

Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară a Banatului
“Regele Mihai I al României” din Timișoara



Facultatea de Horticultură și Silvicultură

Ing. ROMA M. GHEORGHE

TEZĂ DE DOCTORAT

**EVALUAREA DIVERSITĂȚII ȘI INTERACȚIUNII GENOTIP X
MEDIU PENTRU DIFERITE POPULAȚII DE AFIN (*Vaccinium
myrtillus* L.) DIN JUDEȚUL CARAȘ SEVERIN**

Conducător Științific

Prof.univ.dr. SORIN CIULCA

Timișoara

2021

INTRODUCERE

Afinele sunt foarte cunoscute și apreciate atât pentru valoarea lor alimentară cât și pentru cea terapeutică. Având în vedere aceste caracteristici, afinele sunt foarte apreciate și căutate pe plan mondial, reprezentând totodată o sursă importantă pentru susținerea dezvoltării rurale în zonele premontane și montane din România. Importanța economică a afinelor este reliefată de un studiu din peninsula Scandinavă conform căruia într-un singur an în această zonă s-au recoltat peste 100 mii tone cu o valoare estimată la 115 milioane euro.

Fiind o specie sălbatică, este dificil de estimat suprafețele ocupate de acesta și producțiile potențiale. Totuși în urma unui studiu din 2007, s-a stabilit că afinele sunt printre primele zece produse sălbatice colectate pe plan mondial cu o cantitate anuală de aproximativ 6045 mii t de pe 13 milioane hectare. Cele mai mari producătoare și exportatoare în acest sens fiind, Rusia, România și Bulgaria.

Afinele se consumă ca fructe întregi proaspete, congelate sau uscate, precum și sub formă de conserve, gemuri, sucuri, sau ca suplimente alimentare sub formă de concentrate lichide sau pulbere.

Afinele sunt incluse între fructele cu cea mai mare capacitate antioxidantă. Acestea sunt foarte bogate în antioxidanți, diferite vitamine (C, complexul B, E, A), minerale precum: cupru seleniu; zinc; care contribuie la creșterea imunității și prevenirea apariției infecțiilor. Conținutul de minerale din afin este superior față de cel din fructele de cultură. În scop terapeutic sunt utilizate atât fructele cât și frunzele, care au și efect hipoglicemiant fiind considerate o sursă de insulină vegetală. Conținutul ridicat în fibre și antioxidanți puternici, precum și abilitatea afinelor de a dizolva colesterolul rău, fac din acestea să fie considerate un supliment alimentar eficient pentru vindecarea afecțiunilor cardiace.

Frunzele de afin manifestă de asemenea efecte antibacteriene și antioxidante și sunt folosite sub formă de ceaiuri. Potențialul antioxidant al frunzelor de afin este considerabil mai ridicat decât al fructelor conform testelor bazate pe reducerea ionului ferric/putere antioxidantă (FRAP) și capacitatea antioxidantă echivalentă cu Trolox (TEAC). De asemenea, unele studii au demonstrat că conținutul de polifenoli din frunze și tulpini este mai ridicat decât în fructe.

În ceea ce privește beneficiile afinelor pentru sănătate, pe lângă cunoscutele proprietăți antioxidante ale antocianilor, acestea mai au efecte importante în semnalizarea celulară, repararea ADN-ului, adeziunea celulară, precum și efectele antineoplazice și antimicrobiene. Acești compuși fenolici naturali sunt antioxidanți redox-activi, precum și chelatori de fier.

Efectele benefice asupra sănătății se datorează conținutului ridicat de fenoli și în special antociani care manifestă activitatea antioxidantă, proprietăți antimicrobiene, antiinflamatoare, antialergice precum și potențial anticancerigen. De asemenea, antocianii au și efecte benefice asupra vederii și reducerea hipertensiunii. Acești compuși fenolici sunt asociați cu caracteristicile organoleptice plăcute ale afinelor care sunt foarte apreciate de consumatori.

Producția de fructe la afin are o anumită ciclicitate cu un vârf de producție pe o perioadă de 2-5 ani. Această ipoteză sugerează că plantele acumulează resurse pe parcursul mai multor ani în vederea unei fructificări abundente într-un an. Astfel, chiar dacă producția de fructe și flori din anul precedent influențează randamentul anului curent, variația condițiilor climatice în anumite fenofaze are o influență majoră asupra producției de fructe.

Valorificarea afinelor pe piața internă sau la export este influențată în principal de fluctuațiile de producție de la un an la altul și predictibilitatea redusă a producțiilor potențiale. În vederea asigurării unor producții stabile în vederea valorificării acestora, este nevoie de elaborarea unor metode de cultură sau semicultură a afinului în zonele favorabile acestuia.

Profilul structurii biochimice a fructelor de afin este determinat în principal de baza genetică însă diferiți factori de mediu cum sunt: lumina, temperatura, substanțele nutritive din sol, umiditatea, bolile și alți factori de stres, provoacă variații cantitative și calitative ale principiilor activi. Aceste influențe ale condițiilor de mediu trebuie luate în considerare la fructele destinate pentru uz industrial și terapeutic. Productivitatea și compoziția chimică a fructelor de afin este puternic influențată și de altitudine. Astfel, pe măsura creșterii altitudinii se reduc creșterile anuale și producția, în timp ce se intensifică acumularea polifenolilor, antocianilor și a vitaminei C [212]. De asemenea, în zonele cu zile lungi de vară și variații mari între temperaturile diurne și nocturne, biosinteza antocianilor este mai intensă.

Datorită izolării, diferențierea genetică dintre populațiile dispersate este de câteva ori mai ridicată decât cea dintre populațiile situate într-un areal continuu, nefragmentat. Variația genetică intraspecifică este influențată de distanța dintre populații și barierele naturale. Aceste niveluri ridicate de diferențiere indică prezența unor

fragmente de fonduri genice separate în populațiile mici dispersate în zone izolate ale arealului. Aceste fonduri genice trebuie conservate și luate în considerare în vederea păstrării biodiversității.

Variații cantitative și calitative ale conținutului în fenoli au fost identificate atât la nivel intrapopulațional cât și la nivel interpopulațional, precum și la nivel individual în diferite fenofaze de vegetație și stadii de dezvoltare a plantelor. Genele care controlează compoziția chimică a plantelor pot fi activate prin stimuli ai mediului care determină reacții în cascadă ce se finalizează cu diferiți produși secundari [91]. În general, se pare că în fenofazele timpurii de dezvoltare afinul reacționează puternic la lumină care mărește expresia genelor implicate în acumularea de flavonoizi și carotenoizi și ulterior acumularea de metaboliți în fructe. Expunere de scurtă durată la anumite tipuri din spectru luminii în timpul primelor faze de dezvoltare a fructelor, influențează puternic profilul metaboliților secundari.

Diferențele la nivelul genelor polimorfice dintr-o populație sau între diferite populații de afin poate apărea ca rezultat al selecției sub acțiunea condițiilor de mediu [80]. Populațiile apropiate în spațiu polenizate de insecte pot avea alele comune, pe fondul unui număr mai redus de alele unice în fiecare populație, prezentând între ele o similaritate genetică mai ridicată. Chiar dacă variabilitatea din interiorul populațiilor este scăzută, evoluția sub efectul unor diferite condiții de mediu ar putea genera o variabilitate considerabilă între populații. Realizările recente din domeniul biologiei moleculare, permit utilizarea markerilor pentru estimarea diversității genetice la nivel intra- și inter-populațional. Fluxul de gene și recombinarea între diferite colne de afin este favorizată de distanțe de 5-10 m între acestea [139].

Sporirea diversității genetice ar permite creșterea nivelului de adaptare și obținerea de puiți care prezintă variabilitate în ceea ce privește reacția lor față de schimbările condițiilor de mediu. Nivelul ridicat al diversității genetice în populațiile de afin se datorează și apariției unor mutații sau hibridi interspecifici între *V. myrtillus* și *V. vitis-idaea*. Formele mutante de afin cu fructe de culoare deschisă au un conținut inferior în compuși fenolici comparativ cu formele cu fructe de culoare normală.

Pe fondul intensificării activităților antropice și mai ales a exploatărilor forestiere din zonele montane, arealele ocupate de această specie sunt afectate, astfel că studiul variabilității și diversității dintre și din interiorul acestor populații sunt necesare în vederea stabilirii celor mai eficiente metode de conservare a diferitelor populații de afin. Luând în considerare valoarea comercială și terapeutică a afinelor, sunt necesare studii care să stabilească atât nivelul substanțelor bioactive din fructelor cât și variația acestora sub efectul diferiților factori de mediu.

Alegerea acestei teme s-a bazat pe considerentul că populațiile de afin din Munții Banatului au fost puțin studiate sub aspectul variabilității caracterelor morfologice ale plantelor și fructelor respectiv al conținutului biochimic, s-au diversității genetice. În această regiune există suprafețe importante ocupate de afin, în zone greu accesibile și mai puțin poluate, astfel că fructele recoltate din aceste areale au o valoare alimentară și terapeutică importantă reprezentând totodată și o considerabilă sursă de venit pentru culegători din localitățile limitrofe.

Studiul s-a desfășurat în habitate naturale de afin din cinci locații diferite ale Munților Banatului: Muntele Mic, altitudine 1500 m; Râul Lung (lângă vârful Balosu-Zanoaga), altitudine 1300 m; Semenice, altitudine 1400 m; Sadova Noua, altitudine 750 m; Cuntu, altitudine 1400 m. În vederea estimării corespunzătoare a diversității interpopulaționale și a interacțiunii genotip x mediu s-a luat în studiu și o populație din Munții Apuseni, respectiv din zona Padiș de la o altitudine de 1300 m.

Cercetările aferente acestui studiu au avut în vedere două categorii de obiective. În prima categorie au fost realizate cercetări în vederea evaluării diversității unor populații de afin din județul Caraș Severin la nivel fenotipic, precum și analiza influenței interacțiunii genotip x mediu asupra diferitelor caractere ale plantelor și fructelor. Obiectivele asociate acestei direcții de cercetare au fost:

- determinarea variabilității caracterelor morfologice ale plantelor și fructelor;
- stabilirea efectelor interacțiunii genotip x mediu asupra caracterelor morfologice ale plantelor și fructelor;
- evaluarea diversității dintre populații pentru caracterelor morfologice ale plantelor și fructelor;
- determinarea variabilității însușirilor de calitate ale fructelor;
- stabilirea efectelor interacțiunii genotip x mediu asupra însușirilor de calitate ale fructelor;
- determinarea componentelor fenotipice și genotipice pentru caracterelor plantelor și fructelor

Cea de-a doua categorie de obiective a vizat analiza diversității genetice dintre populațiile de afin la nivel molecular prin intermediul unor diferite categorii de primeri, în vederea obținerii de informații despre distribuția spațială, dinamica și evoluția acestor populații respectiv conservarea biodiversității acestora. Obiectivele asociate acestei direcții de cercetare au fost:

- evaluarea diversității interpopulaționale prin intermediul primerilor ISSR, ScoT și DAMD;
- determinarea capacității polimorfice individuale a diferiților primeri;
- stabilirea eficienței utilizării diferitelor categorii de markeri în evaluarea diversității la afin.

Teza de doctorat este structurată pe trei capitole. În primul capitol sunt centralizate informații din literatura de specialitate referitoare la importanța și valoarea terapeutică, respectiv particularitățile biologice și ecologice ale afinului. De asemenea este analizată și posibilitatea ameliorării afinului având în vedere diversitatea genetică și structura clonală a acestei specii.

În capitolul al doilea sunt prezentate rezultatele privind variabilitatea unor caractere la afin sub efectul interacțiunii genotip x mediu. În acest sens, s-a realizat caracterizarea fenotipică a celor șase populații de afin atât din punct de vedere al caracterelor morfologice ale plantelor și fructelor cât și în ceea ce privește efectul interacțiunii genotip x mediu asupra manifestării acestor caractere. Populațiile de afin au fost analizate comparativ și în ceea ce privește anumite însușiri de calitate morfologică și biochimică a fructelor pe fondul condițiilor climatice din perioada studiului.

În capitolul al treilea sunt consemnate informații privind diversitatea genetică dintre populațiile de afin prin intermediul markerilor moleculari. În acest sens s-au evaluat rezultatele analizelor moleculare pe baza unor primeri ISSR, ScoT și DAMD, obținându-se informații referitoare la nivelul polimorfismului, structurii alelice, diversității interpopulaționale și eficienței utilizării diferitelor categorii de markeri pentru studii genetice la afin. La finalul fiecăruia dintre cele două capitole de rezultate sunt prezentate concluziile asociate, care evidențiază valoarea informațiilor obținute.

Pe plan internațional există numeroase studii referitoare la variabilitatea unor caractere morfologice și de calitate ale fructelor de afin, respectiv posibilitatea utilizării acestora în scop terapeutic. În România s-au efectuat studii mai ales în ceea ce privește conținutul biochimic al fructelor în diferiți principii activi, izolat pentru populații din anumite zone. Ca atare, studiul de față este de actualitate și se încadrează în aceste preocupări, aducând completări în direcția evaluării comparative a mai multor populații și stabilirea diversității dintre acestea atât la nivel fenotipic cât și molecular.

Noutatea datelor și informațiilor obținute este dată de faptul că până acum nu au mai fost efectuate studii asupra populațiilor de afin din Munții Banatului, referitoare la variabilitatea caracterelor morfologice ale plantelor și fructelor sub efectul interacțiunii genotip x mediu. De asemenea, evaluarea fenotipică a celor șase populații de afin a fost completată cu analiza diversității genetice dintre acestea la nivel molecular prin intermediul unor diferite categorii de primeri. Realizarea acestui studiu a presupus utilizarea unei metodologii complexe de cercetare necesară atât pentru efectuarea măsurătorilor morfologice sau efectuarea analizelor biochimice de calitate a fructelor și analizelor moleculare, cât și pentru prelucrarea statistică a datelor prin metode statistică descriptivă și analitică.

CONSIDERAȚII GENERALE PRIVIND PARTICULARITĂȚILE BIOLOGICE ȘI ECOLOGICE ALE AFINULUI

Din punct de vedere botanic afinul face parte din Familia *Ericaceae*, Genul *Vaccinium*, unde alături de specia existentă în flora spontană din România există numeroase alte specii. Numărul de bază de cromozomi este $x = 7$, însă multe specii sunt poliploide ($4x$, $6x$).

Afinul este un arbust peren de talie mica (40-50 cm.), cu înrădăcinare trasantă, rizomatoasă, alcătuită din o rețea de fire lungi, puternic întrețesute, de pe care drăjonează abundent. Tufa este foarte ramificată, cu lăstari subțiri (uneori târători) care provin din rizom, de culoare verde, deși, geniculați, muchiați, glabri. Frunzele sunt caduce, scurt-pețiolate, de 1-3 cm, distribuite uniform de-a lungul tulpinii, mici, ovale sau triunghiulare, fin serate, de culoare verde deschis. Studiile efectuate au scos în evidență faptul că pe solurile acide, și bogate în humus cu un conținut ridicat în materie organică și cu un pH optim de 5-5.5 afinul de munte găsește condiții prielnice de creștere, de dezvoltare și de rodire.

Condițiile de mediu, precum clima, tipul de sol, altitudinea, fertilitatea solului, accesul la lumină sunt factori importanți care influențează creșterea, producția și calitatea fructelor la afin. Rezistă în timpul iernii la temperaturi de -25°C . În ceea ce privește apa afinul se comportă bine în zonele cu precipitații medii anuale între 800-1000 mm. Afinul preferă versanți cu expoziție sudică, dar suportă bine și semiumbra.

Performanțele de producție ale afinului sunt influențate de vârsta și gradul de acoperire al arboretului. Tăierile rase, reduc creșterile vegetative, creșterile anuale, supraviețuirea lăstarilor și acoperirea solului. Tăierile

selective, determină o reducere a gradului de acoperire a solului comparativ cu varianta fără tăieri, însă creșterea și supraviețuirea lăstarilor sunt semnificativ superioare față de tăierile severe.

Fazele fenologice la afin sunt influențate în principal de fotoperioadă și temperatură. Condițiile de zi lungă și creșterea temperaturii induc dezvoltarea vegetativă după perioada de iarnă, ulterior la începutul verii când creșterea lăstarilor încetează, în condiții de zi lungă începe inducția florală

În absența stratului protector de zăpadă plantele de afin sunt vulnerabile la temperaturile scăzute din timpul iernii care le pot cauza daune majore sau chiar totale [192]. La plantele care ierneză fără strat de zăpadă se observă o întârziere a activării metabolismului primăvara, asociat cu o reducere a numărului de flori și producției de fructe. Temperaturile ridicate din timpul verii au un impact negativ asupra intensității înfloritului din anul viitor, printr-o inducere redusă a dormansului mugurilor floriferi.

Nivelul ridicat al radiației ultraviolete la altitudinile mari se consideră că determină o creștere a sintezei antocianilor în fructele de afin. Capacitatea antioxidantă la organele fotosintetic active, crește odată cu nivelul radiației solare. Afinul este adaptat pentru diferite condiții de umiditate a solului, astfel repartizează resursele nutritive spre creșterea vegetativă în cazul solurilor cu umiditate scăzută și spre înflorire și fructificare în condițiile unei umidități corespunzătoare în sol.

Absorbția nutrienților din sol de către plantele de afin este facilitată de simbioza cu micorizele ericoide, astfel că gradul de micorizare a rădăcinilor reprezintă un factor esențial al dezvoltării afinului în condițiile unor soluri cu fertilitate scăzută. Micorizarea rădăcinilor este intensă la cele nou formate vara târziu și toamna, se reduce pe iarna și ulterior crește gradual până în vara viitoare. Absorbția substanțelor nutritive din sol este dependentă și de pH-ul solului influențat la rândul său de specia dominantă din arboret.

Dezvoltarea și extinderea plantelor de afin depinde de vârsta și structura arboretului. Astfel, se consideră că în condițiile unei densități respectiv o arie bazală de aproximativ 30m²/ha asigură condiții optime pentru creșterea și dezvoltarea afinului. Dacă arboretul are o vârstă sub 80 ani sau este dominat de molid sau specii foioase densitatea optimă se reduce la aproximativ 20 m²/ha, în timp ce în arboretele unde sunt dominante specii de pin, o arie bazală de până la 40m²/ha ar fi benefică pentru asigurarea unei abundențe corespunzătoare a afinului. Foioasele au un efect negativ asupra dezvoltării și extinderii plantelor de afin, datorită faptului că limitează cantitatea de lumină care pătrunde prin coronament și ajunge la nivelul plantelor de afin.

Afinul se poate înmulți atât vegetativ cât și prin semințe, însă în natură cel mai frecvent se înmulțește vegetativ. Rizomul are o dezvoltare centrifugala, care poate fi afectată de neuniformitatea solului și rădăcinile arborilor. Afinul, prin intermediul înmulțirii vegetative are tendința de a forma pâlcuri de până la 15 m diametru. De regulă rizomii cresc în sol 20-30 cm, după care se ramifică în doi sau mai mulți rizomi, din cel puțin unul se dezvoltă ulterior un lăstar. Un rizom se poate întinde până la 5 m, deși distanța dintre lăstari rareori depășește 90 cm. Colonizarea are loc în jurul fiecărui pâlc și determină o creștere a densității plantelor, respectiv atât a părții aeriene cât și a celei subterane.

Sporirea diversității genetice ar permite creșterea nivelului de adaptare și obținerea de puiți care prezintă variabilitate în ceea ce privește reacția lor față de schimbările condițiilor de mediu. Nivelul ridicat al diversității genetice în populațiile se datorează și apariției unor mutații sau hibridi interspecifici între *V. myrtillus* și *V. vitis-idaea*. Formele mutante de afin cu fructe de culoare deschisă au un conținut inferior în compuși fenolici comparativ cu formele cu fructe de culoare normală

Producțiile obținute depind în principal de condițiile pedo-climatice, fiind raportate niveluri foarte diferite ale randamentelor obținute, de la o zonă la alta și de la o țară la alta. Clonele de afin cu înflorire timpurie sunt puternic expuse daunelor provocate de îngheț. Ulterior planta își reface partea vegetativă prin emiterea de noi lăstari, totuși producția de flori și fructe nu se reface, având nevoie de peste un an pentru a atinge intensitatea înfloritului dinaintea daunelor provocate de îngheț. Astfel, se consideră că lipsa producției sau producțiile reduse din anumiți ani se datorează și daunelor înghețului

Un posibil mecanism de bază care să explice variațiile anuale ridicate ale producției la afin ar consta într-un compromis dintre reproducere și apărare chimică a plantelor, adică elementele de protecție a plantelor sunt realocate și utilizate pentru producția de boabe din timpul verii. Vârfuri de înflorire abundentă, care apar de obicei la intervale regulate și sunt sincronizate pe suprafețe mari indicând faptul că înflorirea este declanșată de unii factori de mediu la scară largă care acționează în timpul fenofazelor critice pe parcursul perioadei de vegetație. Fazele critice sunt considerate perioadele de inițiere și dezvoltare florală, când mediul poate acționa ca un factor de control asupra acestora, influențând considerabil nivelul producției.

CONTRIBUȚII PRIVIND VARIABILITATEA UNOR CARACTERE LA AFIN SUB EFECTUL INTERACȚIUNII GENOTIP X MEDIU

Populația a manifestat cea mai ridicată influență (77,07 %) asupra variabilității taliei plantelor de afin, fiind urmată de interacțiunea ani x populații (14,79 %), pe fondul unei influențe mai reduse a condițiilor climatice din perioada studiului (8,14 %). Contribuția ridicată a genotipului asupra variației taliei plantelor, indică existența unor diferențe majore între populațiile de afin pentru acest caracter.

În cazul diametrului tulpinii, contribuțiile celor trei surse de variație au fost mai echilibrate, astfel că variabilitatea acestui caracter a fost influențată într-o măsură mai ridicată de genotip (43,49 %) în timp ce efectul condițiilor climatice din cei trei ani (27,19 %) și interacțiunea genotip x an (23,12 %) au avut influențe mai reduse.

Manifestarea fenotipică a numărului de lăstari/plantă a fost influențată preponderent de către genotip și interacțiunea genotip x an. Ca atare, componenta interacțiunii ani x populații a avut o contribuție semnificativ superioară de 67,67 % asupra capacității de lăstărire, în timp ce efectul individual al populației a fost de 27,11 %, iar efectul condițiilor climatice considerabil mai redus (5,22 %).

Populațiile Semenice și Muntele Mic prezintă o stabilitate mai redusă a înălțimii plantelor asociată cu valori inferioare mediei, care atestă faptul că acestea manifestă o adaptabilitate redusă față de condițiile de mediu din perioada 2018-2020. În cazul populației Cuntu, stabilitatea superioară mediei este asociată cu valori reduse ale taliei plantelor, indicând o adaptare specifică a acesteia față de condiții de mediu nefavorabile. Populația Râul Lung, realizează valori ridicate ale înălțimii plantelor asociate cu o stabilitate inferioară mediei, fiind specific adaptată pentru condiții favorabile de mediu. Populația Padiș a manifestat o reacție distinctă față de variația condițiilor de mediu din perioada studiului, realizând o talie superioară mediei în condițiile nefavorabile din 2020 și valori inferioare mediei în perioada 2018-2019.

Populațiile Raul Lung și Sadova Nouă manifestă o stabilitate medie a diametrului tulpinii asociată și cu valori superioare mediei generale a experienței, prezentând o adaptare bună la condițiile celor trei ani. Populația Cuntu prezintă o instabilitate ridicată a diametrului tulpinii, fiind specific adaptată la condiții favorabile de mediu. Populațiile Muntele Mic și Semenice prezintă o stabilitate peste medie și adaptabilitate la factorii de mediu mai puțin favorabili pentru diametrul tulpinii. Populația Padiș prezintă o stabilitate de tip static ridicată asociată cu valori ale diametrului tulpinii superioare mediei experienței.

În cazul populațiilor Muntele Mic, Sadova Nouă și Semenice se constată o stabilitate mijlocie a numărului de lăstari/plantă asociată cu valori superioare mediei experienței, care atestă faptul că aceștia manifestă o adaptabilitate bună față de condițiile de mediu din perioada studiului. La populația Padiș stabilitatea redusă a capacității de lăstărire este asociată cu valori inferioare mediei, indicând o adaptare specifică a acesteia față de condiții de mediu mai puțin favorabile, cum au fost cele din 2020. Populația Râul Lung a realizat valori ridicate ale numărului de lăstari/plantă asociate cu o stabilitate inferioară mediei, fiind specific adaptată pentru condiții mai favorabile de mediu.

Cea mai mare variabilitate între populații pe perioada studiului s-a observat în cazul înălțimii plantelor, în timp ce pentru numărul lăstarilor s-au înregistrat cele mai reduse diferențe dintre populații. Valoarea ridicată a eritabilității pentru înălțimea plantelor asociată cu faptul că varianța genotipică a fost semnificativ superioară celei aferente interacțiunii genotip x mediu, sugerează că acest caracter are o bază genetică importantă care asigură păstrarea performanțelor. Având în vedere valorile eritabilității, se poate afirma că posibilitatea selecționării unor clone care să manifeste valori ridicate și constante ale capacității de lăstărire este mai redusă decât în cazul taliei plantelor și diametrului tulpinii.

Variabilitatea greutateii fructelor a fost influențată într-o măsură mai ridicată de genotip (67,44 %) în timp ce efectul condițiilor climatice din cei trei ani (6,88 %) și interacțiunea genotip x an (25,67 %) au avut influențe considerabil mai reduse. Componenta interacțiunii ani x populații a avut o contribuție semnificativă de 38,32 % asupra volumului fructelor, apropiată de efectul individual al populației (41,54 %), în timp ce efectul condițiilor climatice a fost mai redus (20,13 %).

Interacțiunea ani x populații a manifestat cea mai ridicată influență asupra variabilității conținutului de zahăr din fructe (49,28 %), fiind urmată de populație cu o contribuție de 37,66 %, pe fondul unei influențe mai reduse a condițiilor climatice din perioada studiului (13,06 %). Contribuția ridicată a genotipului asupra variației cantității de zahăr din fructe, indică existența unor diferențe majore între populațiile de afin. Variabilitatea acidității fructelor a fost influențată într-o măsură mai ridicată de interacțiunea ani x populații (53,12 %) în timp ce efectul populației a fost de 33,5 % iar al condițiilor climatice din cei trei ani (13,35 %) considerabil mai redus.

Interacțiunea ani x populații a manifestat cea mai ridicată influență asupra variabilității conținutului de polifenoli (58,59 %), fiind urmată de populație cu o contribuție de 34,39 %, pe fondul unei influențe mai reduse

a condițiilor climatice din perioada studiului (7,02 %). Variabilitatea activității antioxidante a fructelor a fost influențată într-o măsură mai ridicată de condițiilor climatice din cei trei ani (63,51 %) în timp ce efectul populației (14,58 %) și al interacțiunii ani x populații (21,90 %) au fost considerabil mai reduse.

Populațiile Semenice și Muntele Mic prezintă o stabilitate superioară mediei asociată cu valori reduse ale greutateii fructelor, indicând o adaptare specifică a acestora față de condiții de mediu nefavorabile. Populația Padiș, realizează valori ridicate ale masei fructelor asociate cu o stabilitate inferioară mediei, fiind specific adaptată pentru condiții favorabile de mediu. Populația Cuntu a prezentat un nivel redus al interacțiunii genotip x mediu, pe fondul unor valori inferioare mediei. În cazul populației Sadova Nouă stabilitatea superioară mediei a fost asociată cu valori ridicate și apropiate ale greutateii fructelor în perioada 2019-2020. Populația Râul Lung prezintă în general o stabilitate mediei pe fondul unei variații reduse a acestui caracter în perioada 2019-2020.

Populațiile Muntele Mic și Semenice prezintă o stabilitate mijlocie asociată cu valori ale conținutului de zahăr din fruct superioare mediei experienței, care atestă faptul că aceștia manifestă o adaptabilitate bună față de condițiile de mediu din perioada studiului. La populația Sadova Nouă stabilitatea redusă a conținutului de zahăr este asociată cu valori inferioare mediei, indicând o adaptare specifică a acesteia față de condiții de mediu mai puțin favorabile acumulării zahărului, cum au fost cele din 2018. Populațiile Muntele Mic și Semenice au realizat valori ridicate ale conținutului de zahăr din fructe asociate cu o stabilitate inferioară mediei, fiind specific adaptate pentru condiții mai favorabile de mediu precum cele din perioada 2019-2020. Acumularea zahărului la populația Cuntu a fost puternic influențată de interacțiunea genotip x mediu, pe fondul unor valori reduse pe perioada studiului. Pe fondul unei interacțiuni reduse cu condițiile de mediu, populația Râul Lung a prezentat o stabilitate ridicată a acestui caracter asociată cu valori superioare mediei.

Populațiile Muntele Mic și Sadova Nouă prezintă o stabilitate mijlocie a conținutului de polifenoli asociată cu valori inferioare mediei experienței, care atestă faptul că acestea manifestă o adaptabilitate față de condițiile de mediu din perioada studiului, paralelă cu reacția medie a celorlalte populații. La populația Râul Lung stabilitatea redusă este asociată cu o cantitate de polifenoli inferioară mediei, indicând o adaptare specifică a acesteia față de condiții de mediu mai puțin favorabile acumulării polifenolilor, cum au fost cele din anul 2020.

Populațiile Cuntu și Padiș au realizat valori ridicate ale conținutului de polifenoli din fructe asociate cu o stabilitate inferioară mediei, fiind specific adaptate pentru condiții mai favorabile de mediu precum cele din perioada 2018-2019. Acumularea de polifenoli la populația Semenice a fost puternic influențată de interacțiunea genotip x mediu, pe fondul unor valori considerabil mai reduse în perioada 2019-2020.

Populațiile Râul Lung și Padiș prezintă o stabilitate superioară mediei asociată cu valori ridicate ale activității antioxidante a fructelor, indicând o bună adaptare față de condiții de mediu din perioada studiului. Populațiile Sadova Nouă, Semenice și Muntele Mic, realizează valori mai reduse ale activității antioxidante asociate cu o stabilitate inferioară mediei, manifestând o interacțiune genotip x mediu paralelă cu favorabilitatea condițiilor climatice anuale. Populația Cuntu a prezentat în general o stabilitate medie pe fondul unei variații reduse a capacității de inhibiție în perioada 2018-2019.

Având în vedere valoarea ridicată a eritabilității, rezultă că la nivelul acestor populații există suficientă variabilitate genetică de tip aditiv care să asigure obținerea unor selecții clonale valoroase pentru masa fructelor. Valoarea mai redusă a eritabilității pentru conținutul de zahăr din fructe (34,58 %) asociată cu faptul că varianța genotipică a fost semnificativ inferioară celei aferente interacțiunii genotip x mediu, sugerează că acest caracter este controlat în principal de gene cu efect neaditiv;

Luând în considerare valoarea scăzută a eritabilității (20,79 %) pentru aciditatea fructelor, rezultă că la nivelul acestor populații variabilitate genetică este insuficientă în vederea obținerii unor selecții clonale valoroase pentru acest caracter. Având în vedere și valoarea eritabilității (56,50 %) și componentele varianței pentru indicele gluco-acidimetric, se poate afirma că în determinismul genetic al acestui caracter acționează și gene cu efect aditiv, însă posibilitatea selecționării unor clone valoroase este influențată și de condițiile de mediu;

Valoarea redusă a eritabilității (14,83 %) pentru conținutul de polifenoli asociată cu faptul că varianța genotipică a fost semnificativ inferioară celorlalte variante sugerează că acest caracter este controlat în principal de gene neaditive. În cazul activității antioxidante a fructelor, valoarea scăzută a eritabilității (24,89 %), indică faptul că la nivelul acestor populații variabilitate genetică este insuficientă pentru obținerea unor selecții clonale valoroase pentru această însușire.

La populația Semenice se constată o structură apropiată a recoltei în perioada 2018-2019, pe fondul unei creșteri a procentului fructelor mijlocii și o reducere a procentului de fructe mici în 2020. În cazul populației Cuntu scăderea progresivă a frecvenței fructelor mari în perioada studiului a fost asociată cu creșterea a procentului de fructe mijlocii și respectiv o reducere a procentului de fructe mici în 2020.

Structura recoltei la populația Sadova Nouă a prezentat o variație redusă în perioada 2018-2019, în timp ce în 2019-2020 s-a constatat o diminuare a frecvenței fructelor mijlocii și o sporire a frecvenței fructelor mici. În cazul populației Padiș, pe fondul unor procente mai reduse de fructe mari în perioada 2018-2019 și o structură apropiată a recoltei, se observă o ușoară creștere a procentului fructelor mari și o reducere a celor mijlocii în anul 2020.

În cazul populației Muntele Mic reducerea progresivă a procentului fructelor mari în perioada 2018-2020 a fost asociată cu o creștere proporțională a procentului fructelor mici. În cazul populației Râul Lung scăderea continuă a frecvenței fructelor mari a fost corelată cu o creștere a frecvenței fructelor mijlocii în 2019 și un procent mai mare de fructe mici în 2020.

CONTRIBUȚII PRIVIND DIVERSITATEA GENETICĂ DINTRE POPULAȚIILE DE AFIN EVALUATĂ PRIN INTERMEDIUL MARKERILOR MOLECULARI

Toți primerii ISSR utilizați în studiu au generat benzi polimorfice, rezultând o rată a polimorfismului de la 37,50 % pentru UBC864 până la 81,80 % pentru primerul UBC810. Fragmentele amplificate au avut dimensiuni cuprinse între 272 și 760 pb pentru primerul UBC882, în timp ce primerul UBC854 a înregistrat cea mai mare amplitudine a dimensiunii fragmentelor amplificate 287-1307 pb.

Diferența minimă între dimensiunea oricăror două benzi polimorfice generate de un primer a fost de 38 pb pentru UBC810 și UBC882, respectiv cea mai mare diferență de 346 pb la UBC864. Indicele de discriminare (PI), a înregistrat valori cuprinse între 1,167 pentru primerul UBC864 și 2,667 pentru UBC810, confirmând astfel faptul că dintre primerii ISSR, UBC810 a avut cea mai ridicată capacitate de a genera polimorfism la populațiile de afin.

Din punct de vedere al primerilor ISSR, cea mai ridicată diversitate interpopulațională s-a înregistrat pentru alelele primerului A21 în timp ce populațiile au prezentat cele mai multe alele comune pentru primerul UBC864. Între cele șase populații există o similaritate medie de aproximativ 66,20 % pentru alelele primerilor ISSR. Astfel, populația Semenice a manifestat o similaritate generală de 72,6 % față de celelalte populații, în timp ce populația Padiș a prezentat cea mai ridicată diversitate alelică medie (61 %).

Cele cinci populații de afin din județul Caraș Severin posedă aproximativ 82 % alele ISSR comune. Dintre acestea, populațiile Muntele Mic și Sadova Nouă sunt similare genetic în proporție de 87,23 % în timp ce între populațiile Cuntu și Semenice există o similaritate genetică de 86,36 %. Populația Râul Lung manifestă o diferențiere genetică de aproximativ 25 % față de celelalte populații din județul Caraș Severin. Populația Padiș manifestă o diversitate evidentă pentru alelele ISSR față de populațiile din județul Caraș Severin, cu valori de la 48,33 % față de populațiile Muntele Mic și Sadova Nouă, până la 65,22 % față de populația Râul Lung.

Primerii ScoT au generat un polimorfism cuprins între 16,70 la ScoT 11 și 78 % pentru ScoT 14 cu o medie de 53,57 %. Numărul de benzi/primer a avut valori de la 8 în cazul lui ScoT 14 până la 16 pentru ScoT 34 iar polimorfismul total/primer a prezentat valori cuprinse între 0,264 la ScoT 3 și 0,380 la ScoT 36. Benzile amplificate au avut amplitudini de la 80 la 711 pb pentru primerul ScoT 35, în timp ce primerul ScoT 11 a înregistrat cea mai mare distanțiere între benzi, respectiv 234-1358 pb. Primerii ScoT 35 și 36, au avut cea mai ridicată capacitate de a genera benzi polimorfice la populațiile analizate în timp ce primerul ScoT 11 a prezentat cea mai redusă eficiența în detectarea polimorfismului. Populațiile de afin au avut cele mai puține alele comune pentru primerul ScoT 11, în timp ce sub aspectul alelelor primerului ScoT 14 diversitatea interpopulațională a fost mai ridicată.

Similaritatea interpopulațională pentru alelele primerilor ScoT a avut valori cuprinse între 44,22 % pentru populația Padiș și 83,83 % pentru populațiile Semenice, Cuntu și Sadova Nouă, pe fondul unei diversități generale medii de 24,64 % între cele șase populații. Populația Padiș prezintă o diversitate medie de aproximativ 52 % față de restul populațiilor, cu limitele de la 50,68 % față de populația Semenice și până la 65,22 % față de populația Râul Lung. Populațiile Muntele Mic și Semenice posedă 97,1 % alele ScoT comune pe fondul unei diversități de aproximativ 5 % față de populațiile Sadova Nouă și Cuntu similare genetic între ele într-o măsură de 97,01 %. Populația Râul Lung manifestă o diversitate de aproximativ 15 % față de celelalte populații din Caraș Severin.

Rata polimorfismului primerilor DAMD a avut valori între 27,30 % în cazul primerului 33.6 și 69,23 % pentru primerul URP-2F, în timp ce puterea discriminatorie a primerilor a fost cuprinsă între 0,278 la primerul 33.6 și 0,370 la URP-1F, cu o medie de 0,331. Fragmentele DAMD amplificate au avut dimensiuni cuprinse între 225 și 750 pb pentru primerul 33.6, în timp ce primerul URP-6R a înregistrat cea mai mare amplitudine a dimensiunii benzilor de 316-1409 pb..

Conform indicelui de discriminare primerul URP-2F a avut cea mai ridicată capacitate (2,889) de a genera benzi polimorfice la populațiile de afin, în timp ce la primerul 33.6 potențialul (0,833) de detectare a polimorfismului a

fost considerabil mai redus. În ceea ce privește primerii DAMD, cea mai ridicată diversitate între populații s-a înregistrat pentru alelele URP-2F, în timp ce populațiile au prezentat cele mai multe alele comune pentru primerul 33.6.

Între cele șase populații de afin există o similaritate medie de aproximativ 78,60 % pentru alelele primerilor DAMD. Populația Semenice a manifestat o similaritate alelică de 85,90 % față de celelalte populații, în timp ce populația Padiș a prezentat o diversitate alelică medie de 48,45 %.

Populațiile Muntele Mic și Cuntu posedă alele comune pentru primerii DAMD pe fondul unei diversități de aproximativ 5 % față de populațiile Semenice și Sadova Nouă similare genetic. Populația Râul Lung se diferențiază într-o măsură de aproximativ 13 % față de celelalte populații din Caraș Severin. Populația Padiș prezintă o diversitate evidentă față de restul populațiilor, cu limitele de la 50,68 % față de populația Semenice până la 65,22 % față de populația Râul Lung.

Având în vedere analiza distribuției benzilor generate de cele trei categorii de primeri care indică valori ridicate pentru primerii ISSR sub aspectul diferințelor parametri estimativi ai polimorfismului, se constată că aceștia au manifestat o eficiență superioară în detectarea polimorfismului la afin, în timp ce la primerii DAMD a fost cea mai redusă. Eficiența superioară a primerilor ISSR se datorează abundenței microsateleților în procesul de migrare și replicarea a ADN-ului.

Luând în considerare toate alelele celor trei tipuri de primeri se constată că populația Padiș prezintă o diversitate medie de 53,04 % față de populațiile din județul Caraș Severin, confirmându-se astfel faptul că această populație are o structură genetică aparte. Populația Râul Lung posedă un fond de gene diferențiat într-o măsură de circa 16 % față de restul populațiilor din Caraș Severin între există o similaritate medie de 93 %.

CONTRIBUȚIILE PROPRII ALE AUTORULUI

Cercetările efectuate au permis obținerea unor rezultate valoroase atât sub aspectul variabilității caracterelor morfologice ale plantelor și fructelor la populațiile de afin sub efectul interacțiunii genotip x mediu cât și în ceea ce privește diversitatea dintre populații la nivel fenotipic și molecular.

Populația Râul Lung a prezentat plantele cele mai viguroase, cu o capacitate de lăstărire superioară mediei și fructele cele mai mari. La populația Padiș dimensiunile ridicate ale fructelor au fost asociate cu o înălțimea a plantelor inferioară mediei și o capacitate redusă de lăstărire, în timp ce fructele de dimensiuni mari la populația Sadova Nouă au fost recoltate de la plante cu talie înaltă și capacitate medie de lăstărire.

Capacitatea ridicată de lăstărire la populația Semenice a fost asociată cu o vigoare redusă a plantelor și dimensiuni ale fructelor inferioare mediei. De asemenea și la populația Muntele Mic valorile reduse ale volumului și greutateii fructelor au fost asociate cu o structură morfologică a plantelor asemănătoare pe fondul unei capacități de lăstărire mai reduse. Populația Cuntu a prezentat o arhitectură diferită a plantelor, caracterizată printr-o vigoare redusă și o capacitate de lăstărire scăzută, corelată cu dimensiunile cele mai reduse ale fructelor.

Populațiile Padiș și Râul Lung prezintă cele mai ridicate valori pentru dimensiunile fructelor și activitatea antioxidantă, asociate și cu un conținut ridicat de polifenoli (mai ales la populația Padiș), respectiv valori medii ale acidității fructelor și un conținut de zahăr superior mediei. La populațiile Semenice și Muntele Mic s-au înregistrat cele mai ridicate valori ale conținutului de zahăr și indicelui gluco-acidimetric, pe fondul unor dimensiuni reduse ale fructelor, activitate antioxidantă scăzută și conținut redus de polifenoli.

Fructele populației Sadova Nouă au avut dimensiuni superioare mediei, cu un conținut scăzut de zahăr și polifenoli, respectiv o activitate antioxidantă redusă. În cazul populației Cuntu fructele de dimensiuni reduse au fost caracterizate printr-un conținut scăzut de zahăr, aciditate ridicată a fructelor, conținut superior de polifenoli și o activitate antioxidantă scăzută. Populația Padiș care are origine ecologică distinctă prezintă o diversitate genetică ridicată de 53,04 % față de populațiile de afin din județul Caraș Severin, confirmându-se astfel faptul că această populație are o structură genetică aparte. Populația Râul Lung posedă un fond de gene diferențiat într-o măsură de aproximativ 16 % față de celelalte populații din Caraș Severin între există o similaritate medie de 93 %.

Pentru a asigura o calitate superioară a fructelor de afin atât din punct de vedere alimentar dar și sub aspect terapeutic se recomandă colectarea acestora din spații deschise unde plantele beneficiază din plin de lumină și condiții corespunzătoare de sol.

Primerii ISSR au manifestat o eficiență superioară în detectarea polimorfismului dintre populațiile de afin comparativ cu primerii ScoT și DAMD. Informațiile obținute în urma acestui studiu pot fi utilizate în stabilirea strategiilor de conservare a acestor populații de afin, în situația când arealul acestora va fi periclitat de anumiți factori de mediu sau activități antropice.