarcat diferențe semnificative între soiuri.

Diferențele s-au dovedit a fi cu o valoare minimă de 17,67 cm la 'Ning Xia N1', 21,0 cm - 'Erma' și maximă de 23,13 cm 'Licurici'.

*După 18 luni de la plantare (mai 2018), lungimea lăstarilor la un an și jumătate de la plantare prezintă o valoare minimă de 4,99 cm cu diferențe statistic semnificative ( $p < 0,05$ ) la plantele soiului 'Ning Xia N1', în comparație cu plantele soiurilor 'Licurici' și 'Erma' cu valori maxime de 7,67 respectiv 6,83 cm cu diferențe statistic nesemnificative.*

Astfel, se observă că în 2018, lungimea medie a lăstarilor față de aceeași perioadă a anului anterior (mai 2017) a avut valori mai mici. Acest lucru a fost valabil la toate soiurile studiate. De asemenea, valorile indicatorului *numărul de lăstari* aferente acestor două perioade (mai 2017 și 2018), putem presupune că valorile scăzute ale indicatorului *lungimea medie a lăstarilor* din anul 2018, se datorează faptului că în acest an față de precedentul, numărul de lăstari nou apăruiți a fost mult mai mare.

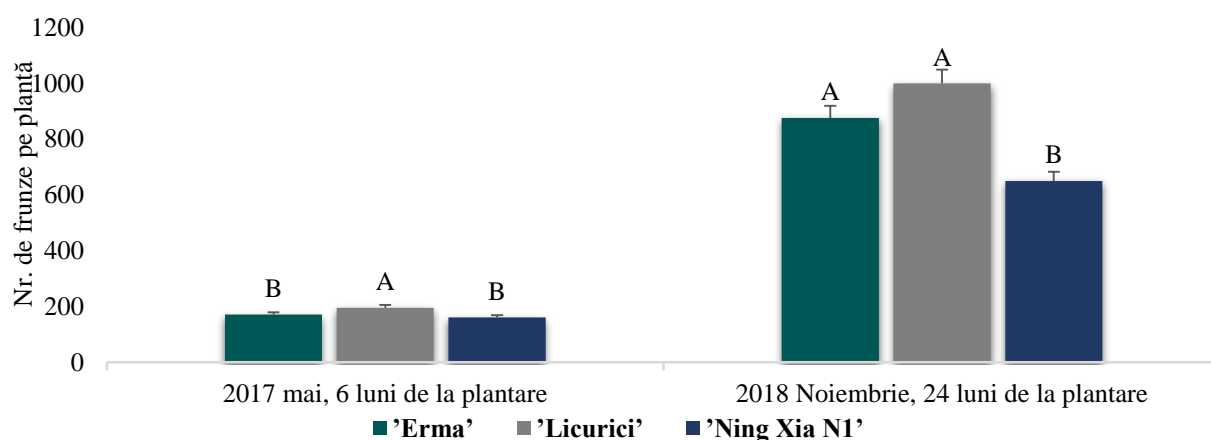
**Formarea frunzelor.** Frunzele arbuștilor studiați au fost solitare sau dispuse în grupuri (rozete). Pe lăstarii noi apăruiți au predominat frunzele solitare ce au avut o dispunere alternantă. Pe ramurile din anii trecuți acestea au fost grupate, câte 5 în medie, în rozete.

Forma frunzelor a variat considerabil între soiurile studiate. Acest lucru a fost valabil în special pentru frunzele soiului 'Licurici' care a prezentat frunze mai mari în zona bazală a arbustului. Deși forma și culoarea au variat de la plantă la plantă, s-a observa o tendință a frunzelor soiului 'Licurici' de a fi mai late decât cele ale soiurilor 'Ning Xia N1' și 'Erma'. Acestea au fost, cel mai adesea ovate sau eliptice ca formă. Cu privire la soiurile 'Ning Xia N1' și 'Erma', frunzele au variat mai puțin ca formă și aproape deloc din punct de vedere al culorii. Forma cea mai comună ambelor soiuri a fost cea lanceolată. Culoare frunzelor a acestora au avut o nuanță de verde mai pală decât cele ale soiului 'Licurici'.

Numărul total de frunze pe plantă, a soiurilor studiate, în primul an de la plantare a fost determinat prin măsurătorile efectuate în perioada mai-iunie 2017. S-a constatat faptul, că valorile măsurătorilor biometrice au fost variate în ceea ce privește numărul frunzelor arbuștilor de goji. Valoarea maximă a fost de 195,47 frunze la 'Licurici' cu diferențe statistic semnificative față de soiurile investigate, cu valori minime de 161,53 și respectiv 171,01 frunze a soiurilor 'Ning Xia N1' și 'Erma' (Figura 4.8).

Numărul de frunze pe plantă a crescut semnificativ în cel de-al doilea an de la plantare față de primul. Inițial, soiul 'Licurici' a avut un număr mediu de frunze mult mai mare pe plantele sale, decât au avut soiurile 'Ning Xia N1' și 'Erma'. Însă, în anul doi, acest indicator a înregistrat valori mai mari, semnificative statistic, la soiurile 'Licurici' și 'Erma' comparativ cu soiul 'Ning Xia N1'. Cu toate acestea, valoarea maximă de frunze a fost înregistrată la soiurile 'Licurici' și

'Erma' de 1000 și 876,2 frunze. Valoarea minimă s-a înregistrat la soiul 'Ning Xia N 1' cu 650,4 frunze. Toate soiurile investigate au prezentat o distribuție exponențială a valorilor pentru acest indicator.

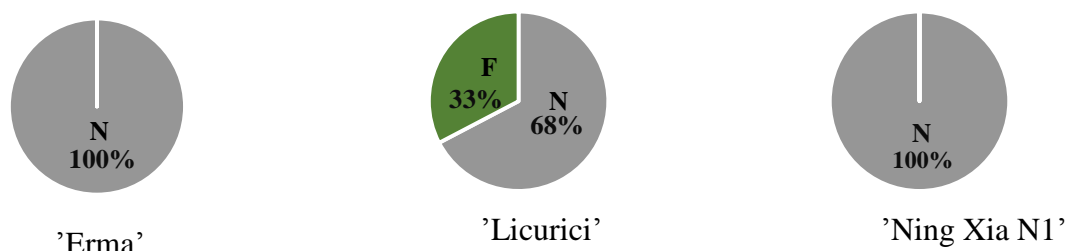


**Fig. 4.8. Histograma numărului de frunze pe plantă pe parcursul a doi ani de la plantare, la cele trei soiuri de goji**

*Notă:* analiza statistică realizată prin ANOVA, (barele reprezintă abaterea standard; A, B, C, D: interpretarea semnificației diferențelor, cu ajutorul testului Bonferroni,  $p < 0,05$ ) dintre soiuri.

Generalizând datele de observații fenologice relevă faptul că, majoritatea plantelor a celor trei taxoni de *L. barbarum* nu au ajuns la maturitate până în anul 2018. De asemenea, soiul 'Licurici' s-a remarcat printr-o dezvoltare mai precoce decât soiurile 'Erma' și 'Ning Xia N1' și cu un ritm de dezvoltare mai constant decât acestea din urmă. Începutul dezvoltării arbuștilor 'Erma' și 'Ning Xia N1' a fost mai tardiv comparativ cu soiului 'Licurici'. Plantele soiurilor 'Erma' și 'Ning Xia N1' au avut un ritm de dezvoltare mai modest decât cele ale soiului 'Licurici' în lunile mai și iulie-august 2017, însă ele și-au accelerat rata de creștere spre sfârșitul anului respectiv. Acest ritm luxuriant de dezvoltare a fost păstrat de 'Erma' și 'Ning Xia N1' și pe parcursul anului 2018.

**Precocitatea de rodire a soiurilor studiate.** Unele soiuri de *Lycium* au dat dovadă de precocitate în ceea ce privește fructificarea, astfel, acestea au rodit încă din primul an de la plantare (2017) (Figura 4.9).



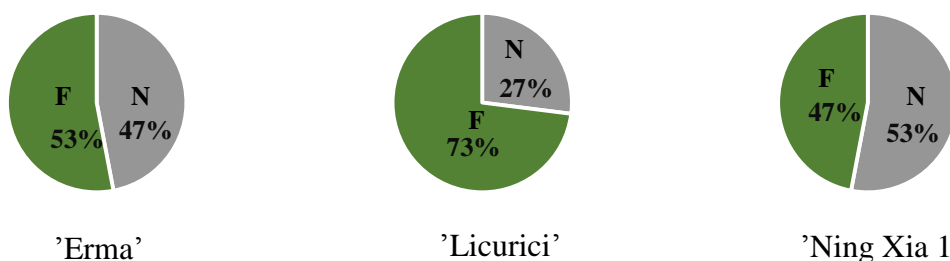
**Fig. 4.9. Analiza fructificării soiurilor de goji în 2017 (primul an de la plantare)**

*Notă:* N – Nefructificare; F – Fructificare.

În respectivul an, 68% din plantele soiului 'Licurici' au dezvoltat primele fructe. Perioada apariției lor a fost la sfârșitul lunii iunie. Ulterior, producția de fructe a înregistrat valori maxime în intervalul august-septembrie. Plantele au continuat să fructifice până la sfârșitul lunii noiembrie (Anexa 6, Figura 6.1).

În ceea ce privește arbuștii 'Erma' și 'Ning Xia N1', rodirea a început mai târziu în anul 2018 și a fost mai puțin intensă decât cea a soiului 'Licurici' (Figura 4.10).

În 2018, faza de fructificare a arbuștilor a început mai devreme decât în anul precedent. Mai exact, primele fructe (necoapte) din acest an au apărut pe la mijlocul lunii mai. Rata de fructificare este de 53% soiului 'Licurici' iar 'Erma' – 73% și 'Ning Xia N1' – 47% la mijlocul lunii iunie. După o săptămână de la începerea fazei de fructificare, acestea au avut fructe mature (faza de maturitate de consum).



**Fig. 4.10. Analiza fructificării soiurilor de goji în 2018 (an-ul II de la plantare)**

Notă: N – Nefructificare; F – Fructificare.

Arbuștii celor trei soiuri au prezentat fructe până la sfârșitul lunii octombrie. Deși nu toți arbușii din taxonii studiați au avut fructe la începutul experimentului, este important să remarcăm faptul că aceștia au dat dovadă de precocitate în rodire în ceea ce privește condițiile agro-pedo-climatice de pe teritoriul Grădinii Botanice.

Astfel, marea majoritate a plantelor soiului 'Licurici' au rodit încă din primul an de la plantare (2017), acestea și-au început faza de rodire din ce în ce mai devreme în fiecare an. Mai mult chiar, soiurile studiate au avut o perioadă de fructificare mai extinsă decât cea descrisă în literatura de specialitate [274].

Analiza statistică cu privire la productivitate nu s-au efectuat, deoarece plantele nu au ajuns în faza de maturitate de rodire. Cu toate acestea, se constată că soiurile de goji studiate intensifică rodirea de la an la an. Unii autori explică că cantitatea totală de fructe culese până în momentul finalizării a arbuștilor a fost de aproximativ 7-9 kg în anul patru după plantare, determinat la un număr mediu de 2100 de plante, cu distanța de plantare 1,5x1,5 m între plante și între 3 m în rânduri [278].



### **4.3. Particularitățile anatomice adaptive ale frunzelor (seră și teren) la specia și soiurile de *Lycium barbarum* L.**

În scopul de a diversifica colecția arbuștilor fructiferi cu cele mai valoroase și productive soiuri, în toamna anului 2016 ulterior completată primăvara în anul 2017, s-au plantat soiurile de goji precum 'Ning Xia N1', 'Erma' și 'Licurici' pe lotul experimental al Grădinii Botanice Naționale (Institut) „Alexandru Ciubotaru”.

Fondarea colecției de goji în GBNI a fost inițiată cu selectarea terenului spre direcția nord-sud pentru crearea unui regim favorabil de iluminare și aerisire a lotului [237, 280].

Evoluția condițiilor climatice în ultimul secol se caracterizează prin aridizarea climei, și extinderea condițiilor de secetă. Insuficiența de umiditate în sol și aer perturbă regimul de apă al plantelor, cauzând deshidratarea țesuturilor cu urmări grave asupra creșterii, dezvoltării și productivității plantelor. Din aceste considerente, o importanță deosebită în domeniu îl reprezintă crearea și implementarea în producere a soiurilor cu rezistență sporită la secetă, boli, vătămători și cu productivitate înaltă. Studii științifice privind anatomia frunzelor acestei specii în literatura de specialitate sunt puține și incomplet reflectate. Schimbările adaptive ale plantelor în condițiile nefavorabile (secetă, îngheț), la nivel structural pot fi analizate cu precizie înaltă pe lamina frunzei.

Aceasta este considerat organul plantei cu cea mai mare plasticitate, care reacționează receptiv la schimbările mediului ambiant [258]. Una dintre direcțiile esențiale ale cercetărilor structural anatomice moderne este studiul anatomic acelor grupe taxonomice de plante care sunt valoroase din punct de vedere economic [21].

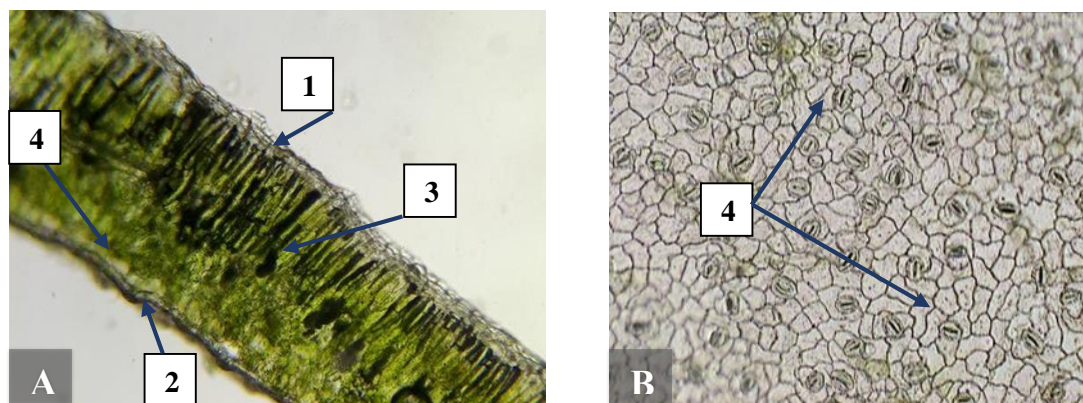
Pentru a stabili caracterele adaptive structurale ale rezistenței lor la secetă, în condițiile pedo-climatice din R. Moldova au fost realizate cercetări anatomice comparative ale speciei *L. barbarum* L. atât din flora spontană cât și a soiurilor cultivate de goji.

**Descrierea anatomică a frunzelor taxonilor de goji studiați.** A fost studiată anatomia frunzelor (pe secțiuni și preparate superficiale din material javelizat) la plante cultivate și flora spontană.

*Lycium barbarum* L. (cătina de gard). Țesutul epidermal învelește mezofilul formând epiderma superioară (adaxială) și epiderma inferioară (abaxială). Epiderma adaxială a limbului frunzei din flora spontană, este alcătuită din celule epidermale propriu zise de forme poligonale. Epiderma adaxială a frunzei este acoperită cu o cuticulă ceva mai groasă, comparativ cu epiderma abaxială. A fost stabilit că celulele epidermale, situate deasupra mezofiliului, au cuticula mai groasă, decât celulele epidermale de pe nervurile frunzei (Anexa 7, Figura 7.1). Caracteristic este căptușeala fasciculului conductor (constând din celule idioblastice cu conținut maro sau negru). Sub epiderma adaxială și abaxială în regiunea nervurii principale, există un colenchim de tip

angular. Aparatul stomatic este predominant de tip anomocitic, limbul fiind amfistomatic. Perii tectori (trihomii) sunt absenți (Figura 4.11).

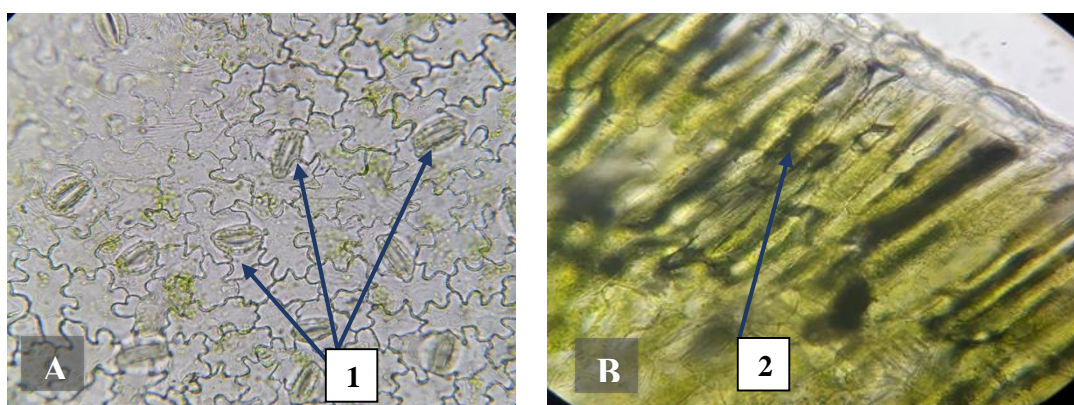
Unii factori fizici ai mediului ambiant - lumina puternică, umiditatea mică, temperatura înaltă, condiționează formarea cuticulei, pe când temperatura joasă, umiditatea mare a aerului, umbrirea duc la dezvoltarea slabă a cuticulei.



**Fig. 4.11. Secțiune transversală prin limbul foliar la specia *Lycium barbarum* L. (flora spontană)**

*Notă:* **A** – aspect general: 1 - epiderma superioară; 2 - epiderma inferioară; 3 - țesut palisadic; 4 - țesut lacunos ( $\times 10$ ); **B** - epiderma inferioară, stomate ( $\times 10$ ).

Soiul 'Ning Xia N1'. Structura anatomică a frunzei acestui soi se caracterizează prin aceeași structură anatomică a limbului ca și ale speciei *L. barbarum*, cu unele specificări. Stomatele de tip anizocitic pe ambele epiderme, sunt înconjurate de 4 celule anexe circulare (Anexa 7, Figura 7.4). Celulele epidermale sunt izodiametrice. Sunt prezente cristalele cu oxalat de calciu sub formă de druze (Figura 4.12).

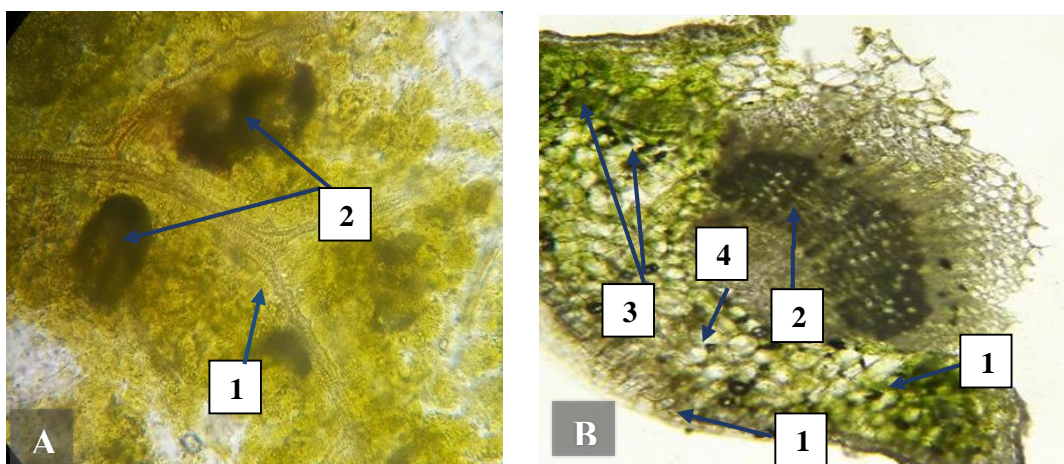


**Fig. 4.12. Epiderma inferioară a limbului foliar la soiul 'Ning Xia N1'**

*Notă:* **A** - epiderma inferioară- 1- stomate ( $\times 10$ ); **B** - preparat superficial 2 – druze de oxalat de calciu ( $\times 40$ ).

Soiul 'Erma'. Pe secțiunile transversale și preparatele superficiale ale limbului, se disting epidermele superioară și inferioară unistratificate, alcătuite din celule bine împachetate, poligonale, cu pereții externi ușor îngroșați. Celulele epidermale sunt acoperite de un strat de cuticulă, care ușor pătrunde printre celule. Pe preparatul superficial a epidermei superioare se

observă celulele cu pereții celulari ondulați. Menționăm prezența stomatelor de tip anomocitic pe ambele epiderme, dar numeric mai multe pe cea inferioară. Mezofilul frunzei este diferențiat dorso-ventral, țesutul palisadic format din 2 rânduri de celule ușor alungite, bine aranjate sub epiderma superioară, epiderma inferioară prezintă celule rotunde sau ovale (Anexa 7, Figura 7.2). Țesutul lacunar constă din celule parenchimatice, lobate. Mezofilul este străbătut de fascicule colaterale închise, înconjurate de teaca sclerenchimatică. Este evidentă prezența celulelor cu druze de oxalat de calciu atât în lungul nervurilor cât și dispersate în mezofil. În secțiuni transversale în regiunea nervurilor sub ambele epiderme se observă fâșii de țesut mecanic de tip colenchim (Figura 4.13).

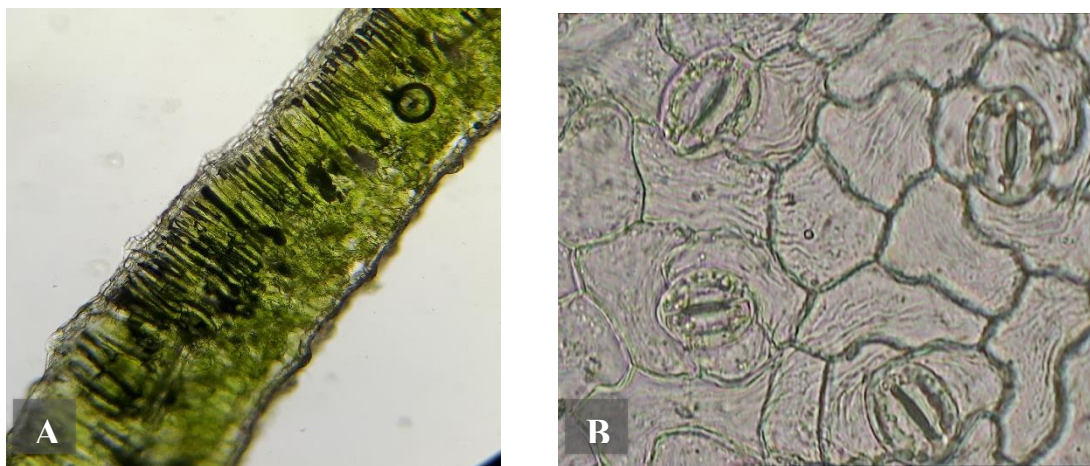


**Fig. 4.13. Secțiune transversală prin limbul foliar, la nivelul nervurii la soiul 'Erma'**  
 Notă: **A** - 1 – fascicul conducător, 2 – druze de oxalat de calciu (x40); **B** - 1 –epiderma; 2 – fascicul conducător, 3 – druze de oxalat de calciu; 4 – țesut mecanic (x40).

Soiul 'Licurici'. Analiza multiplelor preparate microscopice denotă că frunzele dezvoltă acelaș tip de structură anatomică ca celelalte soiuri, cu unele mențiuni: cuticula nu pătrunde printre celulele epidermei; celulele epidermale de formă ovală cu cloroplaste, așezate într-un singur strat. Druzele de oxalat de calciu sunt dispersate și aranjate în teacă, celulele țesutului palisadic aranjate în două rânduri cu celule alungite cu puțin spațiu intercelular (Anexa 7, Figura 7.3). Forma celulelor parenchimului lacunar lobată și compact aranjate (Figura 4.14).

Din punct de vedere histo-anatomic, pețiolul toți taxonii studiați s-a remarcat printr-o mare uniformitate. Epidermele sunt asemănătoare, unistratificați, puternic cutinizată, cu celule alungite, având peretele extern îngroșat.





**Fig. 4.14. Epiderma limbului frunzei goji la soiul 'Licurici'**

*Notă:* **A** – preparat superficial al epidermei superioare (10×); **B** – preparat superficial al epidermei inferioare (40×).

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

Evidențierea particularităților structurale ale frunzelor la soiurile și specia *L. barbarum* L., care se deosebesc după origine, prezintă interes pentru cunoașterea deplină a proprietăților biologice ale taxonilor fiind actuală pentru horticultură. Rezultatele studiului anatomic comparativ efectuat pe preparate superficiale și secțiuni transversale, la frunzele de *Lycium* cultivat și floră spontană, analizate prin prisma lucrărilor științifice de specialitate [111, 179] ne-au permis elucidarea structurilor anatomice specifice cum ar fi:

- grosimea limbului;
- grosimea epidermei (superioară și inferioară);  
grosimea mezofilului în coraportul acestora;
- tipul cuticulei (gradul de pătrundere a cuticulei printre celulele epidermale);
- prezența și modul de distribuire al stomatelor.

Mezofilul este diferențiat în parenchim palisadic, parenchim spongios, fascicule de conducere învelite cu țesut mecanic, prezența și modul de localizare al druzelor oxalatului de calciu. Un alt criteriu anatomic comun al plantelor studiate este dezvoltarea stomatelor de tip anomocitic pe ambele epiderme, numeric prevalând pe epiderma inferioară. În Tabelul 4.2. sunt prezentate rezultatele studiului anatomic comparativ a taxonilor studiați. Analiza comparativă a parametrilor anatomici la arbustul, provenit din flora spontană arată că grosimea limbului este mai mare, decât la arbustul cultivat. Comparativ, frunzele din flora spontană dezvoltă limbul cu grosimea de 170,0 μm, urmat de soiul 'Licurici' cu 167,0 μm grosime și respectiv soiurile 'Erma' 155,50 μm iar cea mai mică la soiul 'Ning Xia N1' cu 123,40 μm. 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 [20]. Astfel frunzele arbustului de *L. barbarum* din flora spontană și cultivat posedă un potențial protector bine dezvoltat, ceea ce va asigura rezistența la acțiunea factorilor nefavorabil în condițiile climatice ale R. Moldova.

**Tabelul 4.2. Caracteristicile anatomice ale frunzelor speciei de *Lycium barbarum* L. spontan și cultivat (condiții de seră și teren)**

Specia, Soiul	Caractere anatomice						
	Grosimea laminei ( $\mu\text{m}$ )	Grosimea epidermelor ( $\mu\text{m}$ )		Grosimea mezofilului ( $\mu\text{m}$ )	Indicele coraportului grosimii		
		Adaxială	Abaxială		Mezofil /lamina	Epiderma adaxială/ abaxială	Epider ma /lamina
<i>Lycium barbarum</i> L. (FST.)	135,00±0,50	20,30±0,62	7,23±0,33	107,0±0,62	0,79	2,8	4,90
<b>Ning Xia N1</b> (S)	117,27±1,21	14,53±0,35	9,80±0,63	85,0±0,76	0,72	1,48	4,80
<b>Ning Xia N1</b> (T)	126,17±4,07	15,90±0,66	12,25±0,41	123,40±1,52	0,74	1,29	4,48
<b>Erma</b> (S)	126,00±0,49	18,30±0,64	11,00±0,26	97,20±2,27	0,73	1,66	4,3
<b>Erma</b> (T)	143,20±0,85	19,60±0,62	14,70±0,54	155,50±1,29	0,89	1,33	4,17
<b>Licurici</b> (S)	187,40±0,74	27,30±0,99	18,95±0,85	162,30±0,30	0,86	1,44	4,05
<b>Licurici</b> (T)	195,00±0,82	35,60±1,17	27,7±0,84	167,0±2,02	0,85	1,28	3,08

Notă: n – abaterea; *FST* – flora spontană teren; *S* – seră (teren protejat); *T* – teren.

Analiza comparativă a indicilor anatomici la soiurile, provenite de la specia *L. barbarum* L., pentru toate soiurile grosimea limbului este mai mare la plantele crescute în teren deschis, decât la cele de teren protejat (seră). La plantele din seră densitatea stomatelor este mică, forma lor fiind circulară, care după plantarea lor în teren capătă o formă eliptică.

Comparativ, frunzele soiul 'Licurici' dezvoltă limbul cu grosimea cea mai mare de 195,0  $\mu\text{m}$ , urmat de soiul 'Erma' cu 143,2  $\mu\text{m}$  și specia spontană de 135,0  $\mu\text{m}$ , cea mai mică fiind la soiul 'Ning Xia N1' de 126,17  $\mu\text{m}$ . O caracteristică comună pentru limbul foliar a soiurilor studiate este epiderma cu cuticulă de tip extern-intern, excepție constituie doar frunzele arbustului din flora spontană cu cuticulă de tip extern. Cuticula este bine reprezentată, având 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, în special față de excesul insolației, radiației, temperaturilor sporite, lipsei umidității.

Menționăm, că 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 3-4 rânduri de celule colenchimatice.

Analiza comparativă a structurii anatomice a soiurilor denotă că, la toate soiurile grosimea limbului este mai mare la plantele din teren deschis decât la cele din seră sau plantele din cultura *in vitro*. Pentru *L. barbarum* L. și soiurile de goji, este specific epiderma superioară mai groasă decât cea inferioară.

Este important de menționat că la arbustul spontan valoarea coraportului dintre epiderme este cea mai mare (2,8), iar la soiurile de cultură mai mică 'Ning Xia N1' (1,48), 'Erma' (1, 29), 'și 'Licurici' ceea ce înregistrează o valoare aproape dublă (1,4). Dezvoltarea epidermei superioare groase la arbustul din flora spontană, reprezintă un indice al adaptabilității la condiții nefavorabile (seceta și radiația) [21]. La toate soiurile analizate epiderma superioară este de dimensiuni mai mari la plantele din teren față de cele din seră.

Epiderma mai groasă asigură o protecție mai eficientă a mezofilului frunzei în condiții de câmp. Deși specia spontană *L. barbarum* L. formează limbul cu o grosime mult mai mică, decât la soiurile cultivate (în teren și seră) țesutul de protecție este foarte bine dezvoltat. Reprezentat prin coraport grosimea epidermelor față de mezofil valoarea înregistrată de specia spontană depășește ceilalți taxoni (4,90), iar soiurile 'Ning Xia N1', 'Erma' și 'Licurici' s-au evidențiat valorii de 3,08 și 4,8. Cu toate că soiurile analizate indică valori diferite la grosimea limbului, în urma analizei coraportul dintre mezofil și grosimea limbului, între soiuri arată că cea mai mare valoare de 0,85 și 0,89 s-a înregistrat la taxonii 'Licurici' și 'Erma'. Specia spontană și soiul soiul 'Ning Xia N1' înregistrează valori între 0,79 și 0,74. Iar la cele cultivate în teren protejat (seră) minimal pentru soiul 'Ning Xia N1' 0,72, iar maximal pentru soiul 'Licurici' 0,86.

Aceste valori indică că soiurile cultivate au o capacitate de asimilare înaltă, ceea ce reprezintă un suport pentru dezvoltarea organelor reproductive a plantelor care și asigură productivitatea mai înaltă, exprimată prin fructe mai mari, indici de productivitate mai sporiți pentru plantă. Frunzele taxonilor studiați posedă cuticulă cu pereți celulari relativ îngroșați. Cuticula reprezintă perete cu structură complexă având proprietăți hidrofobe, micșorând pierderea apei și reduce posibilitatea pătrunderii agenților patogeni [20]. Mezofilul are tendința de a fi compact și de multe ori conține mai multe straturi palisadice. Cuticula relativ groasă are rol de protecție în condiții de arșițe și insolații [205]. După cum am constatat la specia *L. barbarum* L., este caracteristică cuticulă îngroșată de tip extern și intern. Pentru ambele biotipuri este caracteristică epiderma superioară mai groasă decât cea inferioară. Un alt parametru anatomic informativ reprezintă valoarea coraportului dintre grosimea epidermelor superioară și inferioară.

Pentru flora spontană valoarea acestui indice este mai mare (1,26) și reprezintă o valoare aproape egală comparativ cu soiul cultivat 'Ning Xia N1' (1,22). Acesta este un criteriu anatomic, care indică plasticitatea și flexibilitatea epidermelor ca primă barieră de protecție la acțiunea factorilor externi. Grosimea epidermelor determină gradul de protecție al mezofilului frunzei, iar valoarea sporită a coraportului grosimii epidermelor superioară/inferioară pentru sp. de *L. barbarum* L. din flora spontană reprezintă un indice al adaptabilității la condițiile nefavorabile, în special rezistența la secetă, ger și radiație, foarte pronunțate pe parcursul ultimilor ani [293].

Rezultatele cercetării structurii anatomice cantitative și calitative (descrise detaliat) și studiul anatomic comparativ al frunzelor biotipurilor studiate printr-un complex de indicatori anatomici confirmă că, toți taxonii studiați dezvoltă un caracter structural adaptiv la acțiunea condițiilor mediului. Acest fapt se observă prin adaptarea structurilor externe cum ar fi: cuticula groasă de tip extern-intern, dimensiunile și gradul de împachetare al celulelor epidermei și celor interne: gradul de dezvoltare a mezofilului, prezența și modul de distribuire a druzelor oxalatului de calciu, gradul de dezvoltare al țesutului mecanic.

#### **4.4. Studiul biochimic al frunzelor și fructelor de *Lycium barbarum* L. din flora spontană și cultivată**

Compușii bioactivi posedă rol de antioxidanți și cu abilitatea de a capta radicalii în procesele biologice, datorită cărui fapt manifestă efecte fitoterapeutice. Taninurile și flavonoidele au demonstrat proprietăți antibacteriene, antivirale, antioxidante și antiinflamatoare. De asemenea, principala caracteristică a unui antioxidant, care pot fi de natură enzimatică, polifenolică, vitamine, pigmenți ș.a., are capacitatea de a neutraliza radicalii liberi și speciile reactive de oxigen [68, 187].

**Flavonoidele** din punct de vedere chimic, sunt foarte labile, iar caracteristicile lor fizico-chimice stau la baza studiului biochimic calitativ. Flavonoidele reprezintă substanțe solide, cu structuri cristalizate, cu diferite intensități, lipsite de gust și miros [108]. Culoarea derivaților flavonici este datorată grupărilor cromofore. Gruparea hidroxilică din poziția 3 cauzează colorația galbenă, iar cele din pozițiile 3' și 4' – colorația galbenă intens. În aceste poziții, culoarea grupărilor hidroxilice, se deplasează spre culoarea oranj. Colorarea antocianilor, se produce prin alt mecanism, cu formarea de legături cu acizi și baze, formându-se un sistem continuu de legături duble conjugate, alături de legătura chinonică [198]. În soluții acide fluorescente capătă culoare galbenă-verzuie în acid clorhidric și albastră în acid sulfuric concentrat, ca urmare a formării sărurilor în lumina vizibilă. Flavonoidele prezintă spectre de absorbție caracteristice în UV și infraroșu [227].

**Taninurile** sunt substanțe organice polifenolice cu diferită masă moleculară, de tip C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, din care fac parte catechologii, derivații 3-hidroxi-flavanului, care prin condensare formează taninuri catechice. Proprietăți similare au compușii C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>, acidul galic și derivații săi, care sub formă de esteri, constituie taninurile galice. Se întâlnesc și taninuri mixte - esteri ai acidului galic cu catecholul, epicatecholul și galocatecholul [150]. Taninurile galice (hidrolizabile) și taninurile catechice (condensate) pot fi identificate în mediul acid, la cald: taninurile galice hidrolizează, eliberând acid galic, acid elagic sau derivați. Taninurile catechice, în aceleași condiții, formează polimeri brun-roșietici prin condensare la C<sub>4</sub>-C<sub>8</sub> și C<sub>4</sub>-C<sub>6</sub>. În mediul alcalin, prin topire, taninurile se descompun, formând acid galic (taninurile galice) sau acid protocatehic și floroglucinol (taninurile catechice).

Taninurile în soluție se precipită cu gelatina, alcaaloizi, metale grele și cu soluții saturate ale unor săruri de clorură și sulfat de sodiu și de amoniu, fosfat de amoniu [152]. Proprietățile fizico-chimice ale taninurilor stau la baza reacțiilor calitative generale și specifice de identificare.

#### **4.4.1. Analiza calitativă a flavonoidelor și taninurilor**

Primul obiectiv în studiul biochimic constituie analiza calitativă a flavonoidelor și taninurilor prin aplicarea unui șir de reacții specifice de colorare și sedimentare a extractelor vegetale obținute din flora spontană și cultivate (plante obținute prin culturi *in vitro*), după aplicarea metodelor [275, 276] cu utilizarea etaloanelor disponibile pentru flavonoide și tanine.

**Reacții specifice de identificare a compușilor flavonoidici.** Au fost aplicate aceste reacții în extractele alcoolice din frunze și fructe la specia cultivată și spontană (Anexa 8, Figura 8.1). Rezultatele reacțiilor analitice cum ar fi: opalescența, culoarea, sedimentul și gradul de persistență au remarcat prezența diferitor constituenți flavonoidici reprezentate în Tabelul 4.3.

*Reacția cu soluție de amoniac concentrat.* La aplicarea a 5-7 picături soluție de amoniac concentrat, în probele analizate duce la apariția opalescenței cu prezența culorii verzuie în extractele din frunze cu gradul de expresie a reacției intens (\*\*\*). Iar în extractele din fructe: galben-brun pentru flora spontană și galbenă la cele 3 soiuri ce denotă prezența flavonelor cu intensitate moderată (\*\*)(Anexa 8, Figura 8.2).

*Reacția cu acid sulfuric concentrat.* În extractele analizate din frunze drept efecte ale reacțiilor a fost înregistrat culoare verde pentru toate soiurile studiate cu trecere în verde-brun pentru extractele din flora spontană cu gradul de expresie foarte intens (\*\*\*\*). Pentru extractele din fructe de la galben pentru flora spontană și 'Ning Xia N1' cu intensitate moderată (\*\*) în galben-alb pentru 'Erma' și 'Licurici' cu caracter intens (\*\*\*) al efectelor analitice. Rezultatele reacțiilor indică prezența flavonelor în toate probele analizate (Anexa 8, Figura 8.3).



**Tabelul 4.3.Efectele reacțiilor calitative pentru identificarea flavonoidelor în diferite produse vegetale de la sp. *Lycium barbarum* spontană și cultivată**

Reagentul chimic	Produsele vegetale analizate			
	Flora spontană	'Ning Xia N1'	'Erma'	'Licurici'
<i>Soluție de amoniac</i>	Opalescență ***	Opalescență ***	Opalescență ****	Opalescență ***
	Opalescență **	Opalescență **	Opalescență **	Opalescență **
<i>Acid sulfuric concentrat</i>	Opalescență ****	Opalescență, **	Opalescență ***	Opalescență ***
	Opalescență **	Opalescență **	Opalescență **	Opalescență **
<i>Soluție de acetat de plumb bazic 25%</i>	Sediment ****	Sediment ***	Sediment **	Sediment **
	Sediment **	Sediment **	Sediment *	Sediment *
<i>Soluție de 1% de vanilină în acid clorhidric concentrat</i>	Opalescență ****	Opalescență **	Opalescență ***	Opalescență ***
	Opalescență **	Opalescență **	Opalescență **	Opalescență **
<i>Acid clorhidric și zinc metalic</i>	Opalescență ****	Opalescență ***	Opalescență **	Opalescență **
	Opalescență **	Opalescență **	Opalescență **	Opalescență **

Notă: extractele din frunze – □ verzuie, ■ verde-brun, ■ verde; extractele din fructe – ■ galbenă-brun, □ galbenă, □ galbenă-alb, □ alb, albicioas; intensitatea expresiei a efectelor reacțiilor analitice: \* – slab; \*\* - moderat; \*\*\* - intens; \*\*\*\* - foarte intens.

*Soluția de acetat de plumb bazic 25%*. La prelucrarea soluțiilor alcoolice cu acetat de plumb bazic, în prezența flavonoidelor apare precipitat verzui pentru toate extractele din frunză cu intensitate înaltă la flora spontană (\*\*\*\*), medie la soiul 'Ning Xia N1' și moderată în cazul soiurilor 'Erma' și 'Licurici'. Cele din fructe, precipitat galben pentru flora spontană (\*\*), 'Ning Xia N1' galben-alb (\*\*), 'Erma' și 'Licurici' - precipitat alb cu un grad de expresie slab (\*). În toate probele analizate rezultă prezența flavonelor (Anexa 8, Figura 8.4).

*Soluția de 1% de vanilină în acid clorhidric concentrat*. În prezența flavonoidelor se observă opalescență caracteristică pentru ambele extracte analizate cu gradul de expresie a reacției diferit: de la moderat (\*\*) până la foarte intens (\*\*\*\*). Colorarea verde este prezentă în toate probele din frunze și din fructe. Culoarea galbenă o depistăm în flora spontană, galben-alb la soiul 'Ning Xia N1' și albicioasă la soiurile 'Erma' și 'Licurici' denotă prezența flavonoidelor (Anexa 8, Figura 8.5).

*Acid clorhidric și zinc metalic*. La daugarea a câteva granule de zinc metalic și câteva picături de acid clorhidric concentrat, prezența flavonoidelor se observă formarea unei opalescențe și apariția unei colorații verzi în toate extractele din frunze cu diferite intensități: flora spontană foarte intens (\*\*\*\*), soiul 'Ning Xia N1' intens (\*\*\*), 'Erma' și 'Licurici' moderat (\*\*), iar la extractele din

fructe la toți taxonii colorația a fost de intensitate galbenă și respectiv galbenă-albicioasă. Rezultatul analitic a fost mai slab în extractele din fructe (Anexa 8, Figura 8.6).

Descrierea *screening*-ului fitochimică reacțiilor chimice specifice în probele analizate, denotă că gradul de expresie a flavonoidelor este mai pronunțat pentru extractele din *frunze* decât în *fructe*, ce demonstrează prezența unui spectru flavonoidic diferit. Astfel, diferiți constituenți flavonoidici sunt prezenți în organele plantei de goji spontan și cultivat.

**Reacții specifice de identificare a compușilor tananți.** Identificarea substanțelor tanante din produs vegetal (frunze și fructe) de specia *L. barbarum* L. cultivată și spontană a fost efectuate prin aplicarea a câtorva reacții chimice calitative de sedimentare și colorare (Anexa 8, Figura 8.7) (Tabelul 4.4). Au fost utilizate conform tehnicilor metodice adecvate [275].

*Soluția de gelatină de 1%.* Taninurile în prezența gelatinei au dat opalescență în toate probele analizate, ce dispare la adăugarea excesului de gelatină. În toate extractele din frunze se formează precipitat galben-verzui de diferită intensitate: foarte intens (\*\*\*\*) la extractele din flora spontană și intens (\*\*\*) la cele 3 soiuri studiate, iar în extractele fructelor o colorație galbenă moderată cu efecte analitice intense (\*\*). (Anexa 8, Figura 8.8).

*Soluția de alauni de fier și amoniu.* În probele analizate s-a înregistrat prezența substanțelor tanante condensate. În probele supuse studiului a rezultat opalescență și o colorație verde-galbenă. În extractele fructelor obținut din flora spontană intensitatea expresie a fost o reacției moderată (\*\*) iar la soiurile 'Ning Xia N1', 'Erma' și 'Licurici' s-a înregistrat prezența nuanței verziu cu efecte analitice slabe (\*). Culoare verde-negricioasă cu sediment a fost remarcată în celelalte mostre analizate efectele analitice ale reacțiilor sunt intense (\*\*\*) (Anexa 8, Figura 8.9).

*Soluția de acid acetic de 10% și acetat de plumb de 10%.* Substanțele tanante condensate formează sediment galben-verzui în extractele probelelor de frunze din flora spontană cu efecte analitice foarte intens (\*\*\*\*). Extractele din taxonii studiați a generat un sediment cu colorație alb-verzuie de o intensitate moderată (\*\*). În extractele fructelor a rezultat o colorație galben-alb cu formarea de precipitat la flora spontană și soiul 'Ning Xia N1'. Iar la celelalte probe analizate s-a format precipitat albicios (Anexa 8, Figura 8.10).

*Soluția de clorură de aluminiu.* La prezența substanțelor tanante se observă apariția opalescenței cu colorație verzuie în toate probele analizate, dar cu diferite efecte a reacțiilor analitice: foarte intensă în extractele din frunze la flora spontană (\*\*\*\*), intense la plantele cultivate (\*\*\*) , apoi în descendență în fructele din flora spontană intense (\*\*) și în celelalte probe analizate de o intensitate slabă (\*) (Anexa 8, Figura 8.11).

**Tabelul 4.4. Efectele reacțiilor calitative pentru identificarea taninurilor în diferite produse vegetale de la sp. *Lycium barbarum* spontană și cultivată**

Reagentul chimic	Produsele vegetale analizate			
	Flora spontană	'Ning Xia N 1'	'Erma'	'Licurici'
Soluție de gelatină de 1%	Opalescență ****	Opalescență ***	Opalescență ***	Opalescență ***
	Opalescență *	Opalescență **	Opalescență **	Opalescență **
Soluție de alauni de fier și amoniu	Sediment ***	Sediment ***	Sediment ***	Sediment ***
	Opalescență **	Opalescență *	Opalescență *	Opalescență *
Soluție de acid acetic de 10% și acetat de plumb de 10%	Sediment ****	Sediment **	Sediment **	Sediment **
	Sediment **	Sediment **	Sediment *	Sediment *
Soluție de clorură de aluminiu	Opalescență ****	Opalescență ***	Opalescență ***	Opalescență ***
	Opalescență **	Opalescență *	Opalescență *	Opalescență *
Cristale de nitrit de sodiu și acid clorhidric 0,1N	Opalescență ***	Opalescență ***	Opalescență ***	Opalescență ***
	Opalescență **	Opalescență **	Opalescență **	Opalescență **

Notă: extractele din frunze – ■ galben-verzui, ■ verde-negricios; □ alb-verzui; ■ verzuie; ■ cafenie; extractele din fructe – □ galbenă, ■ verde-galbenă, □ albicios; □ galbenă-deschis; intensitatea expresiei a efectelor reacțiilor analitice: \* – slab; \*\* - moderat; \*\*\* - intens; \*\*\*\*- foarte intens.

*Cristale de nitrit de sodiu și acid clorhidric 0,1N.* Taninurile hidrolizabile formează opalescența și apare culoarea cafenie. Intensitate mai pronunțată se remarcă în extractele frunzelor (\*\*\*), iar în probele din fructe culoarea galben-deschis (\*\*) ce denotă prezența taninurilor condensate (Anexa 8, Figura 8.12).

Analiza rezultatelor aplicării reacțiilor analitice de colorare și sedimentare demonstrează prezența în mare parte a taninurilor condensate (colorarea în verde-negricios cu soluția de alauni de fier și amoniu, iar galben-verzui – cu soluție de acid acetic și acetat de plumb). Efectele reacțiilor analitice au fost mult mai pronunțate în *frunze*, decât în *fructe*, în special în extractele produselor recoltate din flora spontană.

#### 4.4.2. Determinarea cantitativă a compușilor biologic activi

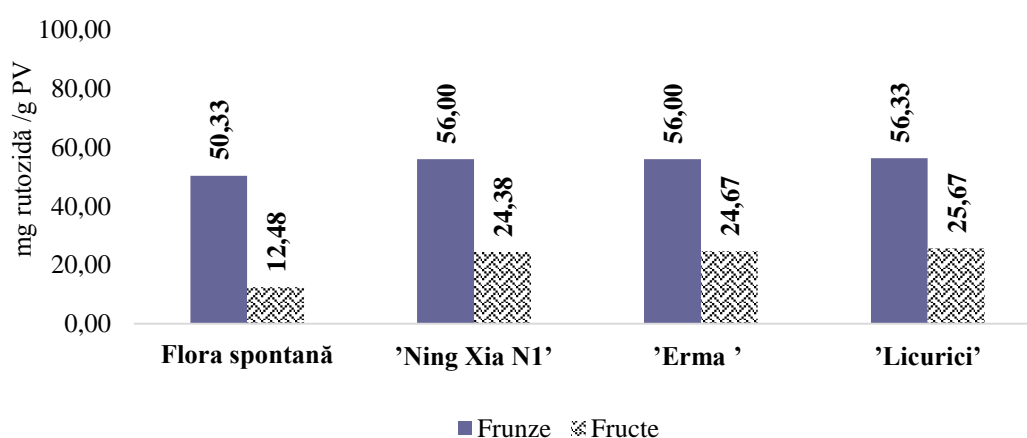
În aspect calitativ reacțiile analitice de colorare și sedimentare au o capacitate de a stabili prezența sau absența flavonoidelor și taninurilor. Astfel, pentru un studiu mai detaliat de identificare a compușilor fenolici (flavonoide și tanine), complementar la analiza calitativă s-au

efectuat și cercetări cantitative: spectrofotometria (flavonoidelor și taninurilor), titrimetrica (permanganometrică) și permanganometrica cu precipitarea taninurilor cu gelatină (taninelor).

**Conținutul total de flavonoide.** Analiza spectrofotometrică a extractelor vegetale a rezultat în date cantitative ale conținutului total al flavonoidelor determinat în grame la 100 g produse vegetale exprimat prin rutozidă (PV) (Figura 4.15). S-a determinat conținutul flavonoidic în produsele analizate în recalcul la rutozidă conform metodicii din Farmacopeia Română (ed.X-ea) [249, 276].

Nivelul bioacumulării flavonoidelor prezintă diferențe în conținuturi între toate produsele vegetale analizate. Rezultatele obținute arată că conținutul flavonoidic prevalează în frunzele de la plantele spontane (50,33 mg/g PV). Frunzele plantelor cultivate au valori înalte de flavonoide (56,33 mg/g PV) pentru soiul 'Licurici' urmat de soiurile 'Ning Xia N1' și 'Erma' cu un conținut de (56,00 mg/g PV). Fructele plantelor spontane au relevat valori minime de flavonoide (12,48 mg/g PV), și mult mai mari la cele cultivate. Astfel, se evidențiază soiul 'Licurici' cu 25,67 mg/g PV și 'Erma' cu 24,67 mg/g PV, iar cea mai mică valoare fiind observată la soiul 'Ning Xia N1' 24,38 mg/g PV.

Totalul polifenolic în fructele specie *L. barbarum* L. cultivate constituie 867,00 mg acid galic/100 g masă uscată, ceea ce este aproape echivalent cu datele obținute de alți autori [7, 85 144, 204].



**Fig 4.15. Totalul flavonoidic în frunzele și fructele goji spontan și cultivat**

În literatura de specialitate există numeroase date ce indică conținutul polifenolic în fructe de: 895 – 1036 mg acid galic/g extract [135], 1431 mg catechină/100g [34], 2272 mg acid galic/100 g extract [85] și mai mare decât în alte specii: 333,64 mg acid galic/100g masă uscată [98] și 615,9 mg acid galic/100g de masă uscată [144].

Conținutul polifenolic, comparativ cu datele menționate în fructele cultivate în condițiile pedoclimatice ale R. Moldova este mai mic, probabil din cauza deficitului de umiditate pe perioada

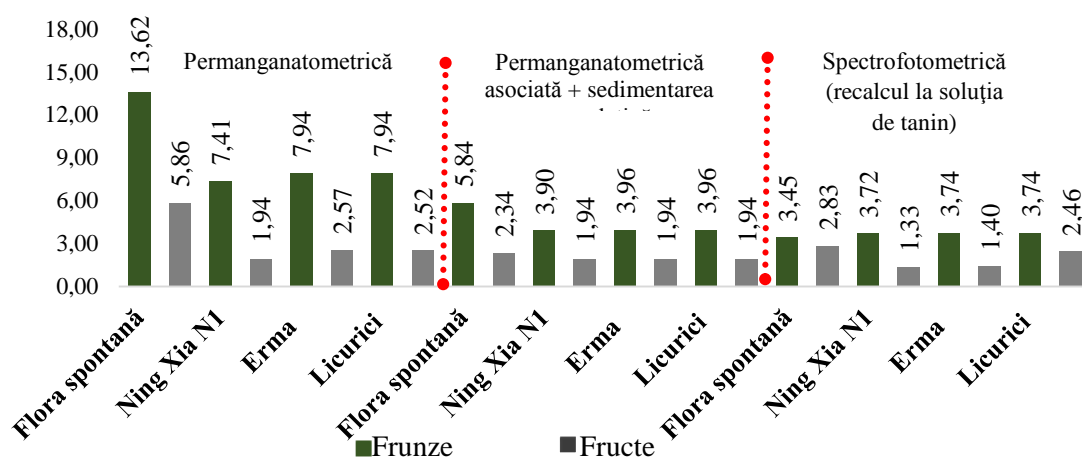
estivală, persistența vânturilor uscate, temperaturilor sporite ale aerului și solului care vin în contradicție cu necesitățile vitale ale arbustului cum ar fi: solurile, atmosfera și vânturile umede, regimul moderat de temperaturi pe tot parcursul anului [171] conducând la biosinteza și acumularea sporită, față de fructele crescute în alte regiuni [119].

**Conținutul total de taninuri.** Dozarea conținutului taninic s-a efectuat prin aplicarea metodelor: titrimetrică (*permanganatometrică*, *permanganatometrică asociată cu sedimentarea taninurilor cu gelatină*) și spectrofotometrică (lungimea de undă 275 nm, recalcul la soluția standard de tanin). Rezultatele dozării taninurilor pentru produsele vegetale (frunze și fructe) din flora spontană și cultivată sunt sintetizate în Figura 4.16.

*Metoda permanganatometrică* - conținutul maxim de taninuri s-a evidențiat în frunzele din flora spontană de 13,62%. Valorile au fost atestate minime la soiurile 'Ning Xia N1' 7,41% iar la 'Erma' și 'Licurici' cu 7,94%. În fructele de goji, recoltate din flora spontană, conținutul taninic este de 5,86%, determinat permanganatometric și prevalează față de fructele soiului 'Erma' cu 2,57%, 'Licurici' cu cca. 2,52% și aproape de 2 ori mai mare față de soiul 'Ning Xia N1' - 1,941%.

*Metoda permanganatometrică asociată + sedimentarea cu gelatină* - a relevat valori maxime pentru frunzele din flora spontană (5,84%), urmat de soiurile 'Erma', 'Licurici' (3,96%) și 'Ning Xia N1' (3,90%). În ceea ce privește conținutul de taninuri în fructe valorile procentuale sunt cuprinse între 2,34% flora spontană și 1,94% la soiurile cultivate.

*Metoda spectrofotometrică (recalcul la soluția de tanin)* - conform acestei metode conținutul taninic constituie valori maxime de 3,45% pentru frunzele spontane și minime de 3,74% la cele cultivate. În fructe cantitatea de taninuri este mai mica cu 2,83% – flora spontană iar în soiurile 'Licurici' este de 2,46%, 'Erma' - 1,40% și 'Ning Xia N' de 1,33%.



**Fig. 4.16. Ponderea procentuală a taninurilor determinată titrimetric și spectrofotometric în produsele vegetale de *Lycium barbarum* spontan și cultivat**

Prin metoda permanganatometrică asociată cu sedimentarea taninurilor la aplicarea gelatinei conținutul taninurilor constituie pentru fructele cultivate (1,94 %) și puțin cedează față de fructele spontane (2,34 %).

Rezultatele investigațiilor demonstrează, că prin toate metodele aplicate, frunzele din flora spontană și soiurilor cultivate se evidențiază printr-un conținut maxim de taninuri, determinat permanganatometric. Metoda optimă de dozare este *permanganatometrică asociată cu sedimentarea taninurilor* prin aplicarea reacției cu gelatină, deoarece este de o exactitate mai înaltă. *Metoda permanganatometrică* se bazează pe proprietatea taninurilor de a se oxida repede cu permanganatul de caliu și nu este atât de exactă, pentru că se supun oxidării taninurilor.

Conținutul cantitativ al flavonoidelor și taninurilor în produsele vegetale analizate variază, toate formele studiate prezintă interes pentru industria alimentară și industria farmaceutică.

#### **4.4.3. Analiza indicatorilor biochimici în fructele speciei *Lycium barbarum* L. spontane și cultivate**

Înșușirile biochimice se referă la conținutul în compuși biochimici care au rol în formarea gustului și aromei fructelor, având un rol nutritiv important pentru organismul uman. Zaharurile și acizii grași sunt cele mai investigate în procesul de evaluare al soiurilor. Evaluarea taxonilor sub aspectul calității fructelor a constituit o componentă importantă în completarea descrierii acestora; calitatea este o caracteristică importantă atât pentru fructele consumate în stare proaspătă cât și pentru cele destinate prelucrării.

Studierea formării calității fructelor și acumularea substanțelor organice în procesul creșterii și maturării lor permite determinarea termenilor optimi de recoltare și oferă posibilitatea de a compara soiurile conform calităților și compoziției lor chimice [282]. Fructele formelor studiate s-au prezentat sub forma unor bace portocaliu spre roșu (coral), glabre și cu o formă oblong-ovală, similar descrierilor din literatura de specialitate [137].

A fost observat faptul că fructele soiurilor 'Ning Xia N1', 'Erma' și 'Licurici' au conținut mai mic de semințe decât cele din flora spontană, de culoare galben-maronie și cu o formă oval-reniformă. Culoarea este determinată de prezența pigmentilor în țesuturile vegetale. Valoarea acidității titrabile a fructelor de goji este influențată de condițiile climatice. Dacă temperatura medie anuală este mai scăzută, atunci aciditatea crește [273].

În ceea ce privește greutatea fructelor de goji cultivate, aceasta a fost determinată în anul II de plantare (vara anului 2018). Acumularea substanțelor nutritive din fructe depinde în mare măsură de soi și condițiile climatice ale anului, stabilite în perioada formării recoltei. Limita

variației masei medii și a cantității substanțelor nutritive, care se conțin în fructele soiurilor cultivate și flora spontană de goji studiate sunt prezentate în Tabelul 4.5.

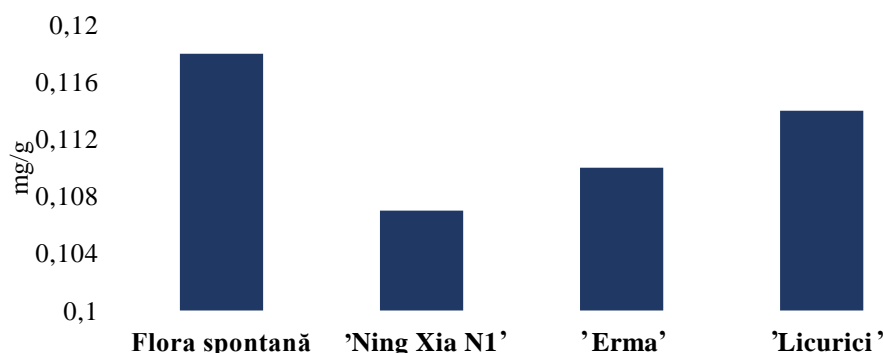
**Tabelul 4.5. Analiza indicatorilor biochimici a fructelor speciei *Lycium barbarum* L. spontane și cultivate**

Indicatori	Flora spontană	Ning Xia N1	Erma	Licurici
Masa medie a fructului, g	0,689	0,801	0,848	0,852
Zaharul total, %	4,548	7,158	6,454	8,514
Aciditatea totală titrabilă, %	0,405	0,381	0,301	0,335
Vitamina C %	0,118	0,107	0,107	0,111

Acidul ascorbic ce se sintetizează doar în celulele vegetale, este prezent și în fructele de *L. barbarum* L. În celulele organismului uman, acidul ascorbic acționează ca antioxidant și ca imunostimulator, favorizând activitatea unor celule implicate în răspunsul imun, prin elaborarea unor mediatori cu rol important în apărarea imună [133].

Astăzi, studiile științifice, care contribuie la valorificarea noilor surse vegetale cu conținut de acid ascorbic, sunt foarte binevenite. Aceasta constituie un argument pentru determinarea acidului ascorbic în fructele de origine cultivată ale soiurile de goji multiplicare *in vitro* și acclimatizate în condițiile pedoclimatice ale R. Moldova comparativ cu cele spontane.

Conținutul acidului ascorbic în fructe variază în funcție de proveniența acestora. Biosinteza și acumularea minimă revine fructelor recoltate din plantele cultivate 'Ning Xia N1' (0,107%), 'Erma' (0,111%), 'Licurici' (0,114%) și maximă celor din flora spontană cu (0,118 %). Rezultatele denotă, că conținutul de acid ascorbic în fructele de goji variază de la 0,107 % la 0,118 % acid ascorbic (Figura 4.17), în funcție de proveniența acestora, caracterizate prin complexe de factori pedo-climatici diferiți, fapt remarcat și în alte lucrări [11].

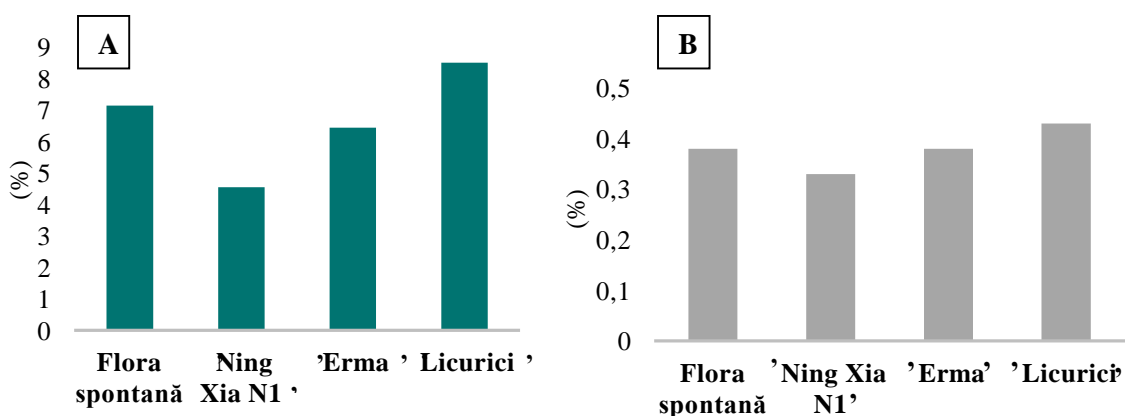


**Fig.4.17. Conținutul procentual al acidului ascorbic în fructele goji spontane și cultivate**

În ceea ce privește conținutul de zahăr, acesta se încadrează în limitele normale (conținutului de zahăr total din fructele de goji 3,45% – 8,90%) ale speciei *L. barbarum* L. [48, 234]. Cea mai mare valoare a conținutului total de zahăr a fost înregistrată la soiul 'Licurici' de (8,514%), urmat de 'Ning Xia N1' 7,158% și respectiv soiul 'Erma' și flora spontană 6,545 – 4,548 (Figura 4,18 A).

Datele descrise în lucrare sunt similare și cu cele prezentate de Mikulic-Petkovsek și colab. (2012) ce a detectat glucoză ( $37,9 \pm 1,32$  mg/g greutate proaspătă), fructoză ( $29,2 \pm 0,71$  mg/g) și zaharoză ( $4,10 \pm 0,45$  mg/g) în fructele de goji. Fructoza a fost principalul zahăr solubil identificat în fructe, urmat de glucoză și zaharoză [142].

Valorile acidității titrabile se încadrează în limitele absolute (conținut acid citric goji este de 0,58%, - 0,89%) [105]. Este cunoscut faptul că în perioadele cu precipitații abundente sau în zonele mai reci, valorile acidității titrabile devin mai mari [142]. O valoare maximă a conținutului de acid s-a obținut în cazul fructelor din flora spontană (0,405%) și cu valori mai mici la soiurile: 'Ning Xia N1', 'Licurici' și 'Erma' de 0,381%, 0,335% și 0,301% (Figura 4,18 B).



**Fig. 4.18. Conținutul procentual de zahăr (A) și aciditate (B) în fructele de goji, spontane și cultivate**

Cercetările noastre au arătat că cantitățile de zahăr observate în fructele goji cultivate sunt mici, astfel pot servi în calitate de produs dietetic, binevenite în rația alimentară zilnică pentru fortificarea organismului și promovarea modului sănătos de viață. Unele studii au demonstrat că cel mai mare conținut de zaharuri a fost observat în fructele colectate la sfârșitul vegetației (stadiu de maturare complet), pe terenuri însorite și solul bine drenat. Acești factori pot avea ca rezultat producția de goji cu nivelul de zahăr preferat [192]. Fructele de goji sunt materie primă prețioasă pentru producerea produselor alimentare, medicinale, cosmetice și alte produse.



#### 4.5. Concluzii la capitolul 4

1. Plantele investigate de *L. barbarum* L. relevă faptul că sunt caracterizate de o variabilitate semnificativă între soiuri. Astfel, plantele celor 3 soiuri de *L. barbarum* L. au avut o variabilitate discontinuă a parametrilor precum: înălțimea plantelor, numărul lăstarilor, lungimea lăstarilor și numărul de frunze pe plantă.

2. Studiul microscopic comparativ al epidermelor frunzelor (adaxială și abaxială) pune în evidență caractere structural-anatomice adaptive la condițiile nefavorabile (secetă, temperaturi scăzute și radiație solară) în conformitate cu grosimea medie mai mare a laminei frunzei, prezența stomatelor cu o frecvență accentuată pe epiderma inferioară și localizarea druzelor de oxalat de calciu dispersate în mezofil, aranjate în teacă specific speciei *L. barbarum* L. și soiurilor de goji 'Licurici', 'Erma' și 'Ning Xia N1'.

3. Rezultatele obținute privind evaluarea calitativă a flavonoidelor scoate în evidență constituienți flavonoidici (flavone, flavonone, flavonoli) prin reacții chimice specifice cu un conținut mai mare în frunze decât în fructe la toate probele analizate, ceea ce demonstrează prezența unui spectru flavonoidic diferit. Însă analiza cantitativă a flavonoidelor prin metoda spectrofotometrică a înregistrat cele mai mari valori în frunzele soiului cultivat 'Licurici' (56,33 mg/g PV) și cantități mai mici 'Ning Xia N1' și 'Erma' (56,00 mg/g PV) comparativ cu frunzele plantelor spontane (50,33 mg/g PV).

4. Analiza calitativă a taninurilor a relevat prezența substanțelor tanante hidrolizabile și condensate prin reacții analitice, identificate prin colorații mai intense în frunze decât în fructe, în special în extractele produselor recoltate din flora spontană. Același lucru s-a observat și în cazul determinării cantității de taninuri prin metoda optimă (*sedimentarea taninurilor cu gelatină*). Valori maxime de taninuri au fost identificate în frunzele din flora spontană de 5,84%, urmate de soiurile 'Erma', 'Licurici' - 3,96%, 'Ning Xia N1' cu 3,90%, iar pentru fructele cultivate 1,94 % și puțin cedând fructelor spontane 2,34%.

5. Compoziția biochimică ale fructelor de goji a plantelor cu vârsta de doi ani, a înregistrat conținutul maxim de vitamina C în fructele soiurilor: 'Ning Xia N1' (0,107%), 'Erma' (0,111%) și 'Licurici' (0,114%) comparativ cu fructele din flora spontană (0,118%).

6. Determinarea conținutului de zahar total acumulat la soiurile studiate a variat între 8,514%-6,545% și la flora spontană de 4,548%. Aciditatea fructelor din flora spontană s-a dovedit a fi mai mare cu o pondere de 0,405%, iar valori mai mici a relevat soiurile 'Ning Xia N1' (0,381%), 'Licurici' (0,335%) și 'Erma' (0,301%).

## CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI PRACTICE

### Concluzii generale

Pentru prima dată în R. Moldova s-a realizat multiplicarea *in vitro* a speciei *L. barbarum* L. și evaluarea morfologică, biochimică comparativă a compușilor fitochimici a speciei spontane și soiurilor cultivate în condițiile pedoclimatice ale R. Moldova.

1. A fost elaborată tehnologia și descris protocolul de multiplicare *in vitro* a soiurilor de goji: 'Amber Sweet', 'New Big', 'Erma', 'Licurici' și 'Ning Xia N1' pentru producerea materialului săditor de calitate robust, necontaminat, uniform cu un potențial morfogenetic înalt de regenerare, inițiată din meristeme apicale și meristeme apicale cu primordii foliare, inoculate pe mediu MS100% cu adaos de BAP – 0,2mg/l [26, 30].

2. Cercetările efectuate în vederea microclonării soiurilor de goji au relevat rata de proliferare sporită, în medie 22,06 de lăstari per explant pentru soiul 'Amber Sweet', urmat de 'Licurici' cu 20,17, 'New Big' 16,11, 'Erma' 14,72 și 'Ning Xia N1' – 14,11 de lăstari pe mediul nutritiv MS 100%, suplinit cu citochina BAP (0,5 mg/l). Balanța hormonală optimă în procesul de înmulțire *in vitro*, s-a dovedit a fi: BAP (0,2 mg/l) + ANA (0,2 mg/l) + GA<sub>3</sub> (0,1 mg/l), care a determinat rata de proliferare rezonabilă și lăstari relativ bine dezvoltati la soiurile studiate: 'Ning Xia N1' (4,56), 'Erma' (4,94), 'New Big' (6,94), urmat de 'Amber Sweet' (5,06) și 'Licurici' (5,22) [6].

3. Rizogeneza microlăstarilor a fost stimulată prin suplینirea mediului nutritiv de bază MS 100% cu auxinele AIB, AIA, ANA de 0,2 mg/l, cât și pe mediul nutritiv MS 50%. Ponderea cea mai mare de înrădăcinare circa 90% la toate soiurile de goji se obține pe mediul suplinit cu o concentrație de 0,2 mg/l ANA. Mediul MS 50% aditionat cu aceeași concentrație de auxina ANA s-a dovedit a fi rentabil, optim și eficient în scopul conservării materialului de goji pentru o perioadă de 60 zile. Soiurile de goji au fost aclimatizate cu o rată de viabilitate de peste 95%, iar perioadă mai potrivită este cea estivală [17].

4. Procesul de calusogeneză se induce în prezența mediului MS 100% aditionat cu regulatorii de creștere 2,4D de 1,0 mg/l și BAP 0,1 mg/l iar creșterea organogenezei plantulelor provenite din masă calusară pe mediul MS 100% suplinit cu ANA (0,2 mg/l). Dinamica apariției calusului la soiurile de goji pentru ambele tipuri de explante (fragment de frunze și pețiol) este determinată de mediul de cultură, tipul de hormoni și explant [32].

5. Studiul microscopic comparativ anatomic al frunzelor la taxonii studiați (flora spontană și cea cultivată), a demonstrat o mare omogenitate, care pune în evidență caractere structural-anatomice adaptive la condițiile nefavorabile (secetă, temperaturi scăzute și insolăție) și anume: grosimea medie mai mare a laminei frunzei, prezența stomatelor cu o frecvență accentuată pe

epiderma inferioară și localizarea druzelor de oxalat de calciu dispersate în mezofil zona fasciculelor conducătoare [33].

6. Condițiile pedoclimatice ale R. Moldova sunt favorabile pentru creșterea și fructificarea soiurilor de goji, fapt ce a determinat o creștere abundentă în decursul anilor de studiu 2017 – 2019. Capacitatea de ramificare, care determină productivitatea biologică a plantelor de goji se bazează pe lungimea creșterii anuale a lăstarilor de rod influențată, atât de particularitățile soiului, condițiile climatice, cât și de calitatea materialului săditor, rezistența la boli și vârsta plantelor.

7. Rezultatele investigațiilor biochimice calitative și cantitative ale unor clase de compuși chimici denotă, că frunzele și fructele speciei *L. barbarum* L. cultivate pot servi drept surse importante de flavonoide (25,67 mg/g la cele cultivate și 56,33 mg/g la plantele spontane), taninuri (2,34% plante cultivate și 5,84% – spontane) și acid ascorbic (0,111% fructe cultivate și 0,118 % – spontane). Acumularea conținutului de zahăr în fructele plantelor cultivate variază 6,54 – 8,51%, iar aciditatea lor este de 0,30 – 0,38%. Astfel, fructele au un conținut înalt de substanțe nutritive valoroase și un conținut redus de zahăr, ce oferă o calitate înaltă cu aport mic de calorii și un echilibru optimal de nutrienți [5].

### **Recomandări practice**

1. Datele obținute și prezentate în această lucrare sunt recomandate pentru obținerea materialului săditor valoros necontaminat și omogen de soiuri goji pentru economia națională prin tehnologia multiplicării *in vitro* a plantelor speciei de *L. barbarum* L.

2. Pentru obținerea materialului de calitate se recomandă prelevarea explantelor de tip meristem apical și meristem apical cu primordii foliare.

3. Se recomandă soiurile 'Licurici', 'Erma', 'Ning Xia N1', 'New Big', 'Amber Sweet' pentru fondarea de plantații industriale ca sursă alimentară și în calitate de arbust decorativ pentru amenajarea spațiilor verzi, în condițiile pedoclimatice ale R. Moldova.

## BIBLIOGRAFIE

1. AMAGASE H., FARNSWORTH N. A review of botanical characteristics, phytochemistry, clinical relevance in efficacy and safety of *Lycium barbarum* fruit (goji). *Food Res. Int.*, 2011, 44, pp. 117-170
2. AMAGASE, H., Comparison of *Lycium barbarum*-containing liquid dietary supplements to caffeinated beverages on energy/caloric metabolism activity and salivary adrenocortical hormone levels in healthy human adults. *FASEB J.* 24, 2010. pp. 1550–1540.
3. AMAGASE, H., SUN, B., & BOREK, C. *Lycium barbarum* (goji) juice shows significant *in vivo* antioxidant effects in human serum in a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical study *Nutrition and Research*, 29. 2009. pp. 19-25. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nutres.2008.11.005>.
4. AMAGASE, H., Handel, R., Randomized, blind, placebo-controlled human clinical studies showed waist circumference reduction by an intake of standardized *Lycium barbarum* fruit juice. *Obesity*. Nature Publishing Group. 75 Varick St, 9th Flr, USA. New York, Ny 2008. pp. 293–320. ISSN 10013-1917
5. AMAGASE, H.; FARNSWORTH, N.R. Clinical relevance in efficacy and safety of *Lycium barbarum* fruit (Goji). *Food Res. Int.* 2011, 44, 1190–1217.
6. AMERICAN HERBAL PHARMACOPOEIA: Botanical Pharmacognosy - Microscopic characterization of botanical Medicines. Edited by Roy Upton. 2013. 468 p.
7. ASANICA A., MANOLE C., TUDOR V., DOBRE A., TEODORESCU R., *Lycium barbarum* L. Juice - Natural Source of Biologically Active Compounds. *AgroLife Sci. J.*, Vol. 5, Nr. 1, 2016, pp. 15-20.
8. BADEA, E., SĂNDULESCU, D. *Plant biotechnologies*. Bucharest, Biotech Foundation, 2001. 295 p.
9. BAHMANKAR M., MOHAMMAD S., MORTAZAVIAN M., TOHIDFAR M., AHMAD S., NOORI S., DARBANDI A. I., CORRADO G. AND RAO R. Chemical Compositions, Somatic Embryogenesis, and Somaclonal Variation in Cumin, Volume 5. 2017. pp. 1-15. ISSN 7283806.
10. BENCHENNOUFA A., GRIGORAKISA S., LOUPASSAKIA S. AND KOKKALOU B. Phytochemical analysis and antioxidant activity of *Lycium barbarum* (Goji) cultivated in Greece. *Pharmaceutical Biology*, VOL. 55, NO. 1, 2017. pp. 596–602. ISSN: 1388-0209.
11. BENEDETTO, D. Biomass production in ornamental foliage plants: crop productivity and mechanisms associated with exogenous cytokinin supply. *Plant Sci Biotech.* – Vol. 4, Is. 1. – 2010. pp. 1-22.
12. BENMAHIOUL, B., N. DORION, M. KAID-HARCHE, AND F. DAGUIN. Micropropagation and *ex vitro* rooting of pistachio (*Pistacia vera* L.). *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 108: 2012. pp. 353–358.
13. BORKOWSKA B. Morphological and physiological characteristics of micropropagated strawberry plants rooted *in vitro* or *ex vitro*. *Sci Hort.* 89: 2001. pp.195–206.
14. BORSAI O., HÂRȚA M., SZABO K., KELEMEN C.D., ANDRECAN A. F., CODREA M.M., CLAPA D., Evaluation of genetic fidelity of *in vitro*-propagated blackberry plants using RAPD and SRAP molecular markers. *Horticultural Science (Prague)*, 47, 2020 (1). pp. 21–27

15. BOSIO GN, BREITENBACH T, PARISI J, REIGOSA M, BLAIKIE FH, PEDERSEN BW, ET AL. Antioxidant beta-carotene does not quench singlet oxygen in mammalian cells. *J Am Chem Soc*, 135. 2013. pp. 272-279
16. BRONDANI G. E., DUTRA L. F.; WENDLING I., GROSSI F.; HANSEL F. A.; ARAUJO M. AL. Micropropagation of an Eucalyptus hybrid (*Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii*), *Acta Sci., Agron. (Online)* vol.33 no.4 Maringá Oct./Dec. 2011, pp. 655-663. ISSN 1807-8621
17. BUITENHUIS R., RENKEMA J., REEH K.W., FRASER H., HALLETT R., „Monitoring strategies, host use and seasonal dynamics of Spotted Wing Drosophila in Ontario”, prezentare, Great Lakes Fruit Workers, Niagara Falls, Vineland, 2012. pp. 68-70
18. 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 Congress of Geneticists and breeders, Chisinau, 2015. p. 71.
19. CALALB T., GORCEAG M., LEBEDIUC N., CHIORCHINĂ N. Total content of carotenoids in different vegetable products of spontaneous and cultivated sp. *Lycium barbarum* from the Republic of Moldova, International Scientific Symposium “Conservation of Plant Diversity”, Botanical Garden of ASM, 5th edition, 2017. p 70.
20. CALALB T., LOZINSCHII M., CIORCHINA N. The comparative morpho-anatomical study of new cultivars and some species of blackberry, In: *Journal of botany*, vol. IX, Nr. 1 (14), Chişinău, 2017, pp. 5-14.
21. CALALB T., OROIAN S., SAMIRHITAN M. The structures indicators in definition of chokeberry fruit resistance to environment factors during storage. *Modern Phytomorphology*, 2nd International Scientific Conference on Plant Morphology, Lviv, vol. 4, 2013, pp. 185-188
22. CARNÉS, J., DE LARRAMENDI, FERRER A., HUERTAS J., LÓPEZ-MATAS M.A., Recently introduced foods as new allergenic sources: Sensitisation to Goji berries (*Lycium barbarum*). *Food Chem.* 137: 2013. pp. 130-135
23. CECCARINI M. R., VANNINI S., CATALDI S., MORETTI M., VILLARINI M, FIORETTI E. *In Vitro* Protective Effects of *Lycium barbarum* Berries Cultivated in Umbria (Italy) on Human Hepatocellular Carcinoma Cells. *BioMed Research International* 2016, pp. 1-9
24. CHANG R., SO K., „Use of anti-aging herbal medicine, *Lycium barbarum*, against aging-associated diseases. What do we know so far?”, *Cellular and Molecular Neurobiology*, vol. 28(5), 2008. pp. 643-652
25. CHAO S, SCHREUDER M, YOUNG G, NAKAOKA K, MOYES L, & OBERG C. Pre-Clinical Study: Antioxidant Levels and Immunomodulatory Effects of Wolfberry Juice and Other Juice Mixtures in Mice. *The Journal of the American Nutraceutical Association*. 2004. pp. 31-38
26. CHEN, C.-T. HO, AND A.-I. YEH, “Effect of goji (*Lycium barbarum*) on expression of genes related to cell survival. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 59,no.18, 2011. pp. 10088–10096.

27. CHENG J, ZHOU ZW, SHENG HP, HE LJ, FAN XW, HE ZX, et al. An evidence-based update on the pharmacological activities and possible molecular targets of *Lycium barbarum* polysaccharides. *Drug Des Devel Ther*, 9: 2015. pp. 33-78.
28. CHEONG, K.L.; FENG, W.; LIN, P.C.; LONG, Z.R.; LV, X.J.; JING, Z.; MA, S.C.; LI, S.P. Simultaneous determination of molecular weights and contents of water-soluble polysaccharides and their fractions from *Lycium barbarum* collected in China. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2015. pp. 210–218
29. CLAPA D., A. FIRA, N. An Efficient *ex Vitro* Rooting and Acclimatization Method for Horticultural, *Hortscience*, 48: 2013. pp. 159-167.
30. CLAPA D., FIRA AL., CIORCHINĂ N., DUMITRAS A., ALEXANDROV E., ROSCA I. The Application of Hydroculture for Rooting Cuttings in some Horticultural Species, Vol. Simp. Conservation of Plant Diversity, Ed II, Chisinau, 2012. pp. 19-26.
31. CLAPA D., BORSAI O., HÂRT M., BONTA V., SZABO K., COMAN V. BOBIS O. Micropropagation, Genetic Fidelity and Phenolic Compound Production of *Rheum rhabarbarum* L. *Plants* 2020. pp. 2-15.
32. CLAPA D., FIRA, A., JOSHEE, N., An Efficient *Ex Vitro* Rooting and Acclimatization Method for Horticultural Plants Using Float Hydroculture. *Hortscience*, 48(9): 2013. 160 p.
33. COCIU V., OPREA S., *Research Methods in Fruit-Tree Breeding*, Dacia Publishing.2009, 120 p.
34. COLAK A., OKATAN V., GUCLU S., KORKMAZ N., POLAT M. Chemical characteristics and antioxidant activities of four native Goji (*Lycium barbarum* L.) genotypes. 59 (1), 2016, USAMV, Iași, pp. 29-34.
35. CRISTIAN S., SABBATINI G., MARANGELLI F., *Ex Vitro* Rooting of Wolfberry. *Hortscience* 53(10). 2018. pp. 144-149.
36. CUI B., LIU S., LIN X., WANG J., LI S., WANG Q., LI S., Effects of *Lycium barbarum* aqueous and ethanol extracts on high-fatdiet induced oxidative stress in rat liver tissue. *Molecules*, 2011. pp. 9116-9128.
37. DAN QIAN, YAXING ZHAO , GUANG YANG AND LUQI HUANG. Systematic Review of Chemical Constituents in the Genus *Lycium* (Solanaceae) School of Pharmaceutical Science and Technology, Tianjin University, Academic Editor: Derek J. McPhee *Molecules*, 2017 pp. 1-33.
38. DĂNĂILĂ S., DOBRINOIU R.V., VIȘAN L., TOMA R. C., Protocol for efficient *in vitro* multiplication of *Lycium barbarum* L. (goji) by direct organogenesis. *Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies*, Vol. XIX, 2015. pp. 34-38. ISSN 2285-1364.
39. DAVID B. Haytowitz and Seema Bhagwat May, Database for the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) of Selected Foods, Release Prepared by Nutrient Data Laboratory Beltsville Human Nutrition Research Center (BHNRC) Agricultural Research Service (ARS) U.S. Department of Agriculture (USDA), 2010, pp. 15-25.
40. 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 (*Lycium barbarum* In: *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*. vol 81(6), 2006. pp. 1057-1063.

41. DEBNATH S. C., VYAS P., GOYALI J. C., Igamberdiev A. U. Morphological and molecular analyses in micropropagated berry plants acclimatized under *ex vitro* condition. *Can. J. Plant Sci.* 2012. pp. 1065-1073.
42. DEBNATH, S. C. Adventitious shoot regeneration in a bioreactor system and EST-PCR based clonal fidelity in lowbush blueberry (*Vaccinium angustifolium* Ait.). *Sci. Hortic.* 128: 2011. pp. 124-130.
43. DEBNATH, S. C. Micropropagation of small fruits. Micropropagation of woody trees and fruits. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands. 2003 pp. 465-506.
44. DEFRAIGNE J., DOMMES J. Cultivars, culture conditions, and harvest time influence phenolic and ascorbic acid contents and antioxidant capacity of goji In: *Journal Food Sci.* vol 77(2), 2012, pp. 205-210.
45. DELPORTE F., PRETOVA A., JARDIN P. AND WATILLON B. Morpho-histology and genotype dependence of *in vitro* morphogenesis in mature embryo cultures of wheat. *Protoplasma*, 251: 2014. pp. 1455-1470.
46. DEMETER, Z. Somatic embryogenesis and regeneration from shoot primordia of *Lycium chinensis*/ Z. Demeter, G. Surányi, V.A. Molnár, G. Sramkó, D. Beyer, Z. Kánya, G. Vasas, M. Hamvas, C. Máthe // *Plant Cell Tiss Organ Cult.* – 2010. – Vol. 100. – pp. 349-353
47. DONG J., LU D., WANG Y. Analysis of flavonoids from leaves of cultivated *Lycium barbarum* L., *Plant Foods Hum Nutr.* 2009, 64 (3), pp. 199-204.
48. DONNO D., BECCARO G.L. Antioxidant compound fingerprint and bioactivity evaluation. *J. Funct. Food.*, 2015. pp. 10-16
49. DONNO, D., G. L. BECCARO, M. G. MELLANO, A. K. CERUTTI AND G. BOUNOUS. Goji berry fruit (*Lycium* spp.): Antioxidant Goji berry compound fingerprint and bioactivity evaluation. *J. Funct. Foods.* 18: 2015. pp. 170-185.
50. DONNO D, CERUTTI AK, PRGOMET I, MELLANO MG, BECCARO GL Foodomics for mulberry fruit (*Morus* spp.): analytical fingerprint as antioxidants' and health properties' determination tool. *Food Res Int* 69, 2015. pp. 179–188.
51. DONNO, D.; MELLANO, M.G.; RAIMONDO, E.; CERUTTI, A.K.; PRGOMET, Z.; BECCARO, G.L. Influence of applied drying methods on phytochemical composition in fresh and dried goji fruits by HPLC fingerprint. *Eur. Food Res. Technol.* 2016, 242, pp. 1961–1974.
52. DOROFTEI M., Ecological Research On Some Species Of Non-native Wood Plants From The Danube Delta, doctoral thesis, Ovidius University Constanta. 2009. pp. 189.
53. DUAN H., CHEN Y., CHEN G. Far infrared-assisted extraction followed by capillary electrophoresis for the determination of bioactive constituents in the leaves of *Lycium barbarum* Linn. *J. Chromatogr. A*, 1217, 2010. pp. 4511-4516.
54. EDWIN F. GEORGE, MICHAEL A. ABERYSTWYTH, AND GEERT-JAN DE KLERK, A C.I.P. Catalogue record for this book is available from the Library of Congress, © Springer 2008. pp. 29-115 ISBN 978-1-4020-5005-3 (e-book).
55. EDONG NG, PEI D, YIN WL. Tissue-specific localization and dynamic changes of endogenous IAA during poplar leaf rhizogenesis revealed by in situ immunohistochemistry. *Plant Biotechnol Rep.* 2012;6:165–74.

56. ENDES Z, USLU N, OZCAN MM, ER F. Physico-chemical properties, fatty € acid composition and mineral contents of goji berry (*Lycium barbarum* L.) fruit. J Agroalimnt Proc Technol. 2015. pp. 36–40.
57. ERCISIL S, ORHAN E, ESITKEN A, YILDIRIM N, AGAR G. Relationships among some cornelian cherries genotypes (*Cornus mas* L.) based on RAPD analysis. Genet Resour Crop Evol 55: 2008. pp. 613–618.
58. ESPINOSA, A.C., PIJUT, P.M. and C.H. MICHLER. Adventitious shoot regeneration and rooting of *Prunus serotina in vitro*. HortScience, 41. 2006. pp. 191-201.
59. FILOTAS M., – „If you grow the they will come. Specialty berry pests in Ontario”, prezentare OMAFRA, Ontario, Canada, 2012 p.43.
60. FIRA A., JOSHEE N., CRISTEA V., SIMUM, HÂRȚA M., PAMFIL D., CLAPA D. Optimization of micropropagation protocol for goji berry (*Lycium barbarum* L.). Bull UASVM Horticulture 3. 2016. pp. 141–150.
61. FIRA A, N. JOSHEE AN. Efficient *ex Vitro* Rooting and Acclimatization Method for Horticultural Plants Using Float Hydroculture, Hortscience, 48: 2013. pp. 1159-1167.
62. FIRA A., CLAPA D., Results Regarding *In Vitro* Proliferation in Goji (*Lycium barbarum*). Bulletin UASVM Horticulture, 68(1)/2011. 503 p. Electronic ISSN 1843-5394.
63. FIRA A. The applicathion of hidroculture for rooting cuttings in some horticultural species. Materialele Simpozionului Internațional „Conservarea diversității plantelor”. Ediția a II-a. Chișinău, 2012. pp. 19-27.
64. FIRA A., JOSHEE N., CRISTEA V., SIMU M., HÂRȚA M., PAMFIL D., CLAPA Doina, Optimization of Micropropagation Protocol for Goji Berry (*Lycium barbarum* L.). Bulletin UASVM Horticulture 73(2) / 2016. pp. 140-150. Electronic ISSN 1843-5394.
65. FIRA, AL., CLAPA D. *Ex-Vitro* Acclimation of some horticultural species in Hydroculture. In: Bulletin UASVM, nr. 66 (1), Horticulture, 2000, pp. 44-51.
66. FLINT HARRISON L., LYVERSE JENNY M.,– „Landscape Plants for Eastern-North America”, Ed. John Wiley and Sons, 2003. 345 p.
67. FLOREA, V. Cultura plantelor medicinale. Chișinău: Adriga-Vis, 2006. 312 p. ISBN 978-9975-9814-1-5.
68. FORINO M., TARTAGLIONE L., DELL’AVERSANO C., CIMINIELLO P., NMR-based identification of the phenolic profile of fruits of *Lycium barbarum* L. (goji berries). Isolation and structural determination of a novel Nferuloyl tyramine dimer as the most abundant antioxidant polyphenol of goji berries. Food Chemistry, 194: 2016. pp. 1254-1259.
69. FRABETTI, M., P. GUTIERREZ-PESCE, E. MENDOZA-DE GYVES, AND E. RUGINI. Micropropagation of *Teucrium fruticans* L., an ornamental and medicinal plant. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant 45: 2009. pp. 129–134.
70. FREIRE, S.M. Aspectos básicos de la embriogénesis somática. Revista del Ministerio de Educación Superior (MES) de la República de Cuba. Biotecnología Vegetal, 3 (4), 2004. pp. 195-211.
71. FRIML, J. & PALME, K. Polar auxin transport old questions and new concepts? Plant Mol. Biol. 49. 2002. pp. 273–284.
72. FRIML, J. Auxin transport—shaping the plant. Curr. Opin. Plant Biol. 6, 2003. pp. 7–12.



73. FUKUDA, T. Phylogeny and biogeography of the genus *Lycium* (Solanaceae): Inferences from chloroplast DNA sequences. Archived 2003-11-30 at the Wayback Machine Molecular Phylogenetics and Evolution 19(2), 2001. pp. 246-258.
74. GAN L., ZHANG S.H., LIANG YANG X., BI XU H., Immunomodulation and antitumor activity by a polysaccharide-protein complex from *Lycium barbarum*. Int. Immunopharmacol., 2004. pp. 563–569.
75. GARAY-ARROYO A. SANCHEZ M., GARCIA-PONCE B., AZPEITIA E., BUYLLA E. Hormone Symphony During Root Growth and Development Developmental Dynamics 241: 2012. pp. 1867–1885.
76. GHALI W., VAUDRY V., JOUENNE T., MARZOUKI M. *Lycium Europaeum* Fruit Extract: Antiproliferative Activity on A549 Human Lung Carcinoma Cells and PC12 Rat Adrenal Medulla Cancer Cells and Assessment of Its Cytotoxicity on Cerebellum Granule Cells. Nutrition and Cancer, Taylor & Francis Group, LLC, 0(0), 2015. pp. 1–10. ISSN: 0163-5581 print / 1532-7914 online.
77. GHALI W., VAUDRY V., JOUENNE T., MARZOUKI M. *Lycium Europaeum* Fruit Extract: Antiproliferative Activity Nutrition and Cancer USA. LLC, 26-45. 2016. ISSN: 0163-2340.
78. GIOVANNUCCI E.,– „A review of epidemiologic studies of *Lycium barbarum*, lycopene, and prostate cancer”, Exp. Biol. Med. (Maywood), 227(10): 2002 p. 852-859.
79. GONBAD, R. A., SINNI AH, U. R., ABDUL AZIZ, M., & MOHAMAD, R. Influence of Cytokinins in Combination with GA3 on Shoot Multiplication and Elongation of Tea Clone Iran 100 (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze). The Scientific World Journal, 2014, pp. 94-114.
80. GORCEAG M., Aspects of the *in vitro* organogenesis of the species *Lycium barbarum* L. (goji), Journal of Botany Vol. IX, Nr.1 (14), 2017 pp. 29 – 34.
81. GORCEAG M., CIORCHINĂ NINA. *In vitro* propagation of *Lycium barbarum* L. (goji) a studied culture plant in Botanical Garden (I) AȘM. The International Conference dedicated of the 70th anniversary of foundation of first research institutes of the ASM and 55th anniversary: ”Life sciences in the dialogue of generations: Connections between universities academia and business community” Chisinau; 2016, p. 34.
82. GRAMZA-MICHAŁOWSKA. Goji berry (*Lycium barbarum*): Composition and health effects–A review. Pol. J. Food Nutr. Sci. 66: 2016. pp. 67-75.
83. GRANATO, D.; SHAHIDI, F.; WROLSTAD, R.; KILMARTIN, P.; MELTON, L.D.; HIDALGO, F.J.; MIYASHITA, K.; CAMP, J.V.; ALASALVAR, C.; ISMAIL, A.B.; et al. Antioxidant activity, total phenolics and flavonoids contents: Should we ban *in vitro* screening methods? Food Chem. 264, 2018. pp. 471–475.
84. GROSS PAUL M.,– „Exotic Antioxidant Superfruits, Volume 2: Goji (“Wolfberry”) Nature’s Most Nutritious Food?”, 2006. pp. 345-350.
85. GUO D., CHENG H., CHAN S., YU P. Antioxidant activities and the total phenolic contents of tonic Chinese medicinal herbs. Inflammopharmacology, 2008. pp. 201-207.
86. GUTIÉRREZ B., COBO M., ORELLANA M., VEGA J., ARAHANA V., JARAMILLO V. Micropropagation of *Solanum quitoense* var. *quitoense* by apical bud, petiole and hypocotyl culture. Universidad San Francisco de Quito USFQ, Laboratorio de

- Biotecnología Vegetal, Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales COCIBA, Cumbayá-Ecuador. *Int J Biotechnology* (Tokyo) 36(2): 2019. pp. 91-97.
87. HASSANPOUR H., HAMIDOGHLI Y. SAMIZADEH H. Estimation of genetic diversity in some Iranian cornelian cherries (*Cornus mas* L.) accessions using ISSR markers. *Biochem Syst Ecol* 48: 2013. pp. 257–262.
  88. HENNING S. M., ZHANG Y., RONTROYANNI V. G. Variability in the antioxidant activity of dietary supplements from pomegranate, milk thistle, green tea, grape seed, goji, and acai: effects of *in vitro* digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2014. pp. 4313–4321.
  89. HITI BANDARALAGE J. C., HAYWARD A., BRIEN C. O, MITTER N. Gibberellin and cytokinin in synergy for a rapid nodal multiplication system of avocado VIII Congreso Mundial de la Palta. 2015. pp. 95-103.
  90. HODSON E., FORERO A., CANCINO G., MORENO A. M., MONSALVE L. E., RACEROW. *In vitro* regeneration of three chrysanthemum (*Dendrathera grandiflora*) varieties "via" organogenesis and somatic embryogenesis (Univ. Sci. vol.13 no.2 Bogotá May/Aug. 2008. pp. 118-126. ISSN 0122-7483.
  91. HORSZWALD, A. ANDLAUER, W. Characterisation of bioactive compounds in berry juices by traditional photometric and modern microplate methods. *J. Berry Res*. 2011. pp. 189–199.
  92. HUANG T.H.W., *Lycium barbarum* (Goji Berry) extracts and its taurine component inhibit PPAR- $\gamma$ -dependent gene transcription in human retinal pigment epithelial cells: Possible implications for diabetic retinopathy treatment. *Biochem. Pharmacol.*, 2011. pp. 1209–1218.
  93. HU Z., GUO G., ZHAO D., LI L., ZHENG G. Shoot Regeneration from Cultured Leaf Explants of *Lycium barbarum* and Agrobacterium Mediated Transformation, *Russian Journal of Plant Physiology*, 48 (4): 453–458, *din Fiziologiya Rastenii*, 48 (4): 2001. pp. 529–535.
  94. HU Z., Y. HU, H. H. GAO, X.Q. GUAN AND D.H. ZHUAN. Callus production, somatic embryogenesis and plant regeneration of *Lycium barbarum* root explants, *Biologia Plantarum*, 52 (1): 2008. pp. 93-96.
  95. HU, Z., Y.R. WU, W. LI, AND H.H. GAO. Factors affecting *Agrobacterium tumefaciens* – mediated genetic transformation of *Lycium barbarum* L. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 42: 2006. pp. 461–466.
  96. HUMMER KE, POMPER KW, POSTMAN J, GRAHAM CJ, STOVER E, MERCURE E. Emerging fruit crops. In: Badenes M, Byrne D, editors. *Fruit Breeding. Handbook of Plant Breeding*. Vol. 8. New York: Springer; 2012. pp. 97-147.
  97. HUNKOVÁ J., LIBIAKOVÁ G. and GAJDOŠOVÁ A. Shoot proliferation ability of selected cultivars of *Rubus* spp. as influenced by genotype and cytokinin concentration. *Journal of Central European Agriculture*. Volume: 17, 17(2) Issue: 2 p. 2016, pp. 379-390. ISSN 1332-9049.
  98. IONICĂ M., NOUR V., TRANDAFIR I. Polyphenols content and antioxidant capacity of Goji fruits (*Lycium chinense*) as affected by the extraction solvents. *South Western Journal of Horticulture, Biology and Environment*, vol. 3, nr. 2, 2012. pp. 121-129.

99. ISAC, V. Protocol for *in vitro* micropropagation of raspberry, and plant regeneration by organogenesis. In: Mezzetti, B.; Ružić, D. and Gajdosova, A. (Eds.). A guide to some *in vitro* techniques. Small fruits. European research: from genomics to sustainable production, quality and health. 2009. Pp. 14-23.
100. IVANOVIC J. Antioxidant properties of the anthocyanin-containing ultrasonic extract from blackberry cultivar "Cacanska Bestrna". In: Indust. Crop. Prod. vol. 53, 2014. pp. 274-281.
101. JAIN N., S. BABBAR. Gum katira – a cheap gelling agent for plant tissue culture. 2002. 200 p.
102. JAIN-RAIN A., S. B. BABBAR. Evaluation of alternative Gelling Agents with Agar and Development of Xanthagar, a Gelling Mix, suitable for Plant Tissue Culture Media. Asian Journal of Biotechnology, 3 (2): 2011. pp. 153-164.
103. JAVID, M., FORD, R. & NICOLAS, M. E. Tolerance responses of Brassica juncea to salinity, alkalinity and alkaline salinity. *Funct Plant Biol* 39, 2012. pp. 699–707.
104. JOHN MIERS, – „On the Genus *Lycium*”, The Annals and Magazine of Natural History, nr. 79, vol. XIV-seria a doua, ed. Taylor and Francis, Londra, 1854. pp. 1-20
105. JUANFANG LU, HAOXIA LI, JUNPING QUAN, WEI AN, JIANHUA ZHAO & WANPENG XI Identification of characteristic aroma volatiles of Ningxia goji berries (*Lycium barbarum* L.) and their developmental changes, *International Journal of Food Properties*, 20:sup1, 2017. pp. 214-227.
106. JULIAN B. FLEISCHMAN, M. JAUME S. „Treatise on Trees and Shrubs Grown in France and in the Countryside”, Firmin Didot Press, 1825 (var. tradusă în lb. engleză în 2006. 373 p.
107. KAPLAN A., HASANGLU A., INCE I. Morphological, anatomical and palynological properties of some turkish Veronica species (Scrophulariaceae). In: *International Journal of Botany*, vol.3 (1), 2007, pp. 23-32.
108. KATARZYNA MAŁGORZATA BRODOWSKA Natural flavonoids: classification, potential role, and application of flavonoid analogues. *European Journal of Biological Research*; 7 (2): 2017. pp. 108-123. ISSN 2449-8955.
109. KAUSHAL, K., NATH A.K., SHARMA, D.R. Establishment of callus culture and plant regeneration in strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) cv. 'Chandler'. *Indian Journal of Plant Physiology*, 11(2): 2006: pp. 136-144.
110. KAYASHIMA, T., KATAYAMA, T. Oxalate is available as a natural antioxidant in some systems. *Biochemica and Biophysica Acta*. 2002: pp. 1–3.
111. KAZBEKOVNA F., ARSENOVNA S. M., NIKOLAEVICH D. O. Comparative Micromorphological Investigations of Red Godji Berries (*Lycium barbarum* L.) and Black Godji Berries (*Lycium ruthenicum* Murr.). *Pharmacogn J. A Multifaceted Journal in the field of Natural Products and Pharmacognosy*. 10(5): 2018. pp. 911-915.
112. KELEN M, OZKAN G. Relationships between rooting ability and changes of endogenous IAA and ABA during the rooting of hardwood cuttings of some grapevine rootstocks. *Eur J Hortic Sci*. 68(1): 2003. pp. 8–13.
113. KEVERS C. Evolution of antioxidant capacity during storage of selected fruits and vegetables. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. vol. 55 (21), 2007. pp. 8596-8603.

114. KHAN N, AHMED M, HAFIZ I, ABBASI N, EJAZ S, ANJUM M., Optimizing the concentrations of plant growth regulators for *in vitro* shoot cultures, callus induction and shoot regeneration from calluses, of grapes. 5 One 49: 201 pp. 37–45.
115. KIEBER, J.J., SCHALLER G.E. // THE ARABIDOPSIS BOOK. – CYTOKININS 2014. pp. 234 -245.
116. KOBAYASHI AK, BESPALHOK JC, PEREIRA L., VIEIRA L. Plant regeneration of sweet orange (*Citrus sinensis*) from thin sections of mature stem segments. Plant Cell Tissue Org Cult 74: 2003. pp. 99–102.
117. KOCA, I. AND B. KARADENIZ. Antioxidant properties of blackberry and blueberry fruits grown in the black sea Region of Turkey. Sci Hortic. 121: 2009. pp. 447-450.
118. KOU L, DU M, ZHANG C, DAI Z, LI X, ZHANG B. The Hypoglycemic, Hypolipidemic, and Anti-Diabetic Nephritic Activities of Zeaxanthin in Diet-Streptozotocin-Induced Diabetic Sprague Dawley Rats. Appl Biochem Biotechnol,182: 2017. pp. 944-955.
119. KULCZYNSCHI B., GRAMZA-MICHATOWSKA, Goji berry (*Lycium barbarum*): Composition and health effects a review, Pol.J. Food Nutr. Sci., vol. 66, No. 2, 2016. pp. 67-75.
120. LAM A.Y., ELMER G.W., MOHUTSKY M.A., Possible interaction between warfarin and *Lycium barbarum* L., Ann. Pharmacother., vol. 35, 2001. pp. 1199–1201.
121. LARRAMENDI C.H., GARCÍA-ABUJETA J.L., VICARIO S., GARCÍA-ENDRINO A., Goji berries (*Lycium barbarum*): risk of allergic reactions in individuals with food allergy. J. Investig. Allergol. Clin. Immunol., 22, 2012. pp. 345–350.
122. LEPSE L. Micropropagation, rooting and acclimatization of wolberry “New Big”. In: Acta horticulturae, 2015. 225 p.
123. LEVIN, R. A. AND J. S. MILLER. Relationships within tribe *Lycieae* (Solanaceae): paraphyly of *Lycium* and multiple origins of gender dimorphism. American Journal of Botany 92(12), 2005. pp. 44-53.
124. LI, H., ZHANG, Z., HUANG, F., CHANG, L., MA, Y.: MicroRNA expression profiles in conventional and micropropagated wolberry Plant Cell Reports, 28: 2009. pp. 891-902.
125. LI, HONGBO, XIE, JIANYIN,. Propagation of Chinese wolf-berry (*Lycium chinense*) by cuttings, Journal of Southwest Agricultural University, Vol. 22, No. 3: 2000. pp. 251-253.
126. LIFLINT H. L., LYVERSE JENNY M.,– Plants for Eastern-Est America”, Ed. John Wiley and Sons, 2015. 145 p.
127. LIM Y., LIM T., TEE J. Antioxidant properties of several tropical fruits. A comparative study. Food chemistry. 103, 2007. pp. 1003-1008.
128. LIN WS, CHEN JY, WANG JC, CHEN LY, LIN CH, HSIEH TR, The anti-aging effects of *Ludwigia octovalvis* on *Drosophila melanogaster* and SAMP8 mice. Age (Dordr), 36: 2014. pp. 689-703.
129. LITWIŃCZUK, W. Field performance of 'Senga Sengana' strawberry plants (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) obtained by runners and *in vitro* through axillary and adventitious shoots. Electronic Journal of Polish Agricultural Universities, Horticulture 2004. pp. 74-79.
130. LIU R., Dietary bioactive compounds and their health implications. J. Food Sci., 2013, 78, pp. 18-25.

131. LUO Q, CAI Y, YAN J, SUN M, CORKE H. Hypoglycemic and hypolipidemic effects and antioxidant activity of fruit extracts from *Lycium barbarum*. *Life Sci*, 76. 2004. pp. 137-149.
132. MAGYAR-TABORI, K. The role of cytokinins in shoot organogenesis in apple, *Plant Cell Tiss Org Cult*. Vol. 101. 2010. pp. 251-267.
133. MASCI, A.; CARRADORI, S.; CASADEI, M.A.; PAOLICELLI, P.; PETRALITO, S.; RAGNO, R.; CESA, S. *Lycium barbarum* polysaccharides: Extraction, purification, structural characterisation and evidence about hypoglycaemic and hypolipidaemic effects. A review. *Food Chem*. 254, 2018. pp. 377–389.
134. MASEDA P. H., LEMCOFF J. H., MURÚA M., FRAYSSINET N., CARCELLER S. M. Microcutting culture and morpho-physiological changes during acclimation in two *Lycium chilense* cytotypes. *BIOCELL* 2004, 28(3). p. 271-277. ISSN 0327 – 9545.
135. MEDINA M., Determination of the total phenols in juices and superfruits by a novel chemical method. *J. Funct. Food*, , 3, 2011. pp. 79-87.
136. MENCINICOPSCI GH., Goji - A super food, “Plafar” Magazine, no. 30, August. 2010. pp. 48-49.
137. MENCINICOPSCI I. C., BĂLAN V., Growth and development characteristics of plant individuals from two *Lycium barbarum* L. varieties, *Scientific Papers, Series A, Agronomy*, Vol. LVI, 2013. pp. 490-497. ISSN 2285-5785.
138. MENCINICOPSCI I. C., BĂLAN V., Scientific substantiation for the introduction, on Romanian territory, of *Lycium barbarum* L.: a species with sanogene properties. *AgroLife Scientific Journal*, Vol. II, Number 1, 2013., pp. 95-102. ISSN 2285-5718.
139. MENCINICOPSCI I.C., BALAN V., MANOLE C., *Lycium barbarum* L. - A new spices with adaptability potential in Bucharest area. *Scientific Papers. Series A. Agronomy*, 2: 2012. pp. 95-101.
140. METWALLY, E.I. *In vitro* propagation of garlic (*Lycium barbarum* L.) through adventitious shoot organogenesis / E.I. Metwally, M.E. El-Denary, Y.H. Dewir, Y. Naidoo, *Afr J Biotech*. Vol. 13(38). 2014. pp. 3892-3900.
141. MICHAEL E. COMPTON M. Statistical methods suitable for analysis of plant tissue culture data. Article in *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 2015. pp. 217-242.
142. MIKULIC-PETKOVSEK M., SCHMITZER V., SLATNAR A., STAMPAR F., VEBERIC R. Composition of Sugars, Organic Acids, and Total Phenolics in 25 Wild or Cultivated Berry Species. *J. Food. Sci.* 77: 2012. pp. 1064–1070.
143. MIROSSAY L., VARINSKÁ L., MOJŽIŠ J. Antiangiogenic Effect of Flavonoids and Chalcones: An Update. In: *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 19(1), 2017. 27 p.
144. MOCAN A., VLASE L., RAITA O., HANGANU D., PĂLTINEAN R., DEZSI Ș., GHELDIU A.M., OPREAN R., CRIȘAN G., Comparative studies on antioxidant activity and polyphenolic content of *Lycium barbarum* L. and *Lycium chinense* Mill. Leaves. *Pak. J. Pharm. Sci.*, 28: 2015. pp. 1511-1515.
145. MOCAN A., VLASE L., VODNAR D., BISCHIN C., HANGANU D., GHELDIU A., OPREAN R., DUMITRESCU R., CRIȘAN G. Polyphenolic content, antioxidant and antimicrobial activities of *Lycium barbarum* L., and *Lycium chinense* Mill. leaves. *Molecules*, 19, 2014. pp. 10056-10073.

146. MÖLLEROVÁ J., Notes on invasive and expansive trees and shrubs”, J. Forest Sci., 51, (Special Issue), 2005pp. 19-23.
147. MORTELMANS J., CASTEELS H., BELIËN T, *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae): A pest species new to Belgium. Belg. J. Zool., 142 (2), 2012. pp. 143-146.
148. MURASHIGE T. AND SKOOG F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. In: *Physiologia Plantarum*, vol. 15, 1962pp. 473-497.
149. NEGULESCU PUIU G., MENCINICOPSCI G. Food for a healthy life: a guide to prevention and therapy”, ed. Litera Internațional, Bucharest, 2010. p. 18.
150. OKUDA, T. Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants. *Phytochemistry* 66, 2005. pp. 2012-2031.
151. OLIVIER P. Goji (*Lycium barbarum* and *L. chinense*): Phytochemistry, Pharmacology and Safety in the Perspective of Traditional Uses and Recent Popularity, *Planta Med*, Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart New York . 2010, pp. 7–19. ISSN 0032-0943.
152. ONIGA I., BENEDEC D., HANGANU D. Analysis of Natural Medicinal Products, Cluj-Napoca: Univ. Med. Farm. „Iuliu Hațieganu”, 2004. 68 p.
153. OSMAN N.I., AWAL A., SIDIK N.J. AND ABDULLAH S., Antioxidant activities of in vitro seedlings of *Lycium barbarum* (Goji) by diphenyl picrylhydrazyl (DPPH) assay, *International Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, Supplement, Vol. 4, 2012. p.137-141.
154. OSMAN N.I., AWAL A., SIDIK N.J. AND ABDULLAH S., *In Vitro* Regeneration and Antioxidant Properties of *Lycium barbarum* L. (Goji) *Jurnal Teknologi (Sciences & Engineering)* 62:2 2013. pp. 35–38.
155. OSMAN NI, AWAL A, SIDIK NJ, ABDULLAH S., Callus induction and somatic embryogenesis from leaf and nodal explants of *Lycium barbarum* L. (goji). *Biotech* 2013. pp. 12-36.
156. PWATSON W., – „Dendrologia britannica or Trees and shrubs that will live in the open air of Britain throughout the year”, vol. 1, John and Arthur Arch, Cornhill, 1825 9 p.
157. PACIOREK, T., ZAZIMALOVA, E., RUTHARDT, N., PETRASEK, J., STIERHOF, Y.D., KLEINE-VEHN, J. Auxin inhibits endocytosis and promotes its own efflux from cells. *Nature* 435: 2005 pp. 1251–1256.
158. PARVEEN, V., V.K. SHARMA, AND A.K. MANDAL. A protocol for micropropagation of an important medicinal plant—*Oroxylum indicum* Vent. through cotyledonary nodal explants. *Ann. For. (Dehra Dun)* 13: 2005. pp. 53–58.
159. PENA A., *Agricultural Genetics – Procedure manual for laboratory works*, Nicolae Bălcescu Agronomic Institute Publishing, Bucharest, 2006. 160 p.
160. PIJUT PM, WOESTE KE, MICHLER CH. Promotion of adventitious root formation of difficult-to-root hardwood tree species. *Hortic Rev.* 38: 2011. pp. 213–51.
161. POMERLEAU J., LOCK K., KNAI C., MCKEE M., Effectiveness of interventions and programmes promoting fruit and vegetable intake. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, 2004. 391 p. ISBN 92 4 159286 9.
162. POPESCU, A. N., ISAC, V. S., COMAN, M. S. AND RADULESCU M. S. Somaclonal variation in plants regenerated by organogenesis from callus culture of strawberry (*Fragariaananassa*). *Acta Horti* 2007. pp. 439-499.

163. POTTERAT O. 2010, Goji (*Lycium barbarum* and *L. chinense*): Phytochemistry, Pharmacology and Safety in the Perspective of Traditional Uses and Recent Popularity, Planta Med Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart New York . 2010; pp. 7–19. ISSN 0032-0943.
164. RACHEL A. LEVIN, JILL S. MILLER, Relationships Within Tribe *Lycieae* (Solanaceae): Paraphyly Of *Lycium* And Multiple Origins Of Gender Dimorphism”, American Journal of Botany, 92(12), 2005 pp. 2044–2053.
165. RAJ PARODA G., S. DASGUPTA, BHAG M., GHOSH S.P. AND PAREEK S.K.. Expert Consultation on Promotion of Medicinal and Aromatic Plants in the Asia-Pacific Region Bangkok, Thailand 2-3 December, 2013. p. 94.
166. RATUSHNYAK Y. I., PIVEN N. M., RUDAS V. A. Protoplast culture and plant regeneration in *Lycium barbarum* L. *Plant Cell, Tissue and Culture*, volume 17, 1997. pp. 183–190.
167. REDGWELL, R.J.; CURTI, D.; WANG, J.; DOBRUCHOWSKA, J.M.; GERWIG, G.J.; Kamerling, J.P.; Bucheli, P. Cell wall polysaccharides of Chinese Wolfberry (*Lycium barbarum*): Part 1. Characterisation of soluble and insoluble polymer fractions. *Carbohydr. Polym.*, 84. 2011. pp. 1344–1349.
168. REED, B.M. Biodiversity conservation and conservation biotechnology tools, *In Vitro Cell Dev Biol – Plant.*– Vol. 47. 2011. pp. 1–4.
169. REED, R.C. Inhibition of auxin movement from the shoot into the root inhibits lateral root development in Arabidopsis /R.C. Reed, S.R. Brady, G.K. Muday // *Plant Physiol.* Vol. 118. 2008. pp. 1369-1378.
170. ROBERT H. MOHLENBROCK, F. Flowering plants, nightshades to mistletoe - Illustrated flora of Illinois”, SIU Press, 1990. pp. 25-28.
171. ROSSELL M. The distribution and fruiting of red and wolfberry (*Lycium barbarum* L.) in a southern Appalachian fen1. In: *Journal of the Torrey Botanical Society*, nr. 7 (16), 2013, pp. 33-50.
172. RUYU Y., HEINRICHB M., CAROLINE S. WECKERLEA D., The genus *Lycium* as food and medicine: A botanical, ethnobotanical and historical review . *Journal of Ethnopharmacology*. 212. 2018 pp. 50–66.
173. SABETI, M.; ZARGHAMI, R.; EBRAHIM, Z. M. Effects of explants and growth regulators on callogenesis and somatic embryogenesis of *Agria* potato cultivar. *International Journal of AgriScience*, v. 3 2013. pp. 213-221.
174. SAIJU, H.K. Tree tissue culture and *ex vitro* sand rooting for reforestation, In: K. Suzuki, K. Ishii, S. Sakurai, and S. Sasaki (eds.). *Plantation technology in tropical forest science*. Springer, Berlin. 2005. pp. 151–154.
175. SARKAR, A., *Plant Stem Cells*. 1st Edn., Discovery Publishing House, New Delhi, 2009. Pp. 324. ISBN-13: 9788183564076.
176. SARKAR, D.; PANDEY, S. K.; SHARMA, S. Cytokinins antagonize the jasmonates action on the regulation of potato (*Solanum tuberosum* L.) tuber formation *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 87, 2006. pp. 285-295, <https://doi.org/10.1007/s11240-006-9166-3>.

177. SCHWARZ, O.J. Propagation from nonmeristematic tissues: Organogenesis / O.J. Plant development and biotechnology (Eds. R. N. Trigiano, D. J. Gray) – Boca Raton: CRC Press LLC, 2005. pp. 159-172.
178. SEERAM, N.P. Berry fruits: Compositional elements, biochemical activities, and the impact of their intake on human health, performance, and disease. *J. Agr. Food Chem.* 56(3): 2008. pp. 627–629.
179. SEKINAEVA MA, SEREBRYANAYA FK, DENISENKO ON, LYASHENKO SS. The study of anatomical features of the herb *Lycium* (*Lycium barbarum* L). *Advances in Current Natural Sciences Modern Problems of Science and Education.* 2015;9(2). pp. 231-235.
180. SELDIMIROVA O.A., KUDOYAROVA G.R., KRUGLOVA N.N. Changes in distribution of cytokinins and auxins in cell during callus induction and organogenesis in vitro in immature embryo culture of wheat // *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant.* V. 52, № 3. 2016. pp. 251–264.
181. SELDIMIROVA O.A., TITOVA G.E., KRUGLOVA N.N. Integrated morphohistological approach to studying morphogenic structures in in vitro culture of wheat anthers. *Izvestiya RAN. Biology*, no. 2. 2016, pp. 155– 161.
182. SHARMA, S., MILLAM, S., HEDLEY, E., McNICOL, J., BRYAN, J. Molecular regulation of somatic embryogenesis in potato: an auxin led perspective. *Plant Molecular Biology*, v.68, n.1, 2008 p. 185-201, <https://doi.org/10.1007/s11103-008-9360-2>
183. SHI A., KONTARTZI S., MMBAGA M., CHEN P. Development of ISSR PCR markers for diversity study in dogwood (*Cornus* spp.). *Agric Biol J North Am* 1: 2010 pp. 189-194.
184. SHI D., SHENG M. Effect of various salt-alkaline mixed stress conditions on sunflower seedlings and analysis of their stress factors. *Environ Exp Bot* 54, 2005. pp. 8-21.
185. SILVESTRI C., SABBATINI G., MARANGELLI F., RUGINI E., AND CRISTOFORI V. Micropropagation and *Ex Vitro* Rooting of Wolfberry, Department of Agriculture and Forest Sciences (DAFNE), University of Tuscia, Via San Camillo De Lellis, Viterbo, Italy *HORTSCIENCE* 53(10), 2018. pp. 1494-499.
186. SIMCOE A. Research Station Alternative Crop and Vegetable Open House – „New Crops, Old Challenges: Tips and tricks for managing new crops!”, Tuesday, August 18, 2009, 46 p.
187. SINGLETON V.L., ORTHOFER R., AND LAMUELA - RAVENTOS R.M., Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin - Ciocalteu reagent. *Methods in Enzimology* 299: 2009. p. 152-178.
188. SINHA S. Assessment of microtubule depolymerization property of flavonoids isolated from *Tanacetum gracile* in breast cancer cells by biochemical and molecular docking approach. In: *Chem. Biol. Interact.*, vol. 239, 2015, p. 1-11.
189. SKIRVIN, R. M., MOTOIKE, S., COYNER, M. AND NORTON M. A. *Rubus* spp. cane fruit. *Biotechnology of fruit and nut crops. Biotechnology in agriculture series no. 29*, CAB International, Wallingford, UK. 2005. pp. 566-582.
190. ŠKROVÁNKOVÁ S. Bioactive Compounds and Antioxidant Activity in Different Types of Berries, In: *International Journal Mollecular Science* vol. 16 (10), Czech Republic, 2015. pp. 273-286.
191. SONG M.K., SALAM N.K., ROUFOGALIS B.D., HUANG T.H.W., *Lycium barbarum* (Goji Berry) extracts and its taurine component inhibit PPAR- $\gamma$ -dependent gene



- transcription in human retinal pigment epithelial cells: Possible implications for diabetic retinopathy treatment. *Biochem. Pharmacol.*, 82, 2011. pp. 1209-1218.
192. SONG, Y., XU, B., Diffusion Profiles of Health Beneficial Components from Goji Berry (*Lyceum barbarum*) Marinated in Alcohol and Their Antioxidant Capacities as Affected by Alcohol Concentration and Steeping Time, *Foods* 2, 2013, pp. 32-42.
  193. SRIDHAR, T.M. AND C.V. NAIDU, An efficient callus induction and plant regeneration of *Solanum nigrum* (L.)-an important antiulcer medicinal plant. *J. Phytol.*, 3: 2011. 78-82.
  194. STAJČIĆ, S. Chemical composition and antioxidant activity of berry fruits. In: *Acta Period. Techn.* vol. 43, 2012, p. 94-105.
  195. STIEFKEN L., BERNARDELLO G.,– „Karyotypic studies in *Lycium* section Mesocope (Solanaceae) from South America”, *Caryologia*, vol. 55, no. 3, 2002 pp. 199-206
  196. STREET, H.E., *Plant Tissue and Cell Culture*. 2nd Edn., Blackwell, Oxford, UK., 1977. pp. 614. ISBN-13: 978-0520034730.
  197. SUN, T., HO, C.T., Antioxidant activities of buckwheat extracts. *Food Chemistry* 90: 2005: pp. 743–749.
  198. SYMONOWICZ M, KOLANEK M. Flavonoids and their properties to form chelate complexes. *Biotechnol Food Sci.* 76(1): 2012; pp. 35-41.
  199. SZAJDEK A., BOROWSKA E. Bioactive compounds and health-promoting properties of Berry fruits: A review. *Plant Food Hum Nutr.*, vol. 63(4), 2008. pp. 147-153.
  200. SZE S.C.W., SONG J., WONG R.N.S., FENG Y.B., BUN NG, TONG Y., YAN-BO K. Application of SCAR (sequence characterized amplified region) analysis to authenticate *Lycium barbarum* (wolfberry) and its adulterants”, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, nr. 51, 2008. pp. 15–21.
  201. TABĀRA M., CIORCHINĂ N., TROFIM M., The creation application of a goji collection in the Botanical garden (I) ASM, International Scientific Symposium “Conservation of Plant Diversity”, Botanical Garden of ASM, 5th edition, 2017. pp. 110.
  202. TANG T, HE B. Treatment of d-galactose induced mouse aging with *Lycium barbarum* polysaccharides and its mechanism study. *Afr J Tradit Complement Altern Med*, 10: 2013. pp. 12-17.
  203. TANZIMAN A., REZAUL K., M. REZAUL K., RAFIUL I., MONZUR H. Callus induction and shoot regeneration in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) *International Journal of Biosciences (IJB)*. Vol. 2, No. 10(1), 2012. pp. 93-100, ISSN: 2220-6655.
  204. TARKO T., DUDA-CHODAK A., SATORA P., ZAJĄC. N., Antioxidant activity of Goji berries and bilberry at particular digestion stages in an *in vitro* model simulating the human alimentary tract, *Potravinarstvo*, vol. 7, Special Issue 2013. pp. 235-238.
  205. TERASHIMA I., HANBA Y. T, THOLEN D., NIINEMETS Ü. Leaf Functional Anatomy in Relation to Photosynthesis. *Jan*; 155(1): 2011. pp. 108–116.
  206. TRIGIANO RN, GRAY DJ, *Plant tissue culture, development, and biotechnology*. CRC Press, Boca Raton, FL, 2016. 262 p.
  207. TULIPANI S., Antioxidants in wolberry: From the genotype to the fruit composition. In: *Progress in Nutrition*, vol. 10 (4), 2008. pp. 224-229.
  208. ULLAH A., JADOON M., REHMAN A., ZEB T., KHAN K., “Effect of different GA3 concentration on in vitro propagation of potato variety Desiree,” *Asian Journal of Agricultural Sciences*, vol. 4, no. 2, 2012. pp. 108–109.

209. VAN STADEN, J. Plant growth regulators II: Cytokinins, their analogues and antagonists plant propagation by tissue culture. 3rd ed. Vol. 1. The background. (Eds. E.F. George, M.A. Hall, G.J. De Klerk). Dordrecht, Netherlands: Springer, 2008. pp. 205-226.
210. VARSHNEY, A. A protocol for *in vitro* mass propagation of Asiatic hybrids of lily through liquid stationary culture / A. Varshney, V. Dhawan, P.S. Srivastava // *In Vitro Cell Dev Biol – Plant*. Vol. 36. 2000. pp. 383-391.
211. VARSHNEY, A. Trees: propagation and conservation. Biotechnological approaches for propagation of a multipurpose tree, *Balanites aegyptiaca* Del. / A. Varshney, M. Anis – New Delhi: Springer, 2014. pp. 116.
212. VUJOVIĆ T., RUŽIĆ Đ., CEROVIC R., MOMIROVIĆ G.Š. Adventitious regeneration in blackberry (*Rubus fruticosus* L.) and assessment of genetic stability in regenerants. *Plant Growth Regulation*, 61: (2010): pp. 265–275.
213. WANG N., LIN H., YE D., CHOU T., CHEN C., LEU F., WANG D, HU R. Effects of the antioxidants *Lycium barbarum* and ascorbic acid on Reperfusion Liver injury in rats. *Transplant. Proc.*, 41, 2009. pp. 4110-4113.
214. 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*. vol. 48, 2000. pp. 140-146.
215. WANG Y, CHEN H, WU M, ZENG S, LIU Y, DONG J Chemical and genetic diversity of wolfberry. In: Chang RCC, So KF, editors. *Lycium barbarum* and Human Health. Berlin, Germany: Springer, 2015. pp. 1-27.
216. WAWRUSZAK, A., CZERWONKA, K. OKŁA AND W. RZESKI. Anticancer effect of ethanol *Lycium barbarum* (Goji berry) extract on human breast cancer T47D cell line. *Nat. Prod. Res.* 30: 2016. pp. 1993-1996.
217. WU, D.T.; LAM, S.C.; CHEONG, K.L.; FENG, W.; LIN, P.C.; LONG, Z.R.; LV, X.J.; JING, Z.; MA, S.C.; LI, S.P. Simultaneous determination of molecular weights and contents of water-soluble polysaccharides and their fractions from *Lycium barbarum* collected in China. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 129, 2016, pp. 210–218.
218. WUKA, T.P. Organogenesis of vegetative shoots from *in vitro* cultured flower buds of *Mammillaria albicoma* (Cactaceae) / T.P. Wuka, M. Hamerska, M. Wróblewska / *Plant Cell Tiss Org Cult*. — Vol. 87. 2006. pp. 27-32.
219. XIE C., XU L.Z., LI X.M., LI K.M., ZHAO B.H., YANG S.L., Studies on chemical constituents in fruit of *Lycium barbarum* L”, *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, vol. 26(5), 2001. pp. 323-324.
220. XIE, J.H.; TANG, W.; JIN, M.L.; LI, J.E.; XIE, M.Y. Recent advances in bioactive polysaccharides from *Lycium barbarum* L. *Zizyphus jujuba* Mill, *Plantago* spp. and *Morus* spp.: Structures and functionalities. *Food Hydrocoll.* 60, 2016, pp. 148–160.
221. XU L.Z., LI X.M., LI K.M., ZHAO B.H., YANG S.L., – „Studies on chemical constituents in fruit of *Lycium barbarum* L”, *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, vol. 26(5), 2001 p. 43-50.
222. XU, L.F. Plant regeneration from *in vitro* cultured leaves of Lanzhou lily (*Lilium davidii* var. *unicolor*) / L.F. Xu, F.W. Ma, D. Liang // *Sci Hortic*. — Vol. 119. 2009. pp. 458-461.

223. YAN, M.-M. Effects of explant type, culture media and growth regulators on callus induction and plant regeneration of Chinese jiaotou (*Allium chinense*), Vol 123 (1). 2009. pp. 124-128.
224. YANCHEVA, S.D. Auxin type and timing of application determine the activation of the developmental program during *in vitro* organogenesis in apple / S.D. Yancheva, S. – Vol. 165. 2003. pp. 299-309.
225. YANG, C. W. Comparative effects of salt-stress and alkali-stress on the growth, photosynthesis, solute accumulation, and ion balance of barley plants. *Photosynthetica* **47**, 2009. pp. 79–86.
226. YANJIE G., YIFO W., YUQING W., FANG G., ZHIGANG C. *Lycium Barbarum*: A Traditional Chinese Herb and A Promising Anti-Aging Agent Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing. China., 2017. pp. 778-792. ISSN: 2152-5250
227. YAO H., JIANG Y. M., Shi J. “Flavonoids in food and their health benefits,” *Plant Foods for Human Nutrition*, vol. 59, no. 3, 2004. pp. 113–122.
228. YUQING W. SHUHUA L., XU Z., ZHANG Y. Changes of the surface glycoproteins of *Lycium barbarum* under salt stress, *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, vol. 24, issue 11, 2004 pp. 2053-2056
229. ZAWADZKA, M. ORLIKOWSKA T. The influence of FeEDDHA in red raspberry cultures during shoot multiplication and adventitious regeneration from leaf explants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 85, 2006. 145-149.
230. ZENKTELER M. Development of embryos and seedlings from pollen grains in *Lycium halimifolium* Mill. in *their vitro* culture. *Biol Plant* 14, 2008. pp.. 420–422
231. ZHANG Q., CHEN W., ZHAO J., XI W. Functional constituents and antioxidant activities of eight Chinese native goji genotypes. *Food Chemistry*, 200, 2016, pp. 230-236.
232. ZHANG X, WU Z, HUANG C. Effects of gibberellin mutations on *in vitro* bud regeneration in *Arabidopsis* Afr. J Biotechnol 7 (22): 2008. pp. 4159–4163
233. ZHAO, R.; LI, Q.; XIAO, B. Effect of *Lycium barbarum* polysaccharide on the improvement of insulin resistance in NIDDM rats. *Yakugaku Zasshi* 125, 2005. pp. 981–988.
234. ZHENG G. Q, ZHENG Z.-Y., XING X., HU Z., Variation in fruit sugar composition of *Lycium barbarum* L. and *Lycium chinense* Mill. of different regions and varieties, *Biochemical Systematics and Ecology* 2010. pp. 38.
235. ZHENG J. Effects of latitude and weather conditions on contents of sugars, fruit acids, and ascorbic acids in wolberry (*L. barbarum* L.) juice. In: *Journal of Agricultural and food chemistry* vol. 57(7), 2009, pp. 2977-2981.
236. ZHENZHONG Z. KANGNING H., TAN Z., DA T., RUNJIE L. Physiological responses of Goji berry (*Lycium barbarum* L.) to saline-alkaline soil from Qinghai region, China August. *Scientific Reports* 2019. pp. 1-11. ISSN 41598-019-48514-5.
237. ACHIM G. ș.a Ghidul Peprinieristului pomicultor. Pitești Mărăcineni: INVEL Multimedia 2014. 128 p.
238. ASĂNICĂ A., TUDOR V., TEODORESCU R. I., IACOB A., ZOLOTROI V., TUDOR A. D., Rezultate despre propagarea butașilor de foioase ale unor genotipuri de *Lycium*, *Universitatea de Științe Agronomice și Medicină Veterinară din București, România, Cercetarea pomicolă*, voi. XXXII, 2016, p. 63-70.

239. BADEA E., SĂNDULESCU D. Biotehnologii vegetale. București: Fundația Biotech, 2001, pp. 143- 156.
240. BADEA, E., SĂNDULESCU, D. Biotehnologii vegetale. București, Fundația Biotech., 2001, 295 p.
241. BOTEZ M., Bădescu Gh. Botar A. Cultura arbuștilor fructiferi. Editura Ceres, București, 2000. pp. 179.
242. BALAN V., SAVA P., CALALB T., CIORCHINĂ N., ș.a. Cultura arbuștilor fructiferi și căpșunului, Chișinău: „Bons Offices”, 2017, 434 p. ISBN 978-9975-87-263-8.
243. BĂLAN V., DEJEU L., CHIRA A., CIOFU R., Horticultura alternativă și calitatea vieții, ed. GNP Minischool, București, 2003. pp. 12-81.
244. BĂLAN V., DEJEU L., CHIRA A., CIOFU R., Horticultura alternativă și calitatea vieții, ed. GNP Minischool, București, 2003. p. 121-129.
245. BOLOHAN LIVIA, GORCEAG MARIA, DODON ADELINA, DICUSAR GALINA. Aspecte în studiul indicilor de calitate a fructelor goji. Conferința Științifică Internațională Perspectivele și Problemele Integrării în Spațiul European al Cercetării și Educației Volumul I, Cahul, 7 Iunie 2016, pag. 339-342.
246. CACHIȚA-COSMA D. Tratat de biotehnologii vegetale. București, 2004. pp. 39-45.
247. CACHIȚĂ-COSMA D., Tratat de biotehnologie vegetală, Cluj-Napoca: „Dacia”, vol 1, 2004. 433 p.
248. CALALB T. Aronia Melanocarpa (Michx.) Elliot: (structura, biotehnologia, biochimia fructelor), Chișinău: Digital Hardware SRL, 2010, 148 p.
249. 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.
250. CALALB T. Structuri anatomice ale fructelor de Aronia Melanocarpa (Michx.) Elliot. În: Buletinul AȘM, Științe ale vieții. nr. 2 (305), 2008. pp. 54-62.
251. 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, pp. 211-216.
252. CALALB, T., BODRUG, M. Botanica farmaceutică. Chișinău: USMF, 2009. 506 p. ISBN 978-9975-915-44-1.
253. CATALOGUL SOIURILOR de plante al Republicii Moldova. Ed. of., Chișinău, 2018, p.84.
254. CHIRA L. Cultura arbustilor fructiferi / L. Chira. - Ed. a 4-a. - Bucuresti, 2000. 208 206. p. ISBN 973-8011-01-9.
255. CIORCHINĂ N., CUTCOVSCHII-MUȘTUC A., LOZINSCHII., MÎRZA A., **GORCEAG M.**, TROFIM M. Înmulțirea *in vitro* a unor noi specii de arbuști fructiferi de interes economic pentru R. Moldova. Conferința națională cu participare internațională „Știința în Nordul Republicii Moldova: realizări, probleme și perspective”, ed. 2, Bălți 29-30 septembrie 2016, pp. 56-58. ISBN 978-9975-89-029.
256. CIULEI, I., ISTUDOR, V., PALADE, M. Analiza farmacognostică și fitochimică a produselor vegetale. Vol. II. București: Medicală, 1995. 426 p.
257. CLAPA D., FIRA AL. Înmulțirea plantelor prin culturi *in vitro*. Publisher: Editura Risoprint. Cluj Napoca 2018. pp. 2-20. ISBN 978-972-53-2239-7.

258. CODREANU V. Anatomia comparată a viței de vie. Chișinău: Combin. Poligraf, 2006, 252 p. ISBN 9975-62-120-1.
259. COSTE G., ARSENE G. Note despre flora și vegetația antropoică din orașul Timișoara, ISIRR 2003, Secțiunea IV, Hunedoara, Romania, 2003, pp. 211-216.
260. CRIȘAN G. Studii farmacobotanice asupra unor specii indigene de *Veronica* (Scrophulariaceae). Autoref. tezei de dr. în șt. farmaceutice. Cluj-Napoca, 2004, 165 p.
261. DOROFTEI M., Cercetări ecologice asupra unor specii de plante lemnoase alohtone din Delta Dunării”, teză de doctorat, Universitatea Ovidius Constanța, 2009. pp. 234-238.
262. FORMULARUL STATISTIC Biroul Național de Statistică al R. Moldova 2017. 200 p.
263. **GORCEAG M.**, BOLOHAN L. Studiul culturii noi goji (*Lycium barbarum* L.) în Grădina Botanică. Materialele Conferinței Științifice Internaționale a Doctoranzilor „Tendințe contemporane ale dezvoltării științei: viziuni ale tinerilor cercetători”, Ediția a V-a, Chișinău, 2016, pp. 189 – 192.
264. **GORCEAG M.**, CIORCHINĂ N. Inducerea sistemului radicular *in vitro* la *Lycium barbarum* (Goji). Biotehnologii avansate – realizări și perspective, al IV-lea Simpozion național cu participare internațională, 3-4 octombrie 2016, Chișinău, p. 32.
265. **GORCEAG M.**, CIORCHINĂ N. Multiplicarea *in vitro* a culturii goji (*Lycium barbarum* L.). Simpozion dedicat aniversării a 200 de ani de la nașterea profesorului Anastasie Fătu și împlinirii a 160 de ani de la fondarea primei grădini botanice din Principatele Române. Simpozion științific - Conservarea diversității plantelor *in situ* și *ex situ*. Iași, 22 – 25 septembrie 2016, p. 42. ISBN 8-319-1423-142.
266. LADĂGHINA, E. Analiza chimică a plantelor medicinale. Chișinău: Universitas, 1993. 172 p. ISBN 5-362-01081-6.
267. LEBEDIUC N., **GORCEAG M.** Studiul flavonozidelor și taninurilor la specia *Lycium barbarum* spontan și cultivat. Materialele primului Congres al asociației studenților farmaciști din Republica Moldova, consacrat anului Nicolae Testemițeanu „Inovarea și creativitatea în practica și cercetarea farmaceutică” Revista Farmaceutică a Moldovei nr.12, 2017 p. 19.
268. LOZINSCHII M. Morfobiologia și micropropagarea soiurilor de mur fără spini în Republica Moldova. Teză de doctor, Chișinău 2019. pp. 39-45.
269. MENCINICOPSCHI I. C., BĂLAN V. Caracteristicile de creștere și dezvoltare ale indivizilor din plante din două soiuri de *Lycium barbarum* L. ”, Documente științifice, Seria A, Agonomie, Vol. LVI, 2013a. p. 490-497. ISSN 2285-5785.
270. MENCINICOPSCHI I. C., BĂLAN V., Caracteristicile indivizilor din plante din două soiuri *Lycium barbarum* L. ”, Documente științifice, Seria A, Agonomie, Vol. LVI, 2013b p. 40-49.
271. MENCINICOPSCHI I. C., BĂLAN V., „Fundația științifică pentru introducerea, pe teritoriul României, a *Lycium barbarum* L.: o specie cu proprietăți sanogene” AgroLife Scientific Journal, Vol. II, numărul 1, 2013 p. 95-102., ISSN 2285-5718.
272. MENCINICOPSCHI I. C., BĂLAN V., MANOLE C. G., - „*Lycium barbarum* L. - o nouă specie cu potențial de adaptabilitate în zona Bucureștiului”, Scientific Papers Seria A, Agronomie, voi. LV, 2012. p. 361-364 ISSN-L 2285-5785.

273. MENCINICOPSCI I., Particularități agro-biologice și sanogene ale speciei *Lycium barbarum* L. și influența acestora asupra obținerii unui produs nutraceutic. Teză de doctorat. București 2013. 2013. 254 p.
274. MENCINICOPSCI I., IOANA C., BĂLAN V., Fundație științifică pentru introducerea, pe teritoriul României, a *Lycium barbarum* L. o specie cu proprietăți sanogene. Revista Științifică AgroLife, Vol. II, numărul 1 2013. pp. 95-102. ISSN 2285-5718.
275. NISTREANU A., CALALB T. Analiza farmacognostică a produselor vegetale medicinale. Chișinău: Elan poligraf, 2016. 335 p. ISBN 978-9975-82-032-5. 33.
276. ONIGA, I. Analiza produselor naturale medicinale. Cluj-Napoca: Univ. Med. Farm „Iuliu Hațieganu”, 2004. 68 p.
277. PALANCEAN A. Dendroflora Cultivată a Republicii Moldova, teza de doctor habilitat în științe biologice, 2015, 218 p.
278. POPESCU A. Biotehnologii Aplicate pentru Producerea Materialului Săditor la Speciile Pomicole. In: Catalog de Soiuri și Material Săditor Pomicol. Coordonator: Braniște N., Editura Ceres, București. 2002: 420 p.
279. ROMAN G.V., ION V., EPURE L.I., TOADER M., BĂȘA A.G., IONESCU-TRUȚA A.M., DUȘA E.M., Ghiduri de bune practici agricole în sistem ecologic pentru plante tehnice”, ed. Alpha MDN, Buzău, 2009. pp. 16-30.
280. ROMAN G.V., ION V., EPURE L.I., TOADER M., BĂȘA A.G., IONESCU-TRUȚA A.M., – Ghiduri de bune practici agricole în sistem ecologic pentru plante tehnice, ed. Alpha MDN, Buzău, 2009. pp. 16-30.
281. ROMANCIUC G. Cercetarea proceselor de dezvoltare și multiplicare microclonală *in vitro* la *Actinidia chinensis* Planch. Teză de dr., Chișinău 2009, 142 p.
282. SAVA P., Sporirea productivității agrișului și zmeurului în cultura intensivă prin selectarea soiurilor și perfecționarea structurii plantațiilor, Teză de dr. hab., Chișinău 2019. p. 196-206.
283. STATISTICA ANUARĂ al REPUBLICII MOLDOVA. Biroul Național de Statistică al Republicii Moldova. F.E.P. “Tipogr. Centrală”, Ch.: Statistica, 2016, 189 p.
284. STĂNICĂ F., DUMITRAȘCU M., DAVIDESCU V., MADJAR R., PETICILĂ A., Înmulțirea plantelor horticole lemnoase, Format electronic, Editura Invel Multimedia, București, 2003, 431 p. ISBN 973-86341-4-8.
285. STĂNICĂ, F., Microînmulțirea plantelor horticole, Format electronic, Editura Invel Multimedia, București. 2004. pp. 20-48. ISBN 973-7753-07-0.
286. **TABĂRA M.**, CIORCHINĂ N., TROFIM M., CUTCOVSCHI MUȘTUC A., Influența regulatorilor de creștere asupra procesului de multiplicare la specia *Lycium barbarum* L. Conferința științifico-practică „Instruire prin cercetare pentru o societate prosperă” consacrată jubileului „90 de ani ai Facultății Biologie și chimie”, Chișinău 2020 pp. 221-228. ISBN 978-9975-76-307-3.
287. **TABĂRA M.** Influența hormonilor de creștere asupra procesului de organogeneză *in vitro* la *Lycium barbarum* L. Simpozionul științific internațional „Biotehnologii avansate – realizări și perspective”. Ediția a V-a 21-22 octombrie 2019 Chișinău, p.68. ISBN 978-9975-56-695-7.
288. **TABĂRA M.**; CIORCHINĂ N.; TROFIM M. Cerințele față de mediu și caracteristicile ecologice ale speciei *Lycium barbarum* L. The National Conference with International

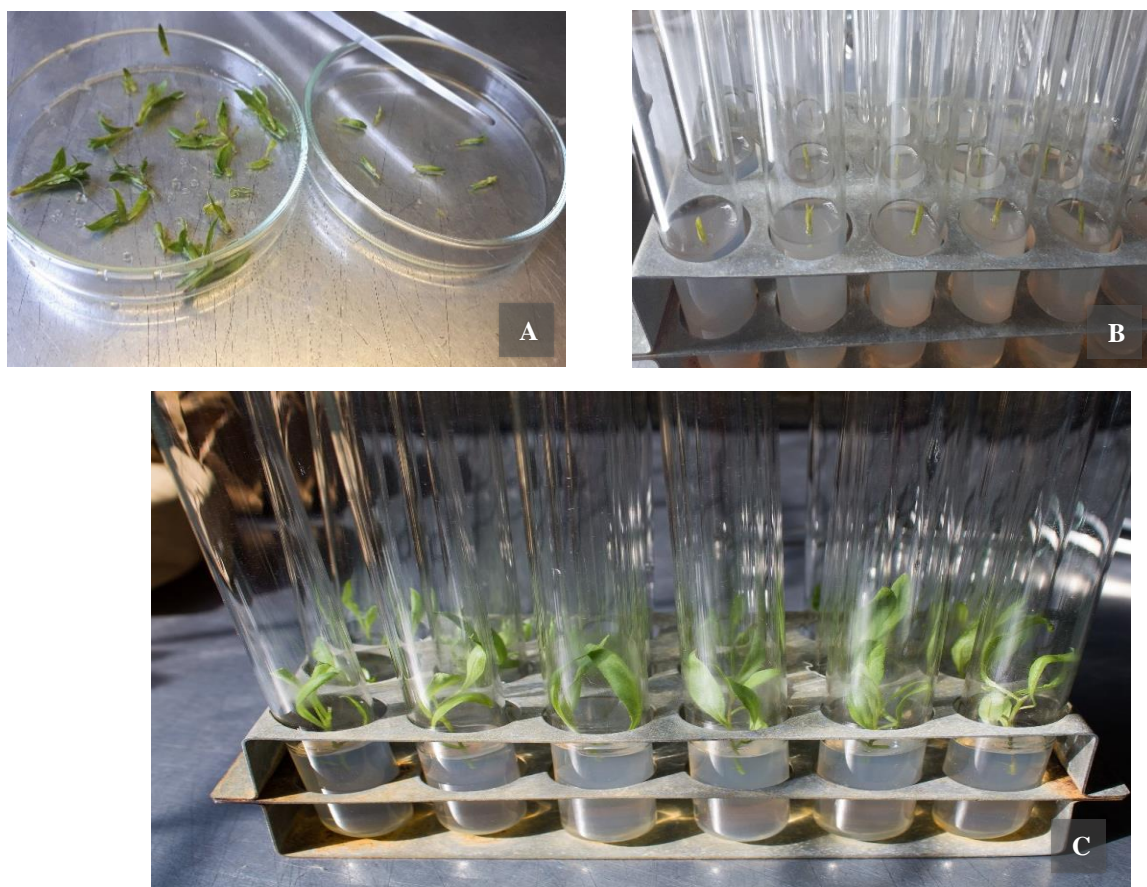
- Participation "Dimitrie Cantemir" State University Chisinau, Republic of Moldova., october 21-22, 2019, pp.175-176. ISBN 978-9975-108-83-6.
289. **TABĂRA M.**; CIORCHINĂ N.; TROFIM M.; CUTCOVSCHII-MUȘTUC A. Micropropagarea soiul de goji „Erma”, Conferința Științifică Națională cu Participare Internațională „Știința și inovarea în nordul Republicii Moldova: probleme, realizări, perspective” (ediția a treia) Bălți, 21-22 iunie 2019 p. 336-340. ISBN 978-9975-3316-1-6.
  290. **TABĂRA M.**, CIORCHINĂ N., CUTCOVSCHI-MUȘTUC A., TROFIM M., MÎRZA AL. Procesele calusogene la *Lycium barbarum* L UASM au demarat lucrările Simpozionului Științific Internațional “Agricultura modernă – realizări și perspective”, dedicat aniversării 85 ani de la fondarea UASM, 04-06 octombrie 2018, pp. 363-368.
  291. **TABĂRA M.**, CIORCHINĂ N., TROFIM M. Inițierea procesului de calusogeneză și morfogenezăla *Lycium barbarum* L. (goji). Conferința Științifică a Doctoranzilor „Tendințe contemporane ale dezvoltării științei: viziuni ale tinerilor cercetători”, ediția a VII-a la 15 iunie 2018, p. 196-201.
  292. **TABĂRA M.**, Înființarea unei colecții de goji pe teritoriul Grădinii Botanice (I) AȘM., Conferința Științifică a Doctoranzilor „Tendințe contemporane ale dezvoltării științei: viziuni ale tinerilor cercetători” Ediția a VI-a, 2017, p. 264-268.
  293. **TABĂRA M.**, Structura anatomică a laminei frunzei speciei spontane *Lycium barbarum* L. și a soiurilor, Akademos – Revistă de știință, inovare, cultură și artă, Nr. 1 (56), 2020, pp. 15 – 20.
  294. TROFIM M., **TABĂRA M.**, CIORCHINĂ N. Aclimatizarea vitroplantulelor la condiții *ex vitro*. Conferința științifico-practică „Instruire prin cercetare pentru o societate prosperă” consacrată jubileului „90 de ani ai Facultății Biologie și chimie”, Chișinău 2020 pp. 241-248. ISBN 978-9975-76-307-3.
  295. UGUREANU I., Calendarul Pomicultorului. Ed. BREN, București: 2003. 119 p.
  296. ЖУРАВЛЕВ Ю.Н., ОМЕЛЬКО А.М. Морфогенез у растений *in vitro* // Физиология растений. 2008. Т. 55, № 5. С. 643–664.
  297. КАЛИНИН Ф.Л., В.В. САРНАЦКАЯ, В.Е. ПОЛИЩУК. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений /. – Киев: Наук. думка, 2008. 488 с.
  298. ГЕЙДЕМАН Т. Определитель высши растений МССР, Кишинёв, 1986, 638 с.
  299. ДЕРФЛИНГ К. Ю. Гормоны растений. М.: Мир 1985, 303 с.
  300. ДОСПЕХОВ, Б. А. Методика полевого опыта. Москва, Колос, 1979. 414 с.
  301. ЖУРАВЛЕВ, Ю.Н. Морфогенез у растений *in vitro*. Физиология растений. Т. 55, № 5. 2008. –643-664.
  302. КАЛИНИН Ф. Л., КУШНИР Г. П., САРНАЦКАЯ В. Технология микрклонального размножения растений. Киев: Наукова Думка, 1992, 232 с.
  303. КАЛИНИН, Ф.Л. Иллюстрированная энциклопедия растительного мира Сибири (Ред. В.П. Седельников). – Новосибирск: Арта, 2009. 392 с.
  304. КАЛИНИН, Ф.Л. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений / Ф.Л. Калинин, В.В. Сарнацкая, В.Е. Полищук. – Киев: Наук. думка, 1980. – 488 с
  305. КРУГЛОВА Н.Н., Сельдмирова О.А. Потенциально морфогенный каллус пшеницы в культуре *in vitro*. Biology (2), 2018. 61-65 с.. ISSN 234. 903.290.
  306. НОВОСЕЛОВ, Ю. Методические указания по проведению полевых опытов с кормовыми культурами. Москва: ВИК, 1983. 197 с.

307. ПОЛЕВОЙ В. В. Фитогормоны. Ленинград: Изд-во ЛГУ, 1982, 248 с.
308. СЕЛЬДИМИРОВА О.А., КРУГЛОВА Н.Н., ЗИНАТУЛЛИНА А.Е. Роль фитогормонов в индукции каллусогенеза и регуляции путей морфогенеза каллусов злаков *in vitro* // Научный результат. Серия физиол. Т. 3, № 1. 2017. 8–13 с.
309. ЧОРКИНЭ Н.Г., ТАБАРА М. АКУТКОВСКИ-МУШТУК., А.И., ТРОФИМ М.И., ЛОЗИНСКИ М.Н. *Lycium barbarum* L. (гожи) в культуре *in vitro*, сорт Эрма. Conference: Annual Meeting Society of Plant Physiologists of Russia Mechanisms of resistance of plants and microorganisms to unfavorable environmental Book of Proceedings (in two parts) of the All-Russian Scientific Conference with International Participation and Schools of Young Scientists, Irkutsk. 2018. pag. 1423-1427 ISBN 978-5-94797-324-2.
310. eFLORASA(ElectronicFloraofSouthAustralia)[http://www.flora.sa.gov.au/efsa/lucid/Solanaceae/Solanaceae%20species/key/Australian%20Solanaceae%20species/Media/Html/Lycium\\_barbarum.htm](http://www.flora.sa.gov.au/efsa/lucid/Solanaceae/Solanaceae%20species/key/Australian%20Solanaceae%20species/Media/Html/Lycium_barbarum.htm) (accesat pe 01.05.2017, ora 19:26).
311. <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/kew-2499019>.
312. [https://www.clematis.com.pl/ru/encyklopedia/?tx\\_plant\\_pi1%5Bplant%5D=947](https://www.clematis.com.pl/ru/encyklopedia/?tx_plant_pi1%5Bplant%5D=947).
313. [https://www.clematis.com.pl/ru/encyklopedia/?tx\\_plant\\_pi1%5Bplant%5D=947](https://www.clematis.com.pl/ru/encyklopedia/?tx_plant_pi1%5Bplant%5D=947).
314. <https://www.kraeuter-und-duftpflanzen.de/pflanzen-saatgut/gagelstrauch-guduchi/goji-beere/goji-beere-new-big-pflanze>.
315. <https://www.kraeuter-und-duftpflanzen.de/pflanzen-saatgut/gagelstrauch-guduchi/goji-beere/goji-beere-new-big-pflanze>.
316. <https://www.presasm.ro/fotogalerie-plantatie-unica-in-europa-la-satu-mare-sustinere-de-la-cel-mai-inalt-nivel/>.
317. <https://www.presasm.ro/satmareanul-cu-cea-mai-mare-cultura-de-goji-din-romania-condamnat-apel-catre-ministrul-agriculturii/>.
318. <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/kew-2499019>.
319. <http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods>.
320. [http://window.edu.ru/catalog/pdf2txt/057/76057/57124?p\\_page=6](http://window.edu.ru/catalog/pdf2txt/057/76057/57124?p_page=6).
321. [https://studylib.ru/doc/2339949/biohimiya-rastenij---biologicheskij-fakul.\\_tet](https://studylib.ru/doc/2339949/biohimiya-rastenij---biologicheskij-fakul._tet)



## ANEXE

### Anexa 1. Microînmulțirea soiurilor de goji



**Fig. A.1.1. Inocularea explantelor de goji soiul 'Erma'**

*Notă: A - meristeme apicale; B - inocularea meristemelor pe mediu agarizat; C – creșterea explantelor după 14 zile.*



**Fig. A. 1.2. Microclonarea *in vitro* cu citochinine a soiurilor de goji**



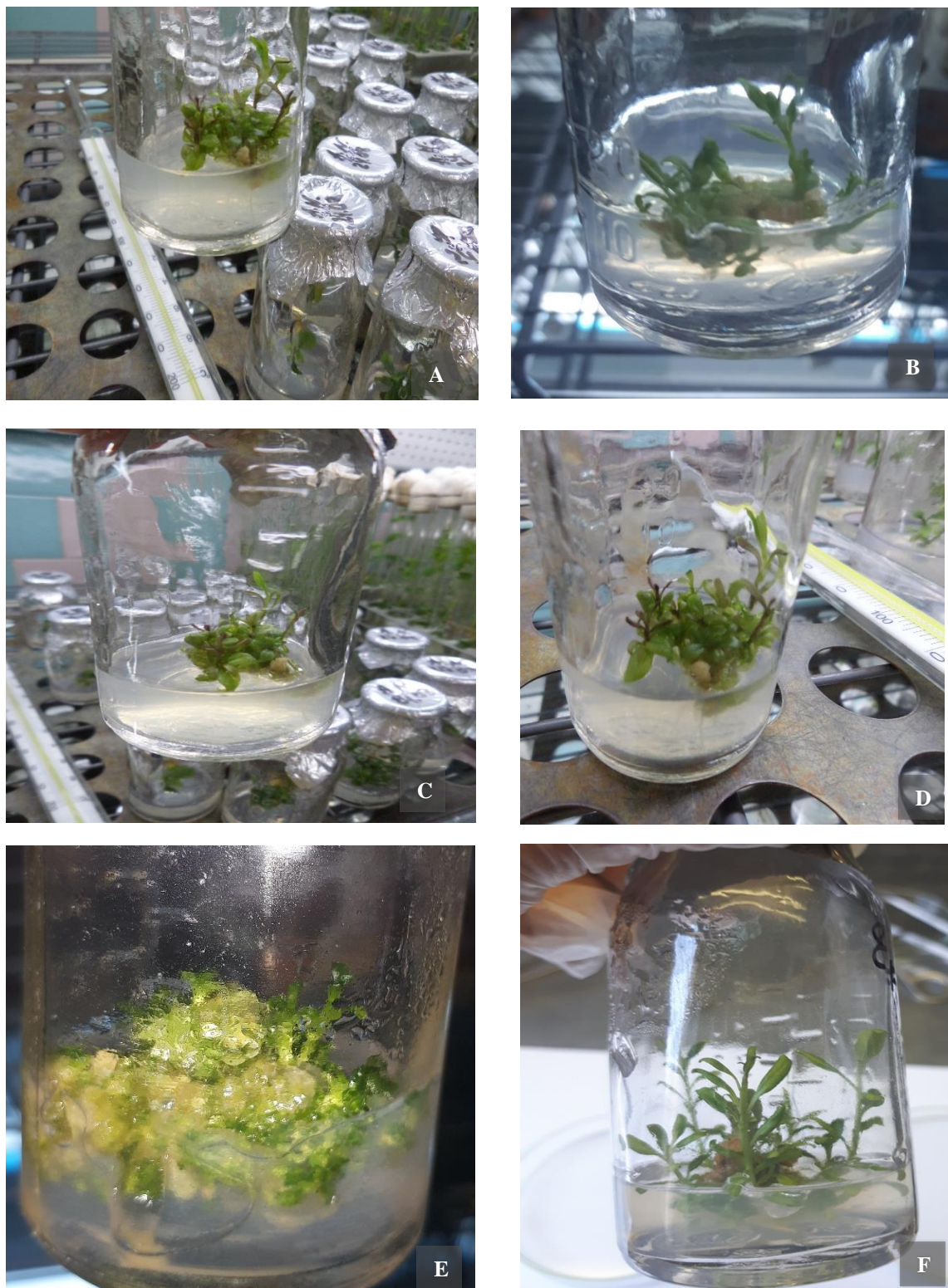
**Fig.A 1.3. Inducerea microclonării BAP 0, 5 mg/l la soiul 'New Big'**



**Fig.A 1.4. Inducerea microclonării BAP 0, 5 mg/l la soiul 'Licurici'**

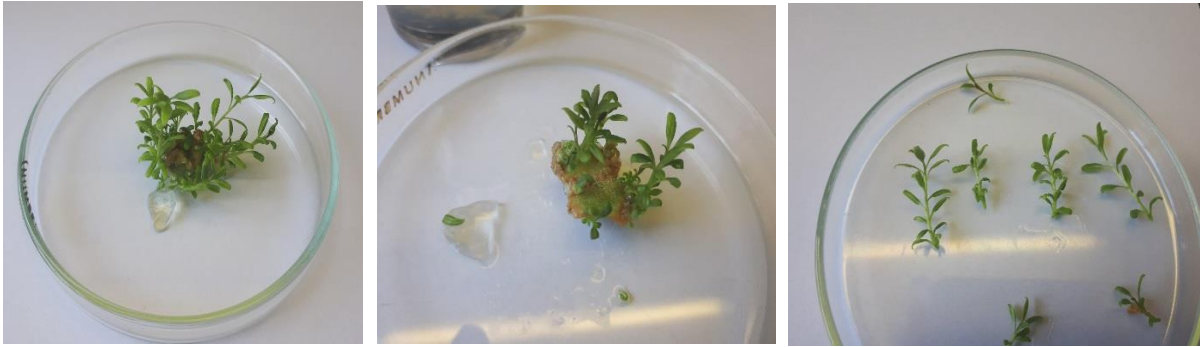


## Anexa 2. Calusogeneza și organogeneza obținută din limb foliar și pețiol

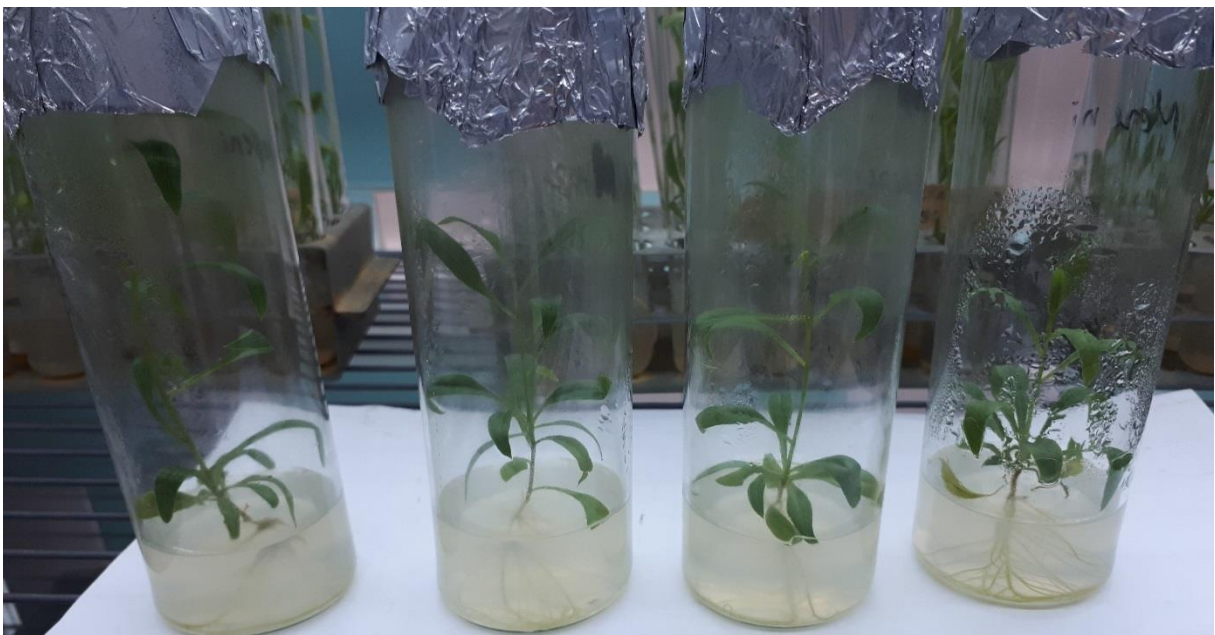


**Fig. 2.1. Obținerea plantulelor prin organogeneză indirectă**

**Notă:** **A** – soiul 'Ning Xia N1' din segment de pețiol; **B** – soiul 'Ning Xia N 1' din segment de frunză;  
**C, D** – soiul 'Licurici' segment de pețiol; **E**- soiul 'New Big' segment de pețiol; **F** – soiul 'Erma'  
segment de pețiol.



**Fig. 2.2. Dezvoltarea plantulelor din masă calusară (segment de pețiol) la soiul 'Erma'**



**Fig. 2.3. Înradăcinarea vitroplantulelor provenite din masa calusară**



### Anexa 3. Micropropagarea și rizogeneza soiurilor de goji



**Fig. 3.1. Înfrădăcinarea soiului de goji 'Erma' suplinit cu auxina ANA de 0,2 mg/l, pe mediu lichid și solid**

#### Anexa 4. Aclimatizarea vitroplantulelor de goji



**Fig. 4.1. Dezvoltarea sistemului radicular la toate soiurile goji, după 20 zile**



## Anexa 5. Material săditor obținut prin metode *in vitro*



**Fig 5.1. Aclimatizarea plantelor de goji (etapa II)**

*Notă:* A – soiul 'New Big', după 10 zile; B – soiul 'Licurici', după 30 zile; C – soiul 'Ning Xia N1', după 50 zile.



## Anexa 6. Colecția de arbuști fructiferi de goji

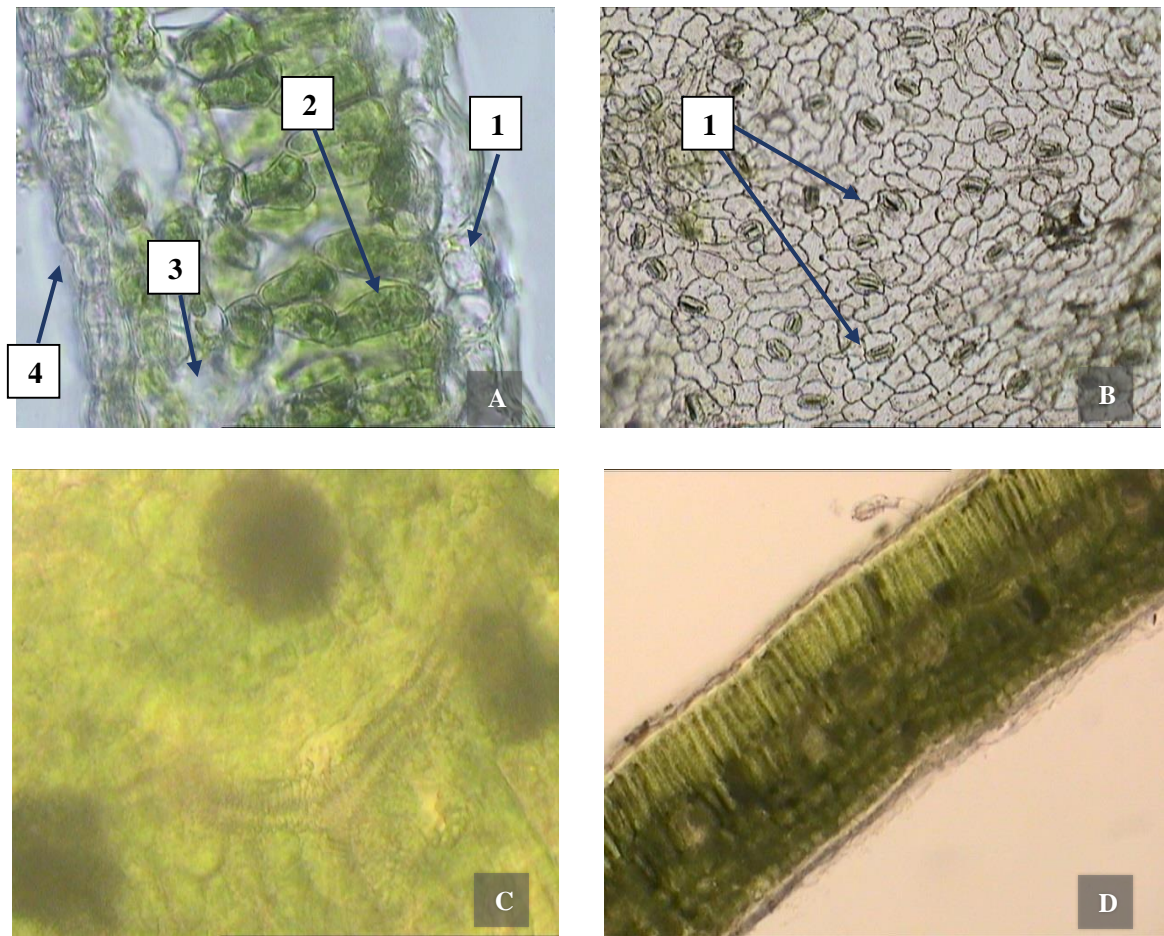


**Fig. 6.1. Precocitatea de rodire a soiurilor de goji studiate**

**Notă:** A – soiul 'Ning Xia N1' în primul an de plantare; B – soiul 'Erma' în primul an de plantare; C, D – soiul 'Erma' în anul doi de plantare; E, F – soiul 'Licurici'.

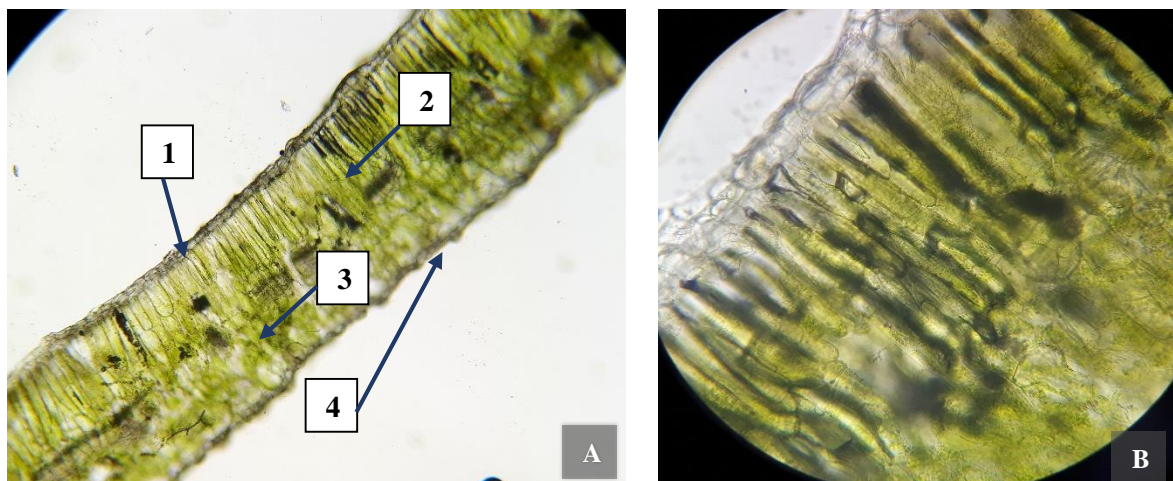


**Anexa 7. Structura anatomică a laminei frunzei la taxonii de *Lycium***

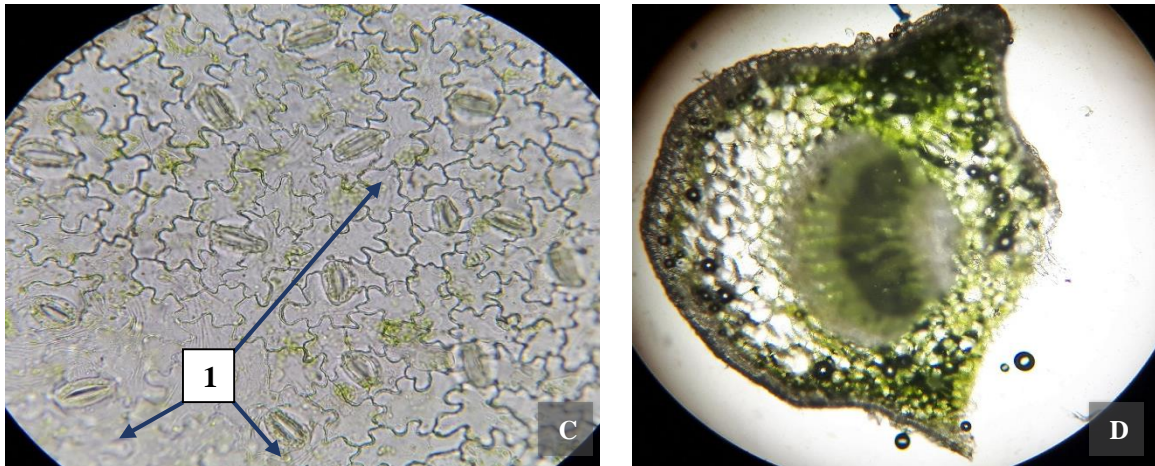


**Fig.7.1. Flora spontană**

**Notă:** A: 1 – epiderma superioară; 2 – țesut palisadic; 3 – țesut lacunar; 4 – epiderma inferioară (×40).  
 B: epiderma inferioară 1- stomate (×10), C: druze oxalice (×40), D: Secțiune transversală prin limb (×10).

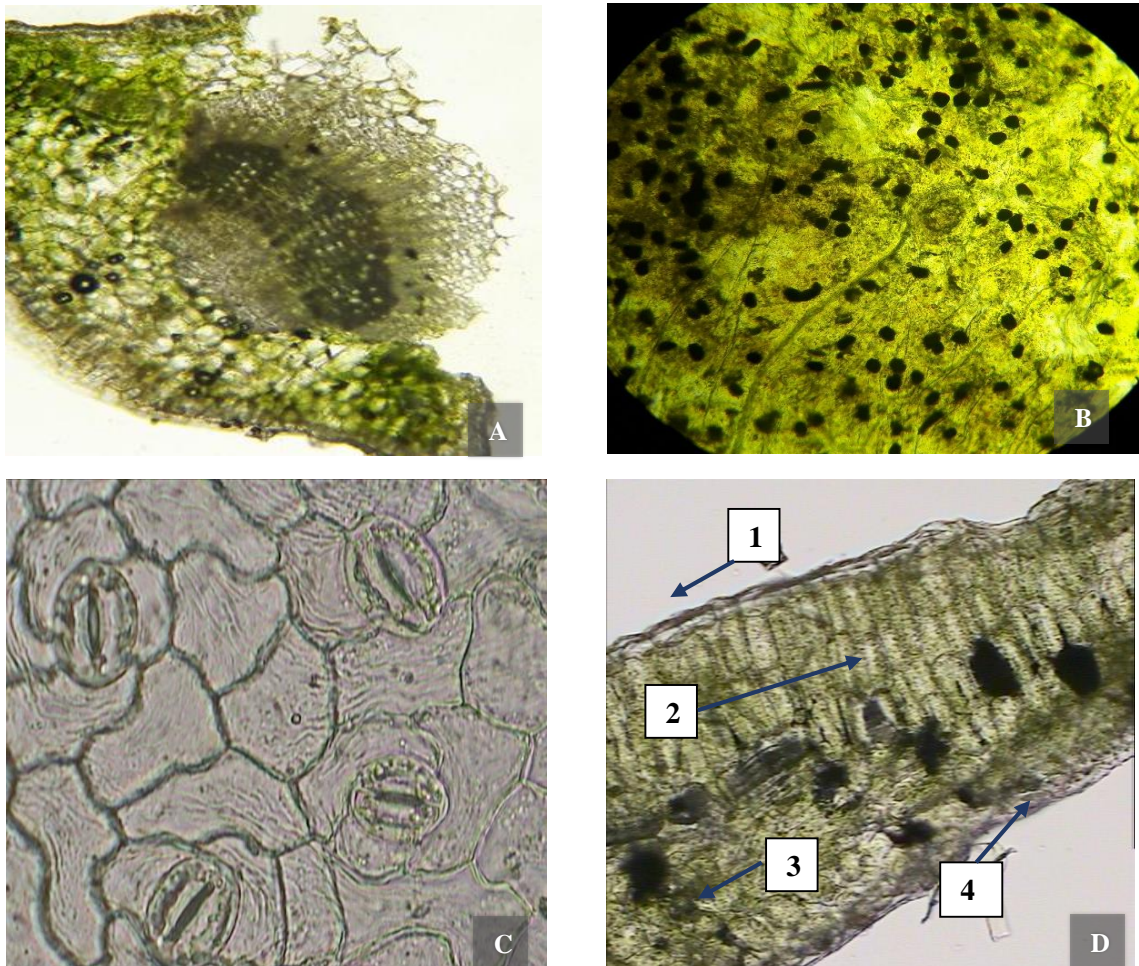






**Fig.7.2. Soiul 'Erma'**

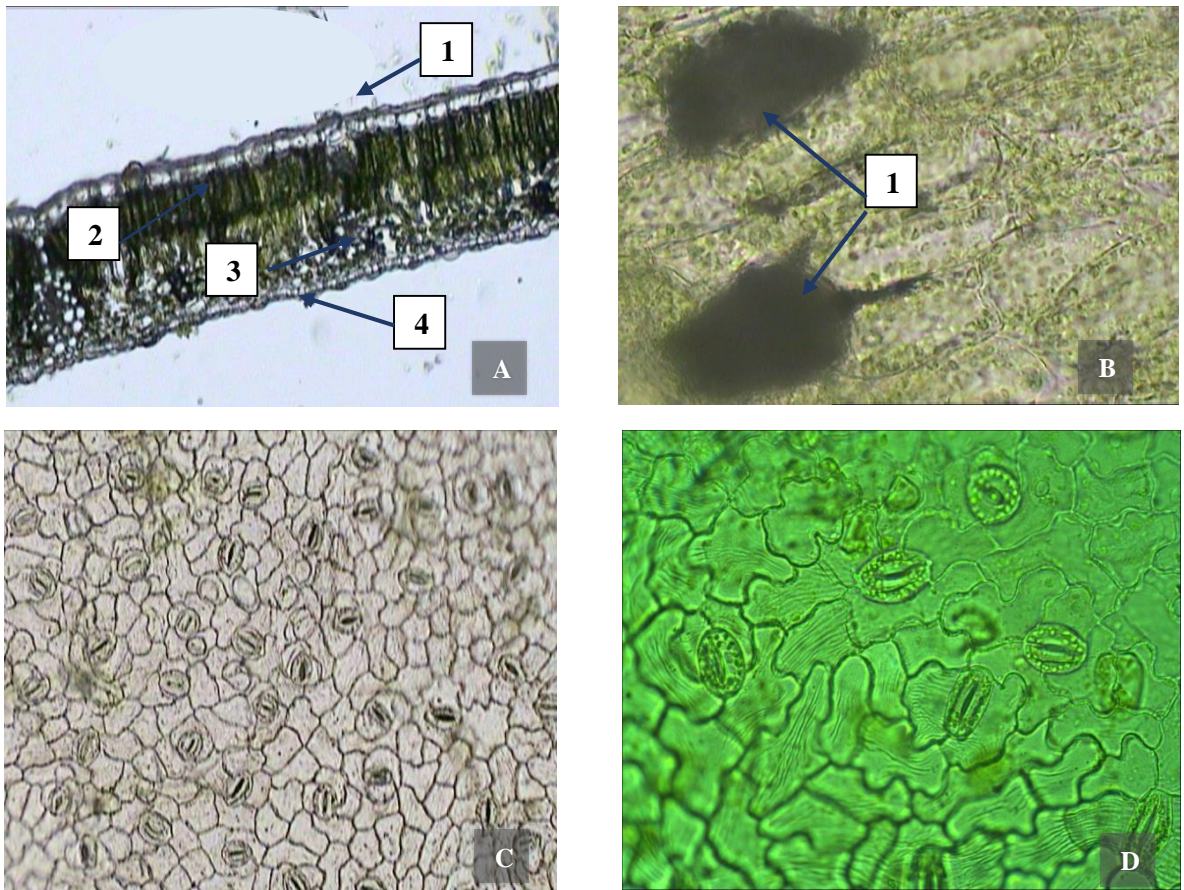
**Notă:** A: 1 – epiderma superioară; 2 – țesut palisadic; 3 – țesut lacunar; 4 – epiderma inferioară (×10).  
**B:** secțiune transversală prin limbul foliar (x40), **C:** epiderma inferioară,1-stomate (×40), **D:** secțiune prin nervură (×40).



**Fig. 7.3. Soiul 'Licurici'**

**Notă:** A: secțiune prin nervură (×40), **B:** druze oxalice (×10), **C:** epiderma inferioară, stomate (×40), **C:** 1 – epiderma superioară; 2 – țesut palisadic; 3 – țesut lacunar; 4 – epiderma inferioară (×40).





**Fig.7.4. Soiul 'Ning Xia N1'**

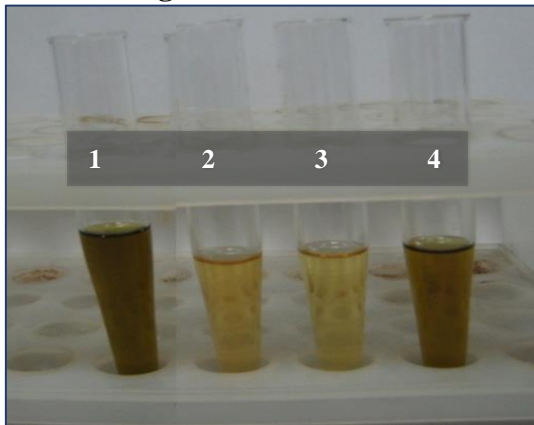
**Notă:** A: 1 – epiderma superioară; 2 – țesut palisadic; 3 – țesut lacunar; 4 – epiderma inferioară ( $\times 10$ ).  
**B:** druze de oxalat de calciu în frunze ( $\times 40$ ), **C, D:** epiderma inferioară, stomate ( $\times 10$ ,  $\times 40$ ).

**Anexa 8. Studiul fitochimic al taxonilor de *Lycium* (fructe, frunze)**

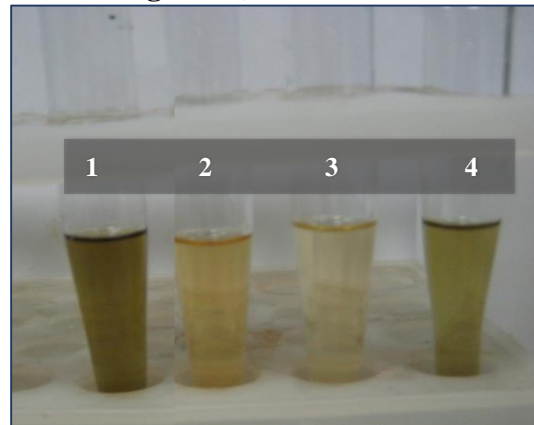
***Identificarea Flavonoidelor***



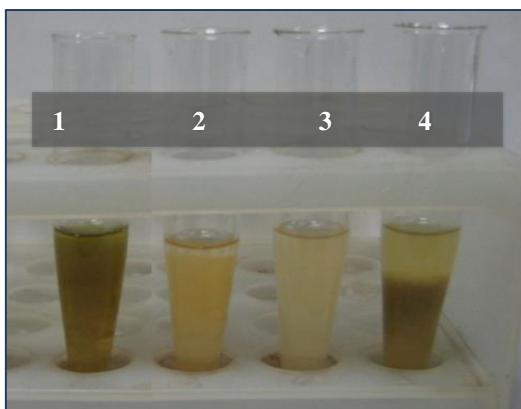
**Fig. 8. 1. Extractele analizate la produsele vegetale (identificarea flavonoidelor):**



**Fig. 8.2. Efectul calitativ al reacției cu soluție de amoniac în produsele vegetale**



**Fig. 8.3. Efectul calitativ al reacției cu acid sulfuric concentrat în produsele vegetale**



**Fig. 8.4. Efectul calitativ al reacției cu acetat de plumb de 10 % în produsele vegetale**



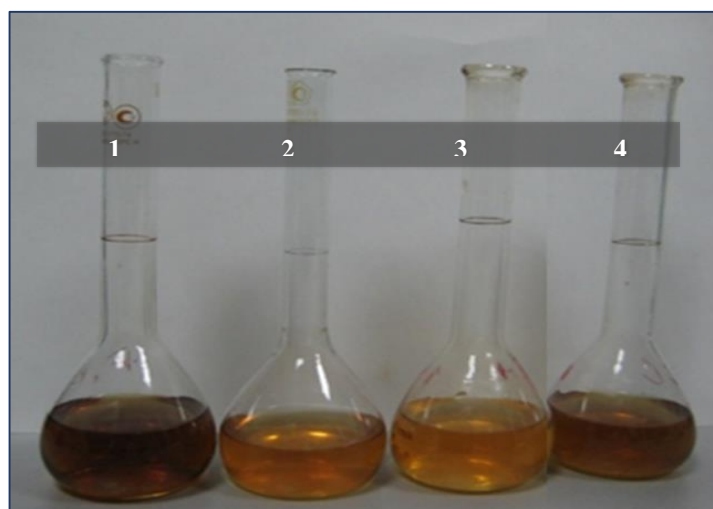
**Fig. 8.5. Efectul calitativ al reacției cu soluție de vanilină 1% în acid clorhidric concentrat în produsele vegetale**



**Fig.8.6. Efectul calitativ al reacției cu acid clorhidric și zinc metalic în produsele vegetale**

**Notă:** **1** – frunze *Lycium barbarum* L. (flora spontană); **2** – fructe *Lycium barbarum* L. (flora spontană); **3** – fructe soiul 'Ning Xia N1'; **4** – frunze soiul 'Ning Xia N1'.

### *Identificarea Taninurilor*



**Fig. 8.7. Extractele analizate la produsele vegetale (identificarea taninurilor):**



**Fig. 8.8. Efectul calitativ al reacției cu soluție de gelatină 1% în produsele vegetale**



**Fig. 8.9. Efectul calitativ al reacției cu soluție de alăuni de fier și amoniu în produsele vegetale**





**Fig. 8.10. Efectul calitativ al reacției cu soluție de acid acetic de 10% și acetat de plumb de 10% în produsele vegetale**




**Fig. 8.11. Efectul calitativ al reacției cu soluție de clorură de aluminiu în produsele vegetale**



**Fig.8.12. Efectul calitativ al reacției cu cristale de nitrit de sodium și acid clorhidric 0,1n în produsele vegetale**

**Notă:** 1 – frunze *Lycium barbarum* L. (flora spontană); 2 – fructe *Lycium barbarum* L. (flora spontană); 3 – fructe soiul 'Ning Xia N1'; 4 – frunze soiul 'Ning Xia N1'.



Acordarea protecției pentru soi de plantă				
Depunere		Nr. Cererii	Stadiul examinării	Denumirea soiului
țara	data			
-	-	-	-	-
-	-	-	-	-
-	-	-	-	-
Admiterea soiului în producere				
Depunere		Nr. Cererii	Stadiul examinării	Denumirea soiului
țara	data			
-	-	-	-	-
-	-	-	-	-
-	-	-	-	-
<b>O examinare tehnică a soiului în scopuri oficiale:</b> <input type="checkbox"/> a fost deja realizată <input type="checkbox"/> este în curs de a fi realizată <input checked="" type="checkbox"/> nu a fost încă realizată				
<b>VI. Soiul a fost vândut sau oferit spre exploatare până la data depunerii cererii de brevet:</b> 72) în Republica Moldova: <input type="checkbox"/> da <input checked="" type="checkbox"/> nu <input checked="" type="checkbox"/> propus pentru prima dată data comercializării cu denumirea: b) în altă țară (cod țară conform normei ST. 3 OMPI): <input type="checkbox"/> da <input checked="" type="checkbox"/> nu <input checked="" type="checkbox"/> propus pentru prima dată data comercializării cu denumirea: c) amelioratorul/solicitantul a dat autorizație pentru comercializare: <input type="checkbox"/> da <input checked="" type="checkbox"/> nu				
<b>VII. Soiul reprezintă un organism modificat genetic?</b> <input type="checkbox"/> da <input checked="" type="checkbox"/> nu Documente justificative privind introducerea în mediu a organismului modificat genetic (după caz)				
<b>VIII. (30) PRIORITATE INVOCATĂ:</b>				
(31) Nr.	(32) Data	(33) Țara	Denumirea solicitată	
		MD	<i>Lycium barbarum</i> ,LICURICI'	
<b>IX. Declar(ăm) că ameliorator(i) este (sunt):</b> a) <input checked="" type="checkbox"/> același (aceiași) cu solicitantul(ții) b) <input type="checkbox"/> persoana(ele) menționată(e) mai jos				
(72) Numele și prenumele, cod țară conform normei ST. 3 OMPI		Adresa completă, numărul de identificare de stat unic (IDNP)	Locul de muncă și funcția la data creării soiului	Semnătura amelioratorului
Ciorchină Nina, Grădina Botanica (Institut) a A.Ș.M., strada Pădurii 18, Chișinău, MD 2002, + 373 22 523481, + 373 22 550443		Grădina Botanica (Institut) a A.Ș.M., strada Pădurii 18, Chișinău, MD 2002, + 373 22 523481, + 373 22 550443 1005600032960	Grădina Botanica (Institut) a A.Ș.M., laboratorul embriologie și biotehnologie, strada Pădurii 18, Chișinău, MD 2002 Doctor confirențiar	



<p>Tabăra Maria, Grădina Botanica (Institut) a A.Ș.M., strada Pădurii 18, Chișinău, MD 2002, + 373 22 523481, + 373 22 550443</p>	<p>Grădina Botanica (Institut) a A.Ș.M., strada Pădurii 18, Chișinău, MD 2002, + 373 22 523481, + 373 22 550443 1005600032960</p>	<p>Grădina Botanica (Institut) a A.Ș.M., laboratorul embriologie și biotehnologie, strada Pădurii 18, Chișinău, MD 2002 Cercetător științific stagiar</p>	
<p>Trofim Mariana, Grădina Botanica (Institut) a A.Ș.M., strada Pădurii 18, Chișinău, MD 2002, + 373 22 523481, + 373 22 550443</p>	<p>Grădina Botanica (Institut) a A.Ș.M., strada Pădurii 18, Chișinău, MD 2002, + 373 22 523481, + 373 22 550443 1005600032960</p>	<p>Grădina Botanica (Institut) a A.Ș.M., laboratorul embriologie și biotehnologie, strada Pădurii 18, Chișinău, MD 2002 Cercetător științific stagiar</p>	

**X. DOCUMENTE DEPUSE**

	Nr. file	Nr. ex.		Nr. file	Nr. ex.
<input checked="" type="checkbox"/> formular cerere-tip	4	4	<input checked="" type="checkbox"/> fotografii:	2	4
<input type="checkbox"/> descrierea soiului DUS, VAT	1	4	<input checked="" type="checkbox"/> alb-negru		
<input checked="" type="checkbox"/> chestionar tehnic	3	4	<input type="checkbox"/> color	2	4
			<input type="checkbox"/> certificat fitosanitar		
<b>documente anexate:</b>			<b>alte documente:</b>		
<input type="checkbox"/> dovada de plată a taxei			<input type="checkbox"/>		
<input type="checkbox"/> dovada de drept la înlesnire			<input type="checkbox"/>		
<input type="checkbox"/> act de prioritate			<input type="checkbox"/>		
<input type="checkbox"/> procură			<input type="checkbox"/>		

**XI. Informații suplimentare privind soiul:**

Grupa de maturitate	medie
Direcția de utilizare	Industria alimentară și farmaceutică
Zona de cultivare	Republica Moldova
Recomandări speciale	Afinare superficială și irigare prin picurare. Ideal pentru înființarea unor plantații de pomușoare. Rezistent la factorii biotici și abiotici, Se multiplică prin ușor prin cultura <i>in vitro</i> , Arbustul de o decorativitate înaltă prin portul și fructele sale.

**XII. Semnând această cerere solicitantul:**

- a. confirmă toate informațiile privind soiul și își asumă obligația de a pune la dispoziție toate informațiile suplimentare care vor fi solicitate
- b. confirmă obligația de achitare a taxelor prevăzute
- c. confirmă obligația de a prezenta gratuit semințe sau material săditor în cantitatea și termenele cerute
- d. confirmă că acest soi nu a mai fost înregistrat sub alt nume

**XIII. Semnătura solicitantului(lor)/reprezentantului**  
(numele complet):

**Ciorchină Nina – solicitant Grădina Botanica**  
(Institut) a A.Ș.M. N. Ciorchină

**Tabăra Maria - solicitant Grădina Botanica**  
(Institut) a A.Ș.M. M. Tabăra

**Trofim Mariana - solicitant Grădina Botanica**  
(Institut) a A.Ș.M. M. Trofim

**Teuță Alexandru - Director Grădina**  
**Botanica (Institut) a A.Ș.M.** A. Teuță

Data

**XIV. a) Persoana care a prezentat cererea, alta decât**  
solicitantul, reprezentantul (numele și actul deidentitate):  
**Ciorchină Nina, B.I. – A 34026601**b) Semnătura de primire a cererii la AGEPI  
(numele complet):**XV. Registratura ieșire:**Nr. **631** Data **2017 02. 23.**

## Anexa 10. Acte de implementare a rezultatelor științifice

MINISTERUL EDUCAȚIEI,  
CULTURII ȘI CERCETĂRII  
AL REPUBLICII MOLDOVA



MINISTRY OF EDUCATION,  
CULTURE AND RESEARCH OF  
THE REPUBLIC OF MOLDOVA

GRĂDINA BOTANICĂ NAȚIONALĂ  
(INSTITUT)  
"ALEXANDRU CIUBOTARU"

"ALEXANDRU CIUBOTARU"  
NATIONAL BOTANICAL GARDEN  
(INSTITUTE)

str. Pădurii, 18  
MD - 2002, Chișinău, Republica Moldova  
Tel/fax: (+373 22) 55-04-43  
E-mail: [gradinabotanica.chisinau@gmail.com](mailto:gradinabotanica.chisinau@gmail.com)  
[botanicalgardenchisinau@yahoo.com](mailto:botanicalgardenchisinau@yahoo.com)

18, Padurii Street  
MD - 2002, Chisinau, Republic of Moldova  
Tel/fax: (+373 22) 55-04-43  
E-mail: [gradinabotanica.chisinau@gmail.com](mailto:gradinabotanica.chisinau@gmail.com)  
[botanicalgardenchisinau@yahoo.com](mailto:botanicalgardenchisinau@yahoo.com)

Nr. 38/11- 2  
din 01 octombrie 20 19

### ACT

#### de implementare a activităților științifice în practică

Prin prezentul, Grădina Botanică Națională (Institut) "Alexandru Ciubotaru" (GBNI) confirmă că colecția taxonilor de *Lycium barbarum* L., aflată pe lotul experimental de introducere al GBNI, a fost fondată de doctoranda - cercetătorul științific **Tabăra Maria** în anul 2017. Respectiv colecția este utilizată în calitate de lot experimental de cercetare și testarea vitroplantulelor soiurilor noi de **goji**, tot odată aplicată în procesul didactic la practica tehnologică pentru elevii și studenții de la școli profesionale, colegii și universități (Școala profesională din Bubuieci, Colegiul de Ecologie, Centrul de Excelență în Medicină și Farmacie „Raisa Pacalo”, Universitatea de Stat din Tiraspol, Universitatea de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițeanu”, etc).

Director,  
doctor în științe biologice



Ion ROȘCA



MD 2025, Chișinău, str. Malina Mică, 66, tel: (+373) 22 790174, (+373) 22205456, (+373) 22 205457; [farmacie@usmf.md](mailto:farmacie@usmf.md); [www.usmf.md](http://www.usmf.md)

Nr. 159

" 12 Iunie 2020

### Act de implimentare

Prin prezenta se confirmă, că rezultatele științifice pentru teza de doctor în științe biologice "Dezvoltarea și multiplicarea microclonală a speciei *Lycium barbarum* L." a doctorandei Tabăra Maria (Grădina Botanică Națională), publicate în lucrările științifice „Studiul comparativ al conținutului polifenolic în frunzele și fructele sp. *Lycium barbarum* L. spontan și cultivat”, Chișinău, 2017; „Total content of carotenoids in different vegetable products of spontaneous and cultivated sp. *Lycium barbarum* from the Republic of Moldova”, Chișinău 2017; „Studiul flavonozidelor și taninurilor la specia *Lycium barbarum* spontan și cultivat”, Chișinău 2017; „Structura anatomică a lamei frunzei speciei spontane *Lycium barbarum* L. și a soiurilor”, Chișinău 2020, sunt implementate în procesul didactic la disciplinele "Botanică farmaceutică", "Ecologie și plante medicinale" pentru studenții anului I și în ciclul de lecții pentru educația continuă a farmaciștilor "Actualități în domeniul plantelor medicinale și a fitopreparatelor" la Facultatea de Farmacie, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie "Nicolae Testemițanu" din Republica Moldova.

Decanul Facultății de Farmacie  
Dr. în șt. farm. conf. univ.



Nicolae CIOBANU

Șeful catedrei de farmacognozie și  
Botanică Farmaceutică  
Dr. hab. în șt. biol., prof. univ.

Tatiana CALALB





„11” unit 2020

Nr. 239

#### ACT DE IMPLEMENTARE

Prin prezenta se confirmă, că rezultatele științifice obținute de dna **Tabăra Maria** publicate în lucrările științifice: „Aspecte în studiul indicilor de calitate a fructelor goji”, Cahul, 2016; „The creation application of a goji collection in the Botanical garden (I) ASM”, Chișinău, 2017; „Înmulțirea *in vitro* a unor noi specii de arbuști fructiferi de interes economic pentru R. Moldova”, Bălți 2016; „Aspects of the *in vitro* organogenesis of the species *Lycium barbarum* L. (goji)”, Chișinău 2017; „Structura anatomică a laminei frunzei speciei spontane *Lycium barbarum* L. și a soiurilor”, Chișinău 2020, sunt aplicate în procesul didactic al Facultății Biologie și Chimie a Universității de Stat din Tiraspol la cursurile de *Botanică aplicată*, *Fiziologia vegetală*, *Chimie biologică* și *Morfologie și anatomie a plantelor*.

Decanul facultății Biologie și chimie,  
dr., conf. univ.



N. ALUCHI

## **DECLARAȚIA PRIVIND ASUMAREA RĂSPUNDERII**

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

**Tabăra Maria**

**Semnătura**

**Data**

## CURRICULUM VITAE

**TABĂRA (GORCEAG) Maria**

### Informații personale

📍 s.Șișcani, r-nul Nisporeni, MD6437, Republica Moldova

☎ + 373 69815766

✉ [maricica.gorceag@yahoo.com](mailto:maricica.gorceag@yahoo.com)

Data nașterii: 26 martie 1990



### Studii superioare:

- 2016-2019 – *studii de doctorat*, Universitatea Academiei de Științe a Moldovei (actualmente Universitatea de Stat „Dimitrie Cantemir”, USDC), specialitatea 164.01. – Botanica.
- 2012-2014 – *studii de masterat*, Universitatea Academiei de Științe a Moldovei (actualmente Universitatea de Stat „Dimitrie Cantemir”, USDC), specialitatea 421 – Biologie moleculară. Diplomă de Master în Științe ale Naturii.
- 2009-2012 – *studii de licență*, Universitatea Academiei de Științe a Moldovei (actualmente Universitatea de Stat „Dimitrie Cantemir”, USDC), specialitatea 421. Diplomă de Licență în Științe ale Naturii.

### Stagii: 2015

- 20-21 aprilie – Training: „Scrierea proiectelor internaționale”. Universitatea AȘM în colaborare cu Centrul Proiecte Internaționale al AȘM, Chișinău, Republica Moldova. *Certificate de participare*, 2 credite

### 2014

- 16-20 iunie – Curs de formare continuă: „Metode de determinare a activității antioxidante”, Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al AȘM, Laboratorului de Ficobiotehnologie, Chișinău, Republica Moldova. *Certificate de participare*.

### 2013

- 15-22 iulie – Școala de vară: „Genetica Moleculară”, Karolinska Institut, Suedia – UnAȘM, Chișinău, Republica Moldova. *Certificate of excellence in genetic engineering and molecular genetics*, 5 ECTS.
- 17-20 septembrie – Training: „Tehnici de analiză moleculară”, Laboratorul Genomică, Centrul universitar de Biologie Moleculară, UnAȘM, Chișinău, Moldova. *Certificate de participare*, 15 credite.

### Domeniile de interes științific:

Biologie și botanică, biotehnologie, biochimie.

### Activitatea profesională:

- noiembrie 2014-prezent – *cercetător științific*, Laboratorul Embriologie și Biotehnologie, Grădina Botanică (Institut) ”Alexandru Ciubotaru”.
- 02.09.2012-31.05.2014 – *cercetător științific stagiar*, Laboratorul Proteomică, Centrul Universitar Biologie Moleculară, UnAȘM (actualmente Centrul universitar Genetică Funcțională, CGF, USDC).

### Participări în proiecte științifice naționale și internaționale:

– *Proiecte instituționale:*

20.80009.7007.19 „Introducerea și elaborarea tehnologiilor de cultivare convenționale și microclonale a speciilor de plante lemnoase noi”. Termen de realizare: 2020-2023.

15.817.02.26A „Fundamentarea științifică privind elaborarea tehnologiilor de înmulțirea *in vitro* a speciilor valoroase de interes economic pentru Republica Moldova”. Termen de realizare: 2015-2019.

11.817.04.19F „Aspecte funcționale și genético-moleculare ale genomului la floarea-soarelui (*Helianthus annuus* L.)”. Termen de realizare: 2011 – 2014.

– *Proiecte internaționale:*

13.820.15.10 GA – Utilizarea Microscopului Holografic Digital pentru Studiul Țesuturilor Biologice utilizând LabVIEW, proiect bilateral Moldova-Germania. Termen de realizare: 2013-2014.

– *Proiecte pentru tineri cercetători:*

16.819.02.05A Conservarea plantelor rare în cultura *in vitro* Termen de realizare: 2016-2017

## Participări la foruri științifice (naționale și internaționale):

### 2019

- Simpozionul științific internațional „Biotehnoiogii avansate – realizări și perspective”. Ediția a V-a 21-22 octombrie 2019 Chișinău. *Raport oral, teză. Certificat de participare.*
- Conferința Științifică Națională cu Participare Internațională „Știința și inovarea în nordul Republicii Moldova: probleme, realizări, perspective” (ediția a treia) Bălți. *Articol.*
- The National Conference with International Participation "Dimitrie Cantemir" State University Chisinau, Republic of Moldova., october 21-22, 2019. *Articol.*

### 2018

- Simpozionului Științific Internațional “Agricultura modernă – realizări și perspective”, dedicat aniversării 85 ani de la fondarea UASM, 04-06 octombrie 2018. *Articol.*
- Conferința Științifică a Doctoranzilor „Tendințe contemporane ale dezvoltării științei: viziuni ale tinerilor cercetători”, ediția a VII-a La 15 iunie 2018. *Articol.*
- Conference: Annual Meeting Society of Plant Physiologists of Russia Mechanisms of resistance of plants and microorganisms to unfavorable environmental Book of Proceedings (in two parts) of the All-Russian Scientific Conference with International Participation and Schools of Young Scientists (Irkutsk, July 10–15, 2018. *Articol.*

### 2017

- Conferința Științifică a Doctoranzilor „Tendințe contemporane ale dezvoltării științei: viziuni ale tinerilor cercetători” Ediția a VI-a, 2017 *Articol.*
- International Scientific Symposium “Conservation of Plant Diversity”, Botanical Garden of ASM, 5th edition, 2017. *Teză.*
- Congresul asociației studenților farmaciști din Republica Moldova, consacrat anului Nicolae Testemițeanu „Inovarea și creativitatea în practica și cercetarea farmaceutică” Revista Farmaceutică a Moldovei nr.12, 2017. *Teză.*

### 2016

- Conferința Științifică Internațională Perspectivele și Problemele Integrării în Spațiul European al Cercetării și Educației Volumul I, Cahul, 7 Iunie 2016. *Articol.*
- Conferința națională cu participare internațională „Știința în Nordul Republicii Moldova: realizări, probleme și perspective”, ed. 2, Bălți 29-30 septembrie 2016. *Articol.*
- Conferinței Științifice Internaționale a Doctoranzilor „Tendințe contemporane ale dezvoltării științei: viziuni ale tinerilor cercetători”, Ediția a V-a, Chișinău, 2016, pag. 189 – 192.
- ”Life sciences in the dialogue of generations: Connections between universities academia and business community” Chisinau; 2016. *Teză.*
- Biotehnoiogii avansate – realizări și perspective, al IV-lea Simpozion național cu participare internațională, Chișinău, Republica Moldova, 3-4 octombrie 2016. *Teză, raport oral.*
- Simpozion dedicat aniversării a 200 de ani de la nașterea profesorului Anastasie Fătu și împlinirii a 160 de ani de la fondarea primei grădini botanice din Principatele Române. Simpozion științific - Conservarea diversității plantelor *in situ* și *ex situ*. Iași, 22 – 25 septembrie 2016, *Teză.*

### 2015

- The Xth International Congress of Geneticists and Breeders, Chisinau, Republic of Moldova, 28 June – 1 July 2015. *Poster, teză. Certificat de participare.*
- International Scintific Symposium Conservation of Plant Diversity, Chisinau, Republic of Moldova, 28 -30 september, 2015. *Teză, poster. Certificat de participare.*

### Lucrări științifice și științifico-metodice publicate:

30 lucrări științifice (inclusiv 10 publicații de monoautor): 6 articole științifice, 14 comunicări la foruri internaționale și naționale.

### Premii, mențiuni, distincții, titluri onorifice etc.

2017 – Bursa nominal "Boris Matienko" pentru doctoranzi.

### Cunoașterea limbilor:

limba română – limba maternă, limba rusă – bine, limba engleză, limba franceză – mediu.

**Date de contact de serviciu:** Laboratorul Embriologie și Biotehnoiogie, Grădina Botanică Națională (Institut "Alexandru Ciubotaru". Adresa: str. Padurii, 18, MD-2002, Chisinau, Republica Moldova, tel.: +373 22-523481.