

**ACADEMIA DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI
INSTITUTUL DE GENETICĂ, FIZIOLOGIE ȘI PROTECȚIE A
PLANTELOR**

**Cu titlu de manuscris
C.Z.U.: 653.743:631.526 (478)**

MARTEA RODICA

**VARIABILITATEA GENETICO - MOLECULARĂ
LA GENOTIPURILE DE *SALVIA SCLAREA* L.**

162.01. GENETICĂ VEGETALĂ

Autoreferatul tezei de doctor în științe biologice

CHIȘINĂU, 2016

Teza a fost elaborată în Institutul de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor al AȘM și
Centrul universitar de Genetică Funcțională al UnAȘM

Conducător științific:

DUCA Maria, doctor habilitat în științe biologice, profesor universitar, academician

Referenți oficiali:

PALII Andrei, doctor habilitat în științe biologice, profesor universitar, membru corespondent
al Academiei de Științe a Moldovei

ANDRONIC Larisa, doctor în științe biologice, conferențiar cercetător

Componența Consiliului științific specializat:

MICU Vasile – *președinte*, doctor habilitat în științe biologice, profesor universitar, academician

COTENCO Eugenia – *secretar*, doctor în științe biologice, conferențiar cercetător

LUPAȘCU Galina, doctor habilitat în științe biologice, profesor cercetător

GONCEARIUC Maria, doctor habilitat în științe agricole, conferențiar cercetător

ZGARDAN Dan, doctor în științe biologice, conferențiar universitar

Susținerea va avea loc la **8 decembrie 2016, ora 14⁰⁰** în ședința Consiliului științific specializat
D 10.162.01-04 din cadrul Institutului de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor al AȘM:
str. Pădurii 20, mun. Chișinău MD 2002, Republica Moldova, tel.: (+373) 22 77-04-47, fax:
(+373) 22 55-61-80, e-mail: igfp_asm@yahoo.com

Teza de doctor și autoreferatul pot fi consultate la Biblioteca Științifică Centrală „A. Lupan”
(Institut) a Academiei de Științe a Moldovei (str. Academiei 5a, mun. Chișinău MD 2028,
Republica Moldova) și pe pagina web a CNAA (www.cnaa.md)

Autoreferatul a fost expediat la „___” **noiembrie 2016**

Secretar științific al Consiliului științific specializat,
COTENCO Eugenia, dr. șt. biol., conf. cerc.

Conducător științific,

DUCA Maria, acad., dr. hab. șt. biol., prof. univ.

Autor

MARTEA Rodica



© MARTEA Rodica, 2016

REPERE CONCEPTUALE ALE CERCETĂRII

Actualitatea temei. Plantele medicinale se folosesc în scopuri curative încă de la apariția civilizației umane. Până în prezent, acestea rămân a fi sursa principală de compuși chimici utilizați în medicină ca resurse terapeutice primare. În ultimii ani, pe piața mondială de consum s-a semnalat o creștere semnificativă a cererii de plante medicinale și aromatice (PMA) determinată de conținutul sporit în substanțe biologice active întrebuințate pe larg în industria farmaceutică, cosmetologie, aromoterapie, industria alimentară, culinărie etc [1].

Flora Republicii Moldova include o diversitate largă de PMA, majoritatea dintre ele regăsindu-se în Cartea Roșie. Cercetările axate pe examinarea micro- și microscopică a morfologiei pentru identificarea PMA din flora spontană, evaluarea genofondului în scopul protecției și managementului speciilor aflate în pericol [5], păstrarea florei spontane, precum și ameliorarea speciilor introduse în cultură [2, 7] prezintă interes incontestabil având drept finalitate valorificarea PMA în economia națională.

Una dintre speciile de PMA de cultură este *Salvia sclarea* L. (familia *Lamiaceae*), bogată în compuși aromatici volatili cu proprietăți antioxidante, antinflamatorii, antimicrobiene [22] etc. Specia are o istorie îndelungată de utilizare datorită conținutului de ulei esențial (circa 0,12-0,38% în masa proaspătă și 0,39-2,54% în masa uscată) [17], cotându-se pe piață la costuri avantajoase.

Centrul de origine al speciei este insula Creta, de unde s-a extins în Bazinul Mediteranean, Nordul Africii și zona Centrală a Asiei. În prezent este cultivată în scopuri comerciale preponderent în Franța (5000 ha anual), Bulgaria (2000 ha), Grecia (1000 ha) etc. În Republica Moldova *S. sclarea* a fost introdusă în anul 1948, cele mai mari suprafețe (în jur de 14000 hectare), fiind înregistrate în perioada anilor '80-'90, când țara ocupa unul dintre primele locuri în Europa la creșterea culturilor etero-oleaginoase [5].

Actualmente, 6 soiuri omologate de proveniență hibridă, create în cadrul Institutului de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor (IGFPP) al AȘM [39], sunt cultivate anual pe circa 2000 ha, având o recoltă medie de 17-24 t/ha de inflorescențe și, respectiv, 60-70 kg/ha ulei esențial în trei ani de exploatare a plantației [3]. Pe parcursul a mai bine de 20 de ani în cadrul institutului au fost create numeroase genotipuri, hibrizi, soiuri, linii consangvinizate androsterile și menținătoare de sterilitate etc., care reprezintă germoplasma de șerlai din țara noastră și un material inițial de ameliorare valoros, fundamental pentru crearea varietăților noi cu productivitate sporită.

În acest context, un rol important revine completării continue a strategiilor clasice de ameliorare cu tehnici moderne de cercetare, determinate de progresele înregistrate în ultimii ani în domeniul biologiei moleculare [32] și studiile comparative la nivel morfologic, fiziologic, biochimic, genetic, molecular și, în final, integrarea datelor obținute ca o nouă paradigmă a procesului de ameliorare - *ameliorarea integrativă* [29].

Descrierea situației în domeniul de cercetare și identificarea problemei. Estimarea variabilității genetice reprezintă un aspect important în studiile fundamentale care pun în evidență eterogenitatea, efectele mutaționale și recombinazionale în evoluție, interacțiunea genelor și efectele reciproce, precum și în cele aplicative, care ar permite selectarea corectă și rapidă a genotipurilor parentale distanțate pentru obținerea rezultatelor eficiente în cadrul programelor de ameliorare.

Cercetările ce vizează *S. sclarea* la nivel mondial se axează preferențial pe descrierile fenotipice (morfologice și anatomice) realizate în scopul clasificării acestora, cât și pe cele biochimice, fiind evidențiate efectele terapeutice și curative deosebite ale uleiului extras [22].

La nivel național materialul utilizat în ameliorare este studiat din punct de vedere al productivității, fenologiei, elaborării soiurilor precoce rezistente la factorii abiotici, conținutul de ulei volatil [3], dar practic lipsesc cercetări privind polimorfismul genetic al germoplasmei locale de *S. sclarea*. Pentru valorificarea eficientă a genofondului sunt necesare cercetări genotipologice care ar pune în evidență variabilitatea și particularitățile materialului biologic primar inclus în programele de ameliorare. În acest context, rezultatele obținute în cadrul tezei pot oferi perspective în obținerea unor soiuri, varietăți și hibrizi mai competitivi. În același timp, completarea rezultatelor obținute de amelioratorii IGFPP cu noi date molecular-genetice poate contribui la facilitarea procesului de selectare a genotipurilor cu caractere economic valoroase.

Scopul cercetării constă în determinarea variabilității genotipologice și biochimice a genotipurilor de *S. sclarea* din Republica Moldova și asocierea rezultatelor la nivel de ADN–ARN–proteine–metaboliți, în vederea descrierii proceselor ce țin de potențialul metabolismului secundar și identificării posibilităților de selectare direcționată a formelor cu caractere economic valoroase.

Obiectivele lucrării:

- stabilirea variabilității la *S. sclarea* în baza aplicării instrumentelor bioinformaticice;
- estimarea variabilității genetice a șerlaiului prin evidențierea polimorfismului genetic;
- analiza nivelului de expresie al genelor *LPPS* și *HPPR*;
- evaluarea biochimică a conținutului de sclareol și compuși polifenolici;
- corelarea rezultatelor obținute la nivelele de organizare studiate.

Noutatea și originalitatea științifică a cercetării rezidă în stabilirea în premieră a variabilității genotipologice și biochimice a germoplasmei locale de *S. sclarea*, precum și evidențierea particularităților specifice, care relevă capacitatea ameliorativă sporită, și determinarea nivelului de expresie a genei *LPPS*, responsabilă de sinteza lambda-13-en-8-ol difosfat sintazei, care participă în formarea sclareolului, de asemenea și a genei *HPPR*, responsabilă de sinteza hidroxifenilpiruvat reductazei, implicată în calea metabolică de formare a acidului rozmarinic.

Problema științifică soluționată constă în *fundamentarea științifică* a potențialului ameliorativ la *S. sclarea* prin corelarea datelor moleculare cu cele biochimice, *ceea ce a condus la* evidențierea a trei hibrizi (H3, H4 și H8) cu o capacitate biosintetică înaltă privind compușii majori, precum sclareolul și acizii polifenolcarboxilici exprimați în acid rozmarinic, *fapt care permite* eficientizarea procesului de ameliorare și crearea hibrizilor înalt competitivi.

Semnificația teoretică a cercetării este susținută de metodologia integrativă de analiză a datelor biochimice și molecular-genetice și corelarea expresiei genelor *LPPS* și *HPPR* cu cantitatea de compuși biologic activi (sclareol și polifenoli), care contribuie la aprofundarea cunoștințelor privind mecanismele genotipologice de sinteză a metaboliților secundari și oferă posibilități de pronosticare a formelor productive în baza unui complex de indicatori.

Valoarea aplicativă a lucrării constă în identificarea spectrului polimorfic și modului de moștenire a ampliconilor RAPD, cuantificarea conținutului de sclareol și compuși polifenolici la 28 genotipuri de *S. sclarea*, evidențierea a trei hibrizi cu capacitate biosintetică sporită, precum și elaborarea și implementarea instrumentului UDaCoT și a bazei de date Med Plant în cercetările biologice.

Implementarea rezultatelor. Primerii RAPD și primerii specificii elaborați pentru genele *LPPS* și *HPPR* sunt utilizați în studiul speciei *S. sclarea* în cadrul Centrului Genetică Funcțională și sunt recomandați pentru studii genetico-moleculare ulterioare. Rezultatele expuse în teză pot fi utilizate ca suport de referință în programele de ameliorare a speciei și reprezintă material științifico-didactic pentru cursurile de genetică, bioinformatică și biochimie. Se recomandă hibridii H3, H4 și H8, care au prezentat particularități biosintetice superioare, în scopul evaluării și utilizării în crearea soiurilor de proveniență hibridă.

Rezultatele științifice principale înaintate spre susținere:

- A fost demonstrat un nivel înalt de polimorfism al materialului ameliorativ de *S. sclarea*, iar estimarea similarității genetice a permis evidențierea unei distanțe genetice maxime între formele parentale ale hibridului H3 - genotipurile P1 (♀) și P4 (♂).

- În premieră pentru *S. sclarea* a fost determinat nivelul de expresie al genelor *LPPS* și *HPPR* implicate în căile metabolice de sinteză a sclareolului, și respectiv acidului rozmarinic.

- Au fost evidențiați hibridii H3, H4 și H8 cu indici sporți ai tuturor parametrilor studiați (date fitochimice calitative și cantitative, corelate cu rezultatele moleculare) comparativ cu formele parentale.

- A fost constatat efectul heterozis la toți hibridii incluși în studiu în raport cu formele parentale, după cel puțin unul dintre indicatori: *nivelul de expresie al genei LPPS*, *nivelul de expresie al genei HPPR*, *conținutul total de polifenoli exprimat în echivalent acid galic*, *conținutul de acizi polifenolicarbixilici exprimat în echivalent acid rozmarinic* și *conținutul de flavonoide exprimat în echivalent rutozidă*.

Aprobarea rezultatelor științifice. Cercetările realizate și datele obținute au fost prezentate și discutate anual la ședințele Consiliul științific al IGFPP și Consiliul științific al Centrului de Genetică Funcțională (CGF), UnAȘM, precum și în cadrul Conferinței Internaționale a Tinerilor Cercetători (Chișinău, 2012), Congresului de Etnofarmacologie (Brașov, România, 2013), Simpozionului Științific Internațional „Agricultura modernă-realizări și perspective, dedicat aniversării a 80 ani ai Universității Agrare de Stat din Moldova” (Chișinău, 2013), Conferinței Regionale „Young Scientists and Science in the Region” (Podgorica, Muntenegru, 2013), Simpozionului Național cu participare internațională „Biotehnologii avansate-Realizări și Perspective” (Chișinău, 2013), Congresului Internațional de Ameliorare a Plantelor (Antalia, Turcia, 2013), Conferinței Științifice Internaționale „Genetica, fiziologia și Ameliorarea plantelor” (Chișinău, 2014), Conferinței Științifice Internaționale a doctoranzilor „Tendințe contemporane ale dezvoltării științei: Viziuni ale tinerilor cercetători” (Chișinău, 2014; 2015), Congresului Internațional al Geneticienilor și Amelioratorilor (Chișinău, 2015), Conferinței Internaționale „Molecular Biology-Current Aspects and Prospects” (Cluj-Napoca, România, 2015).

Publicațiile la tema tezei. Rezultatele obținute sunt reflectate în 15 lucrări științifice (inclusiv 8 fără coautori), un capitol în culegere (studii științifice), 3 articole în reviste recenzate naționale, 2 articole în culegeri științifice și 9 comunicări în cadrul unor manifestări științifice naționale și internaționale.

Volumul și structura tezei. Teza include adnotare, introducere, șase capitole, concluzii generale și recomandări, bibliografia expusă pe 15 pagini (295 surse), 50 figuri și 37 tabele.

Cuvinte-cheie: expresia genelor, polimorfism genetic, *Salvia sclarea* L., variabilitate genetico-moleculară, variabilitate fitochimică.

CONȚINUTUL TEZEI

În **Introducerea** lucrării se argumentează actualitatea și importanța problemei abordate, sunt formulate scopul și obiectivele tezei, se descrie noutatea științifică a rezultatelor obținute, importanța teoretică și valoarea aplicativă a cercetărilor, implementarea rezultatelor, sumarul compartimentelor tezei și aprobarea rezultatelor, publicațiile în cadrul temei cercetate, structura și volumul lucrării, termenii cheie.

1. STUDIUL INTEGRATIV AL SPECIEI *SALVIA SCLAREA* L.

Sinteza datelor din literatura de specialitate privind tematica cercetată include trei subcapitole. În prima parte sunt prezentate informațiile referitoare la cercetările biologice asupra PMA și a speciei studiate, fiind puse în evidență fundamentele teoretice și conceptuale ale cercetărilor biologice, genetice și biochimice. În a doua parte sunt evidențiate rezultatele obținute în cadrul cercetărilor privind ameliorarea *S. sclarea* realizate la nivel internațional, precum și național. Biodiversitatea și metodele de determinare a variabilității genetice fac subiectul subcapitolului trei, o atenție deosebită, fiind acordată utilizării tehnicilor moleculare în studiul polimorfismului genetic, ce oferă o gamă largă de posibilități pentru evaluarea variabilității.

2. MATERIALE ȘI METODE DE CERCETARE

2.1. Obiectul de studiu

În calitate de obiect de studiu au fost utilizate 28 genotipuri de *S. sclarea* a Laboratorului Plante aromatice și medicinale, IGFPP condus de doctorul habilitat în științe agricole Maria Goncariuc, care au inclus 15 forme parentale și 13 hibridi, formând 13 grupuri genetice [4]. Materialul a fost colectat de la plantele crescute în condiții de câmp, în faza rozetei de frunze (4 perechi), aflate în anul II (hibridi) și anul III (formele parentale) de vegetație. Pentru fiecare genotip au fost recoltate câte 3-4 frunze de la 4 plante, fiind fixate în azot lichid și păstrate la temperatura de -80 °C.

2.2. Metode de cercetare

Metode moleculare de cercetare. Analiza variabilității genotipice a fost realizată prin analiza RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*) [13], în baza a 23 primeri, iar estimarea nivelului de expresie al genelor implicate în sinteza sclareolului și a acidului rozmarinic – prin tehnica Real Time-PCR [27] în cadrul Laboratorului de Genomică al CGF, UnAȘM.

Metode biochimice de cercetare. Obținerea extractelor din materia primă vegetală, analiza fitochimică a acizilor polifenolcarboxilici și flavonelor, prin cromatografie în strat subțire și spectrofotometrie [19], s-au efectuat în cadrul Laboratorului Biologie vegetală și experimentală, Centrul de Cercetări Biologice „Stejarul”, Piatra Neamț, România. Separarea uleiului esențial din inflorescențe, prin hidrodistilare în aparate Ginsberg, a fost realizată în Laboratorul Plante aromatice și medicinale, IGFPP, iar analiza cantitativă a sclareolului - prin cromatografia lichidă de înaltă performanță (HPLC) [12] - în cadrul laboratorului Chimia Terpenoidelor, Institutul de Chimie, AȘM.

2.3. Analiza statistică a datelor s-a axat pe calcularea mediei aritmetice \bar{x} , deviației standard s , varianței s^2 , coeficientului de variație - V , gradul de corelare - R^2 [8]. Valoarea heterozisului relativ s-a calculat față de media părinților (*MPH-Mid Parent Heterozis*) și valoarea heterozisului real - față de cel mai bun părinte (*BPH-Best Parent Heterozis*). Densitogramele au fost construite cu utilizarea programului ImageJ (imagej.nih.gov/ij/), iar dendrogramele de repartiție a genotipurilor – cu UPGMA (genomes.urv.cat/UPGMA). Design-ul primerilor specifici pentru studiul expresiei genelor de interes s-a realizat cu ajutorul instrumentului PRIMER3web (primer3.ut.ee).

3. CERCETĂRI BIOINFORMATICE PRIVIND PLANTELE MEDICINALE ȘI AROMATICE

Cunoștințele privind asocierea variabilității genetice cu caractere valoroase în ameliorarea plantelor, prin integrarea rezultatelor cercetărilor fundamentale comparative, asigurate de implementarea instrumentelor bioinformatic [29], permit analiza complexă a proceselor genetico-moleculare și fiziologice și determină o evoluție rapidă în domeniul biologiei plantelor.

3.1. Managementul informațiilor referitoare la plantele medicinale și aromatice

Resursele bioinformatic devin un element esențial [23] și facilitează analiza și asocierea diferitor tipuri de date [34], oferind instrumente binevenite în cadrul programelor de ameliorare.

Informații privind PMA pot fi găsite în resursele generale, precum sunt bazele de date (BD) ale portalurilor NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), EMBL-EBI (*European Bioinformatics Institute*) și ExpASy (*Expert Protein Analysis System*) și resursele specifice: Baza de date Internațională de Etnobotanice, Baza de date NAPALERT, Departamentul de Agricultură al SUA, Baza de date privind Medicina Tradițională Chineză, Substanțe țintă din plantele medicinale, CMKb, RAINTREE, EGENES etc.

Însă, rezultatele descrise în literatura de specialitate sunt înregistrate dispersat în diverse BD, cea mai mare parte - sub o formă nestructurată. Mai mult ca atât, autorii operează cu vocabulare specifice de termeni, fiind dificil de a integra și corela aceste date [25].

Astfel, pentru facilitarea căutării informațiilor din sursele biologice și eficientizarea analizei datelor *in silico*, în cadrul UnAȘM, a fost elaborat **instrumentul UDaCoT** (*udacot.unasm.asm.md*), care prezintă un suport informațional flexibil de procesare a datelor ce poate fi folosit pentru diverse obiecte de studiu [6].

3.2. Plantele medicinale și aromatice din flora spontană a Republicii Moldova

Etapa inițială a cercetărilor realizate s-a axat pe analiza informațiilor referitoare la speciile de plante medicinale și aromatice din flora spontană a țării, dar și specii introduse în cultură. În cadrul studiului s-au analizat 102 specii de plante medicinale din flora indigenă spontană și cea de cultură prin investigarea BD ale portalului NCBI, resursă importantă în domeniul științelor biomedicale.

Analiza a fost focusată pe estimarea numărului de referințe bibliografice privind descrierea botanică și taxonomică, utilizările farmacologice, informațiile genomice sau transcriptomice, ținte moleculare ale substanțelor biologice active etc., inclusiv: secvențe nucleotidice și aminoacidice, gene de interes, metaboliți secundari și compuși biochimici valorificați în farmaceutică. Ca rezultat, am constatat o taxonomie bine stabilită pentru 94 dintre speciile analizate. Nouă specii de plante (*Gnaphalium uliginosum*, *Aronia melancarpa*, *Astragalus dasyanthus*, *Xanthium spinosum*, *Verbascum thapsiforme*, *Rumex comfertus*, *Centaureum umbellatum*, *Asperula odorata*) nu au prezentat înregistrare exactă la poziția taxonomie, ceea ce denotă un nivel foarte scăzut de studiu sau anumite divergențe ale clasificărilor.

Numărul total de referințe variază în limite foarte largi, de la câteva până la milioane. Cel mai mare număr de resurse a fost constatat pentru speciile din cultură: *Capsicum annuus*, *Fragaria vesca*, *Humulus lupulus*, *Mentha piperita* etc. Pentru unele specii (*Corylus avellana*, *Capsicum annuum*, *Quercus robur*, *Rubus idaeus*) au fost identificate colecții complete sau incomplete (în progres) de secvențe pe scară largă, asamblări, adnotări și cartografieri ale diferitelor gene de interes, rezultate care demonstrează că aceste specii pot fi incluse în proiectele genomice internaționale. Numărul datelor crește continuu, ceea ce denotă importanța din punct de vedere al utilizării acestora drept organisme model pentru analiza plantelor înrudite.

În baza investigațiilor efectuate s-a propus elaborarea unei baze de date a plantelor medicinale din Republica Moldova pentru a crea o bază unică privind PMA, accesibilă *on-line*. Actualmente, BD (www.plante.asm.md) elaborată în cadrul UnAȘM oferă posibilitatea de a accesa informații ce țin de: caracteristica genetică, taxonomia, arealul de răspândire, acțiunea terapeutică, substanțele biologice active, centrele, institutele, laboratoare care cercetează plantele medicinale, precum și harta care indică locurile de răspândire a speciei pe teritoriul Republicii Moldova.

3.3. Studiul explorativ al datelor privind *S. sclarea*

În scopul reliefării nivelului de cunoaștere și a aspectelor prevalente de studiu la *S. sclarea* au fost analizate informațiile din bazele de date a trei portaluri de importanță majoră în domeniu: NCBI, EMBL-EBI, ExpASy. Analiza explorativă s-a axat pe extragerea informației în baza cuvintelor cheie cu interogarea simultană în toate bazele de date, în dinamică, la interval de jumătate de an, utilizând instrumentul UDaCoT [6] (Figura 3.1).

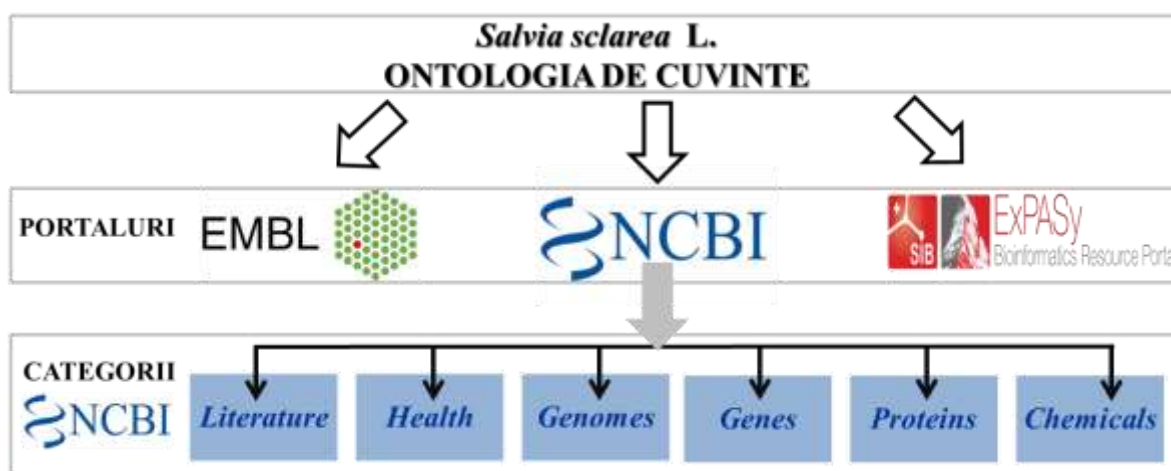


Fig. 3.1. Schema de analiză a datelor.

Cele mai multe informații (48116365 de înregistrări) se relevă în portalul NCBI, inclusiv în bazele de date - *SNP*, *PubChem Compound*, *GEO Profiles*, *GSS*, *Gene*, *dbVar*, *BioSystems*, *NLM Catalog*, *Probe*, *dbG*, care a fost selectat pentru studiile ulterioare. Rezultatele au prezentat o fluctuație considerabilă în cadrul celor șase categorii NCBI, fiind constatat un interes științific în creștere pentru fiecare domeniu. Astfel, verificarea datelor la 30 ianuarie 2016 a relevat cele mai multe înregistrări la categoria *HealthDb* (60,6%), urmată de *LiteratureDb* cu 30,4%, *GenomesDb* - 8,9%, *GenesDb* - 0,1%, *ChemicalsDb* - 0,007%, *ProteinsDb* - 0,005%.

Analiza bioinformatică realizată în cadrul studiului a permis constatarea faptului că majoritatea informațiilor reprezintă publicații privind descrierea sistematică și ecologică la nivel morfologic și fenotipic (37%), precum și rezultate biochimice (44%) privind utilizarea compușilor biologici activi în medicina populară și tradițională. Numărul publicațiilor și datelor genotico-moleculare cu referire la structura genetică și identificarea genelor agronomice valoroase sunt destul de limitate (19%).

Generalizând rezultatele capitolului putem menționa, că instrumentul UDaCoT reprezintă un suport pentru extragerea și analiza informațiilor din bazele de date facilitând procesul de elaborare a reviziei sistematice a literaturii. Analiza explorativă a datelor, privind *S. sclarea* cu utilizarea acestui instrument, demonstrează trendul pozitiv al cercetărilor, ceea ce denotă interesul sporit față de specia analizată și pune în evidență numărul redus de publicații în domeniul geneticii la *S. sclarea*.

4. VARIABILITATEA EREDITARĂ A SPECIEI *SALVIA SCLAREA* ÎN BAZA STUDIILOR GENETICO-MOLECULARE

Salvia sclarea L. ca plantă alogamă anemofilă asigură heterozigoția, favorizând prin polenizarea încrucișată apariția unor noi biotipuri. Variabilitatea genetică este determinată de sistemele poligenice care, grupate în blocuri balanțate, realizează o interacțiune alelică și nealelică favorabilă atât pentru adaptarea și evoluția organismelor, cât și pentru apariția unor noi genotipuri cu caractere economic valoroase. Variațiile caracterelor sunt generate și de alelismul multiplu, inclusiv de mutațiile consecutive ale unei gene într-un anumit locus, care datorită posibilităților mari de recombinare constituie o sursă importantă de variabilitate.

Astfel, studiul diversității materialului biologic utilizat în ameliorare, prin analiza RAPD-PCR cu primeri arbitrari, permite evidențierea nivelului de polimorfism, indiferent de mecanismul de genезă al acestuia.

4.1. Diversitatea genetică evaluată în baza primerilor RAPD

Cercetările privind polimorfismul genetic pot facilita identificarea genotipurilor valoroase necesare pentru obținerea formelor performante [20]. În acest context, posibilitatea de a evalua cu exactitate diferențele genetice dintre părinți și, ulterior, de a prezice performanța descendenților sporește eficiența procesului de ameliorare [11].

Rezultatele analizei RAPD-PCR, realizată cu 23 primeri RAPD, au pus în evidență eterogenitatea spectrelor amplificate în funcție de genotip și oligomeri utilizați, fiind demonstrat un nivel înalt de polimorfism al materialului biologic (Figura 4.1).

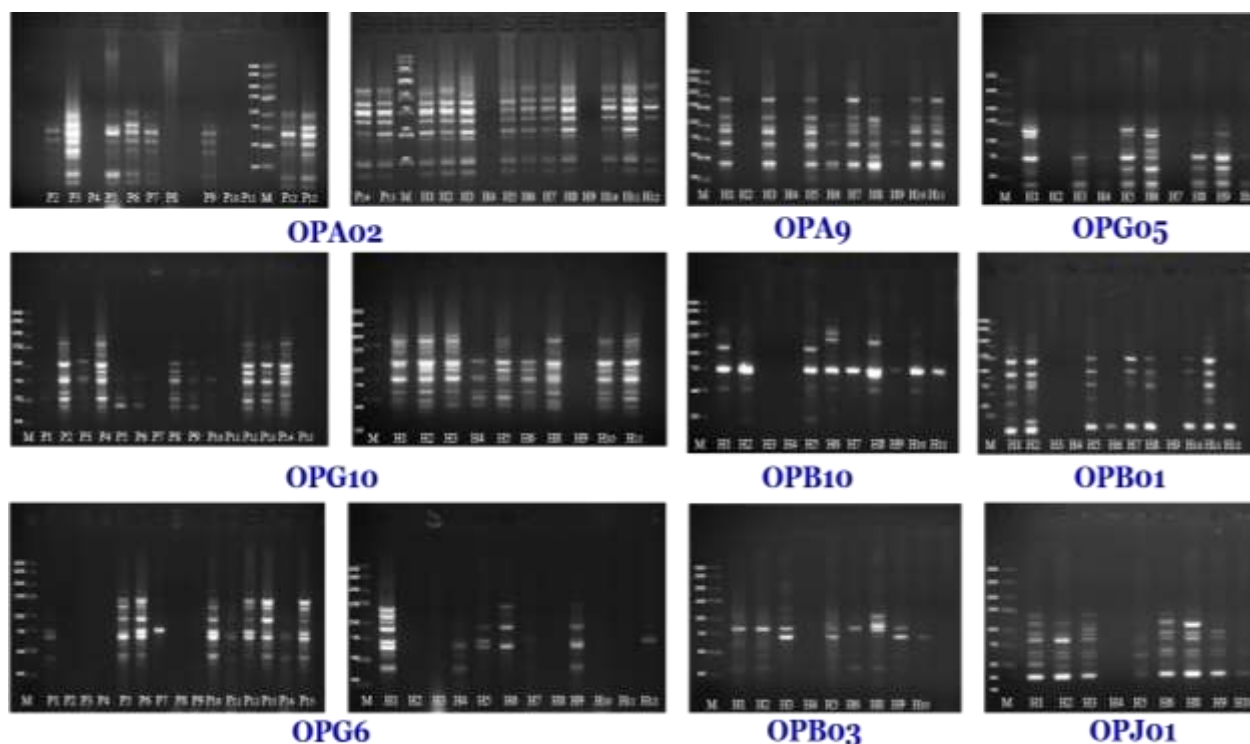


Fig. 4.1. Rezultatele de amplificare obținute în baza primerilor RAPD. (genotipuri *S. sclarea*: P1-P15 forme parentale, H1-H13 hibridzi, M- marker).

Nivelul variabilității celor 28 genotipuri de *S. sclarea* din Republica Moldova a fost confirmată prin prezența a 379 fragmente amplificate de 150 - 3100 perechi de baze (pb), dintre care 15% monomorfice și 85% polimorfice.

Numărul benzilor specifice a variat de la 0 până la 7. Cele mai multe benzi au fost generate de primerul UBC250 (Tabelul 4.1), rezultate minime au prezentat trei primerii: OPA11, OPI16, OPV09, care au fost excluși din analizele ulterioare, astfel în cadrul studiului au fost analizate rezultatele obținute cu 20 primeri RAPD.

Tabelul 4.1. Numărul de ampliconi obținuți cu primerii testați

| Primer | Oligo A1 | Oligo A2 | Oligo A3 | Oligo 28 | OPA2 | OPA9 | OPB01 | OPB03 | OPB10 | OPE17 | OPG06 | OPG6 | OPG10 | OPG5 | OPH15 | OPJ01 | OPK17 | OPU11 | UBC215 | UBC250 | Total |
|----------|----------|----------|----------|----------|------|------|-------|-------|-------|-------|-------|------|-------|------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|-------|
| T | 21 | 21 | 18 | 16 | 17 | 20 | 19 | 23 | 17 | 13 | 19 | 13 | 17 | 18 | 18 | 12 | 27 | 23 | 18 | 29 | 379 |
| P | 14 | 16 | 17 | 11 | 17 | 18 | 16 | 20 | 13 | 12 | 12 | 12 | 17 | 14 | 18 | 10 | 26 | 19 | 13 | 26 | 321 |
| M | 7 | 5 | 1 | 5 | 0 | 2 | 3 | 3 | 4 | 1 | 7 | 1 | 0 | 4 | 0 | 2 | 1 | 4 | 5 | 3 | 58 |

T - total fragmente; *P* - fragmente polimorfice; *M* - fragmente monomorfice.

Datele obținute (Figura 4.2) evidențiază hibridul H1 (163 fragmente) și genotipul P3 (147 fragmente) cu cel mai mare randament de amplificare. Genotipurile P4 și H13 au însumat cel mai mic număr de rezultate de amplificare [19]. S-a constatat că hibridii au prezentat mai multe produse de amplificare, comparativ cu formele parentale analizate.

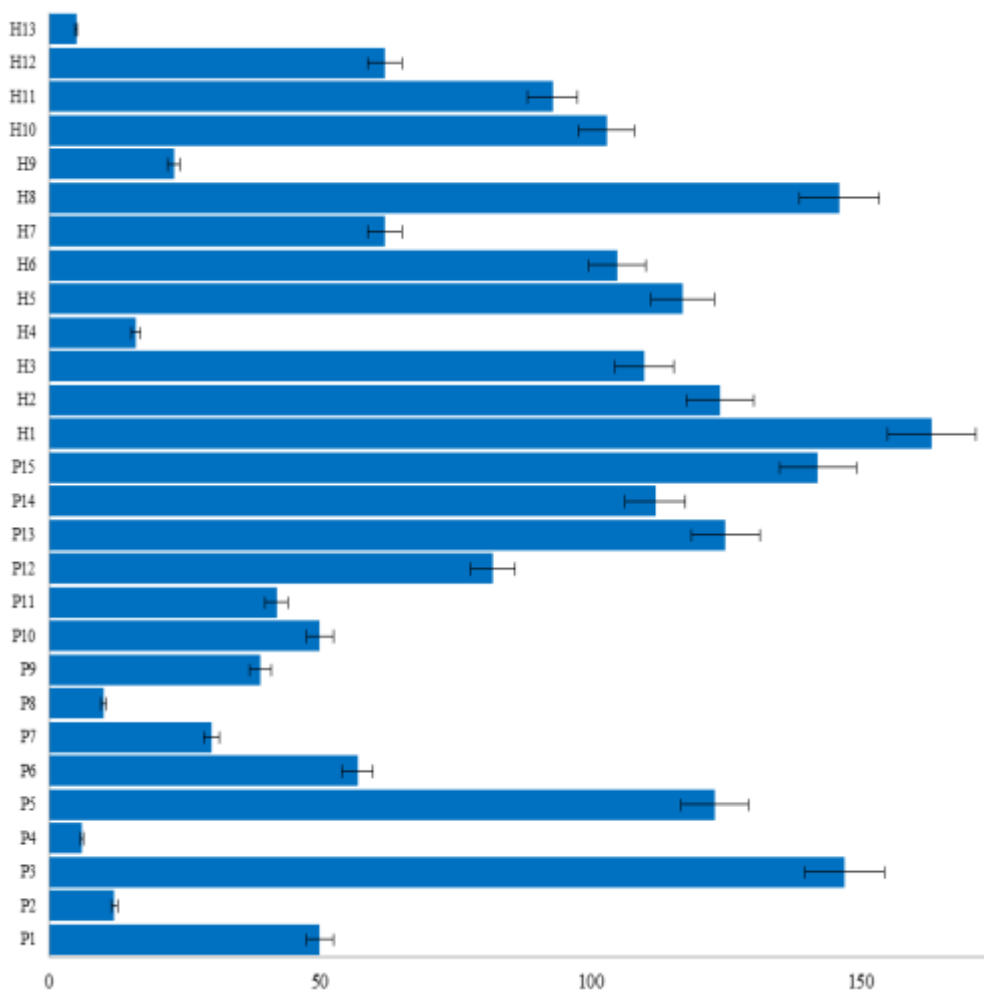


Fig. 4.2. Numărul de fragmente amplificate la genotipurile de *S. sclarea*.

Cele mai multe benzi specifice au fost înregistrate la forma parentală P5 (10), urmată de hibridul H8 (8). Formele parentale P2, P7, P8, P9, P10, P11, P12 și hibridii H4, H9, H10, H12, H13 nu au prezentat nici o bandă specifică.

Electroforegrama produselor de amplificare obținută cu oligomerul OPA10 a indicat un amplicon specific (1000 pb). Fragmentul poate fi propus ca marker molecular în ameliorarea speciei, fiind specific hibridilor H1, H3, H4, care au prezentat un nivel înalt al expresiei genei *HPPR*, precum și hibridii H8, H10, care au relevat un conținut înalt de acid rozmarinic.

Astfel, rezultatele obținute pun în evidență spectrul polimorfic al ampliconilor RAPD fiind constatată eterogenitatea și nivelul înalt al polimorfismului pentru genotipurile de *S. sclarea* din Republica Moldova. Hibridul H1 relevă un număr maxim de fragmente amplificate, iar forma parentală P5, urmată de hibridul H8 - cele mai multe benzi specifice.

4.2. Variabilitatea ampliconilor în cadrul grupurilor genetice

Un indice important în selectarea formelor parentale pentru obținerea hibridilor performanți sunt particularitățile de moștenire ale ampliconilor RAPD în prima generație [9]. Prin analiza ampliconilor la formele parentale și hibridi poate fi relevat mecanismul de interacțiune a genelor, inclusiv între alele omoloage ale unei gene sau între genele situate în loci diferite.

Analiza modului de moștenire în prima generație la grupurile genetice de *S. sclarea* incluse în studiu a fost evaluată în baza a 17 primeri RAPD, care au prezentat profiluri de amplificare pentru hibridii H1, H4, H6, H7, H8, H9 și H10 și formele parentale ale acestora. Cercetările efectuate demonstrează un spectru variat și complex de amplificare și pun în evidență șapte modalități de manifestare a ampliconilor în gelul electroforetic [8].

În 53 de cazuri fragmentele au fost comune pentru fiecare dintre cele trei genotipuri, datele obținute conducând la ideea, că în genomul șerlaiului se regăsesc anumite zone conservate și stabile, care asigură identitatea genetică a speciei. Totodată, în acest caz putem presupune manifestarea fenomenului de dominanță completă. În 68 de cazuri fragmentele au fost comune pentru F₁ și unul dintre părinți (Tabelul 4.2).

Tabelul 4.2. Moștenirea ampliconilor în cadrul grupurilor genetice de *S. sclarea* L.

| Grup genetic | ♀ | + | + | - | - | + | - | + |
|--------------|----------------|-----------|-----------|-----------|------------|-----------|-----------|-----------|
| | ♂ | + | - | + | - | - | + | + |
| | F ₁ | + | + | + | + | - | - | - |
| <i>H1</i> | 14 | 9 | 13 | 20 | 10 | 15 | 4 | 14 |
| <i>H4</i> | 13 | 2 | 3 | 1 | 0 | 4 | 1 | 2 |
| <i>H6</i> | 81 | 8 | 12 | 2 | 32 | 5 | 10 | 12 |
| <i>H7</i> | 101 | 13 | 0 | 8 | 28 | 9 | 23 | 20 |
| <i>H8</i> | 75 | 11 | 10 | 5 | 23 | 13 | 2 | 11 |
| <i>H9</i> | 22 | 7 | 0 | 3 | 3 | 0 | 5 | 4 |
| <i>H10</i> | 28 | 3 | 0 | 2 | 11 | 3 | 8 | 1 |
| Total | 334 | 53 | 38 | 41 | 107 | 49 | 53 | 64 |

Un număr de 107 fragmente au fost specifice doar pentru hibridi, astfel încât genotipurile heterozigote nu prezintă similaritate moleculară cu nici unul dintre genitori, cazurile menționate putând fi catalogate ca fenomen de supradominanță în interacțiunea alelelor. În 49 de cazuri au fost identificate produse caracteristice formelor maternelne, iar în 53 - produse caracteristice formelor paternelne, rezultate care demonstrează prezența unor gene specifice genitorilor, care nu se moștesc în F_1 . În același timp, au fost identificate 64 fragmente amplificate la ambele forme parentale, dar absente în la hibridii din prima generație.

La nivelul analizelor moleculare, rezultatele demonstrează fenomenul de variabilitate combinativă, care asigură polimorfismul genetic și variabilitatea ereditară în cadrul genotipurilor analizate.

4.3. Relațiile de înrudire dintre genotipurile cercetate

Cunoașterea relațiilor de înrudire reprezintă un instrument important în selectarea formelor parentale pentru obținerea hibridilor performanți, care se bazează pe valorile distanței și similarității genetice [18, 21].

Elaborarea dendrogramei de repartitie în baza fragmentelor RAPD amplificate a relevat câte patru grupuri de bază pentru formele parentale (Figura 4.3, A) și pentru hibridi (Figura 4.3, B) cu un coeficient cofenetic de corelație (CCC) de 0,92 și, respectiv 0,95, în timp ce clusterizarea realizată pentru cele 28 genotipuri a permis gruparea genitorilor și formele hibride ale acestora în două entități distincte relevând un CCC de 0,86.

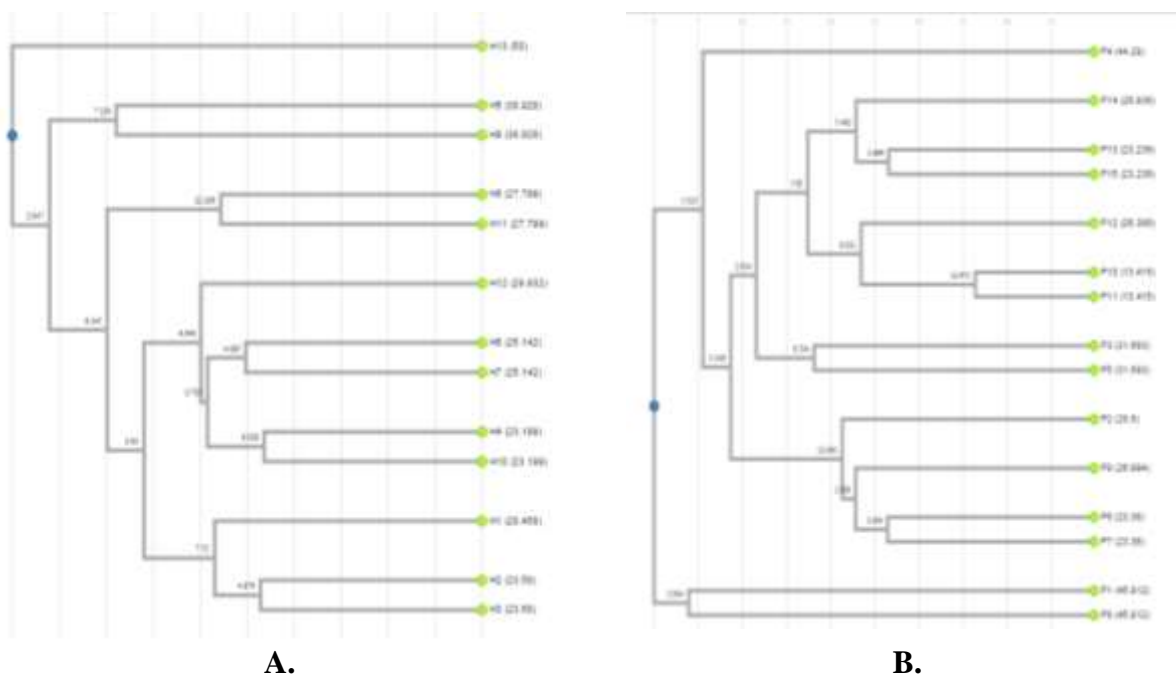


Fig. 4.3. Dendrograma de repartitie a hibridilor (A) și a formelor parentale (B).

Analiza gradului de înrudire a hibridilor a pus în evidență o distanță genetică (DG) cuprinsă în limitele 0,50-1,00. Se constată diferențe evidente, cea mai mare valoare a similarității a fost sesizată între hibridii H3 și H2 – 50,3%, această relație de înrudire se datorează faptului că genotipurile au fost create în baza aceleași linii maternelne P1. Hibridul H13 a relevat distanța maximă față de toate celelalte genotipuri analizate ceea ce explică gruparea acestuia în afara clusterelor formate. Situația similiară se atestă și în cazul formelor H9, P1 și P8 (Figura 4.3, A).

DG calculată între formele parentale a fost cuprinsă în limitele 0,39-1,0, valoarea minimă relevându-se între P10 (forma paternă a hibridului H6) și P11 (forma paternă a hibridului H7).

Cel mai distanțat din punct de vedere genetic este genotipul P8, care în cadrul studiului este utilizat ca formă paternă pentru hibridul H9 (Figura 4.3, B).

DG dintre formele parentale este considerată un indicator important al performanței hibride, fiind relatată o corelare pozitivă față de superioritatea hibridilor de prima generație. Astfel, întrucât cele 15 forme parentale fac parte din grupurile genetice analizate, a prezentat interes analiza părinților pentru fiecare hibrid în parte, din perspectiva descrierii gradului de înrudire a acestora. DG cea mai mare a fost constatată între forma maternă (P1) și cea paternă (P4) a hibridului H3, acesta având un nivel de similaritate mai mare cu forma maternă (0,85), în comparație cu forma paternă (0,95).

O distanță genetică de 0,98 se atestă în cazul formelor parentale ale hibridului H2 (P1 - forma ♀ și P2 - forma ♂), care este mai distanțat de forma paternă (0,96), în comparație cu forma maternă (0,90).

De asemenea, o distanță genetică mare (0,97) se constată și între forma maternă (P3) și cea paternă (P4) a hibridului H4.

Cea mai mică distanță genetică a fost constatată în cazul formelor parentale ale hibridului H8 (P15 - forma ♀ și P14 - forma ♂), care însă pune în evidență cea mai mare distanță genetică din cadrul studiului (1,00) față de forma sa maternă (Tabelul 4.3).

Tabelul 4.3. Distanța genetică dintre formele parentale ale hibridilor de *S. sclarea* L.

| Denumirea hibridului | | | | | | | | | | | | |
|------------------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| H1 | H2 | H3 | H4 | H5 | H6 | H7 | H8 | H9 | H10 | H11 | H12 | H13 |
| DG dintre formele parentale | | | | | | | | | | | | |
| 0,86 | 0,98 | 1,00 | 0,97 | 0,95 | 0,86 | 0,84 | 0,54 | 0,70 | 0,83 | 0,85 | 0,82 | 0,86 |
| DG dintre hibrid și forma maternă | | | | | | | | | | | | |
| 0,79 | 0,90 | 0,85 | 0,89 | 0,73 | 0,95 | 0,97 | 1,00 | 0,84 | 0,88 | 0,88 | 0,82 | 0,82 |
| DG dintre hibrid și forma paternă | | | | | | | | | | | | |
| 0,68 | 0,96 | 0,95 | 0,97 | 1,00 | 0,90 | 0,81 | 0,87 | 0,87 | 0,88 | 0,89 | 0,90 | 1,00 |

Astfel, rezultatele amplificărilor realizate în premieră, la 28 genotipuri de *S. sclarea*, în baza a 20 primeri arbitrari RAPD, au pus în evidență structura genetică complexă a materialului ameliorativ. Hibridul H1 a prezentat cel mai mare randament de amplificare, fiind urmat de forma parentală P3.

Datele obținute în urma amplificărilor pot fi utilizate ca suport de referință în ameliorarea speciei, astfel, primerii OPA2, OPA9, OPG10, OPH15 și OPK17 se recomandă pentru a fi utilizați în studierii genotipurilor de *S. sclarea*.

Generalizând, rezultatele analizei, privind relațiile de înrudire dintre genotipurile de *S. sclarea* din Republica Moldova, se constată că cele mai distanțate din punct de vedere genetic sunt formele parentale ale hibridului H3. Cei mai apropiați hibridi la nivel genetic sunt H3 și H2. Această relație se datorează faptului că genotipurile dețin aceeași formă maternă P1. Cele mai apropiate din punct de vedere genetic sunt formele parentale P10 și P11.

Astfel, estimarea relațiilor intraspecifice a genotipurilor locale de *S. sclarea* oferă informații valoroase pentru caracterizarea germoplasmei prin descrierea complexă a materialului ameliorativ și formelor parentale din cadrul grupurilor genetice de șerlai studiate.

5. EXPRESIA GENELOR *LPPS* ȘI *HPPR* IMPLICATE ÎN SINTEZA COMPUȘILOR SECUNDARI

Expresia genică cuprinde ansamblul proceselor genetico-moleculare și biochimice prin care informația ereditară este utilizată în sinteza unor molecule funcționale [10].

Cunoașterea manifestării genelor implicate în calea metabolică de formare a compușilor biologic activi oferă noi perspective de reglare a activității funcționale, în scopul sporirii productivității de uleiuri, iar la nivel industrial - pentru producția acestor substanțe mai eficientă și competitivă *in vitro* sau prin biotehnologii moderne.

5.1. Expresia genei *LPPS* implicată în calea metabolică a sclareolului

Sclareolul, compus natural important pentru industria parfumerică [14], are o structură extrem de complexă, care limitează posibilitățile de obținere pe cale industrială printr-un proces ieftin de sinteză artificială. În acest context, analiza activității transcripționale a genelor implicate în biosinteza metabolitelor secundari, inclusiv a sclareolului, devine un obiectiv major în cadrul programelor de ameliorare a speciei *S. sclarea*.

Punctul start din mecanismul de sinteză a sclareolului este geranil-geranil pirofosfatul (GGPP). Biosinteza continuă în cascadă, cu implicarea consecutivă a două enzime - *lambda-13-en-8-ol difosfat sintaza* codificată de gena *LPPS* (www.ebi.ac.uk/ena/data/view/AET21246) [33] și *sclareol sintaza*, codificată de *SsSS* (www.ebi.ac.uk/ena/data/view/AFU61897) [15].

Utilizând secvențele genelor care codifică enzimele menționate, au fost elaborați primeri specifici, însă amplificarea RT-PCR cu aceștia a generat doar pentru gena *LPPS* rezultate de amplificare, fiind obținut un singur amplicon cu dimensiunea 133 pb la toate genotipurile incluse în studiu [16].

Analiza nivelului de expresie al genei *LPPS* a pus în evidență un conținut de transcripti care a variat de la 0,024 până la 5,92 unități convenționale, cu o medie de $2,33 \pm 0,18$. Cel mai mare conținut a fost remarcat în cazul hibridului H9, urmat de H10 și H3 (Figura 5.1).

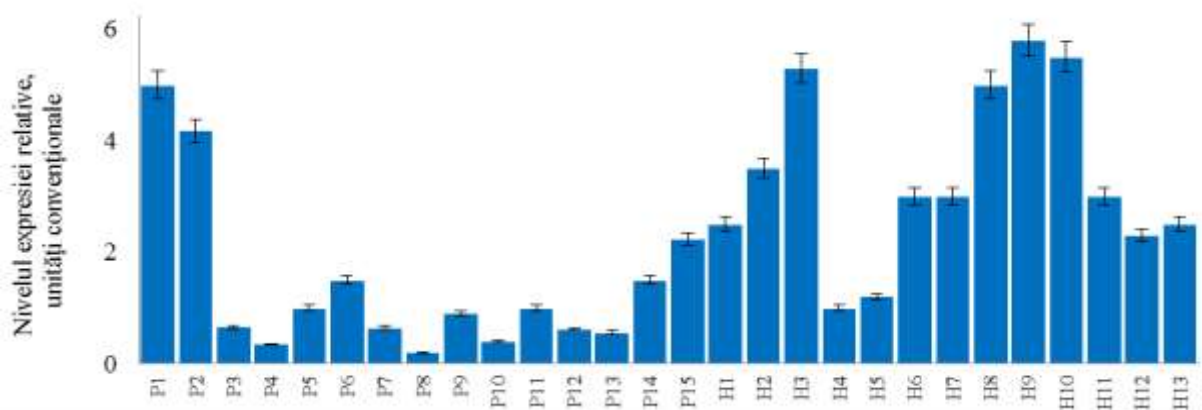


Fig. 5.1. Nivelul de expresie al genei *LPPS* în cadrul genotipurilor de *S. sclarea*.

Dispersia datelor privind nivelul de expresie al genei *LPPS* este de 3,5, grupându-se în cinci intervale. Poligonul frecvențelor a arătat o distribuție asimetrică pe stânga. Variabilitatea nivelului de expresie al genei *LPPS* este înaltă, atestându-se pentru cele 28 de genotipuri de *S. sclarea* un grad de omogenitate de 80,42%, respectiv, 98,28% pentru formele parentale și 56,07% pentru hibridi.

5.2. Expresia genei *HPPR* implicată în biosinteza acidului rozmarinic

Acidul rozmarinic (AR) este un acid polifenolcarboxilic pe larg răspândit LA regnul vegetal, care conferă aromă [31] și manifestă un număr variat de activități biologice, inclusiv

antibacteriană, antioxidantivă, antiinflamatoare, antivirală etc. [24]. Procesul de biosinteză a acidului are la bază două căi metabolice (fenilpropanoidică și a derivaților tirozinei) [37], un rol important în acumularea AR, revenind hidroxifenilpiruvat reductazei, codificată de gena *HPPR-Salvia miltiorrhiza hidroxifenilpiruvat reductaza mRNA, complete cds* [38, 36].

În cadrul studiului, pentru prima dată au fost elaborați primeri specifici pentru gena *HPPR*. Amplificarea RT-PCR cu aceștia a generat un amplicon cu dimensiunea 138 pb la cele 28 genotipuri de șerlai, similar celui identificat la *Salvia miltiorrhiza* [16, 36].

Cantitatea de transcripti a genei a variat în limitele 0,01 (P14) și 0,34 (H1) unități convenționale, cu o medie de $0,104 \pm 0,008$. Valorile înregistrate au permis evidențierea hibridului H1 cu cea mai înaltă activitate transcripțională, urmat de H3 și H4 (Figura 5.2).

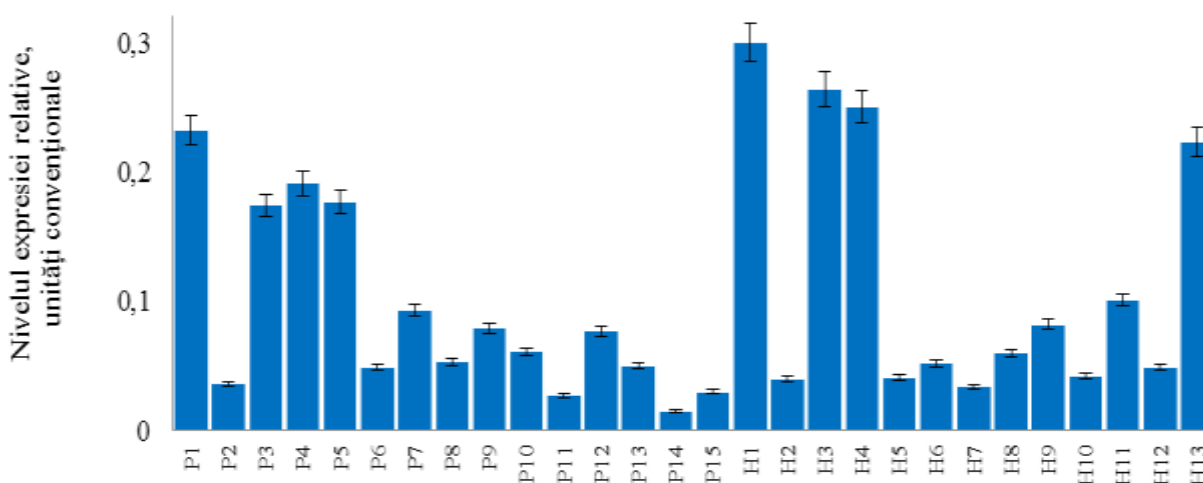


Fig. 5.2. Nivelul de expresie al genei *HPPR* în cadrul genotipurilor de *S. sclarea*.

Variația rezultatelor privind nivelul de expresie al genei *HPPR* este de 0,007. Datele s-au grupat în nouă intervale, iar poligonul frecvențelor a arătat o distribuție asimetrică puternic pe stânga. Coeficientul de variație al datelor obținute constituie 83,16% (76,32% pentru formele parentale și 85,74% pentru hibridi).

5.3. Aspecte privind expresia genelor în cadrul grupurilor genetice

Analiza comparativă generală a hibridilor și formelor parentale a demonstrat un nivel transcripțional mai mare la formele hibride ($3,15 \pm 0,25$ pentru gena *LPPS* și $0,12 \pm 0,01$ pentru gena *HPPR*), comparativ cu formele parentale - $1,63 \pm 0,22$ (*LPPS*) și $0,09 \pm 0,01$ (*HPPR*).

Studiul expresiei genelor pentru fiecare grup genetic a permis constatarea în majoritatea cazurilor (11 din 13) a unei capacități transcripționale sporite pentru *LPPS* după media formelor parentale și cel mai bun părinte. Rezultatele obținute pun în evidență manifestarea efectului heterozis relativ și real pentru opt hibridi (H4, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H13). Alți doi hibridi au arătat valori înalte ale heterozisului față de formele parentale, inclusiv H12 - în baza estimării valorilor după media formelor parentale, H3 - după cel mai bun părinte.

Datele obținute pentru gena *HPPR* au permis atestarea unui efect pozitiv al heterozisului în cazul a cinci hibridi, conform indicatorului media părinților și șapte hibridi, care au manifestat un efect pozitiv al heterozisului față de cel mai bun părinte. Cele mai mari valori au fost constatate în cazul hibridului H8 (33), urmat de H4 (31) și H1 (29). Estimarea expresiei evidențiază manifestarea heterozisului real în cazul a patru hibridi (H1, H8, H9 și H10).

6. VARIABILITATEA FITOCHIMICĂ A SPECIEI *SALVIA SCLAREA* L.

Valoarea și proprietățile fitoterapeutice ale PMA depind de conținutul compușilor bioactivi, care variază în funcție de genotip, arealul de creștere, condițiile de cultivare etc. Cuantificarea și descrierea metaboliților secundari, inclusiv a compușilor polifenolici prezintă o importanță deosebită în identificarea amprentei fitochimice a *S. sclarea*.

6.1. Identificarea compușilor polifenolici la genotipurile de *S. sclarea*

În cadrul cercetărilor efectuate, utilizând cromatografia în strat subțire (CSS), au fost analizați doi acizi polifenolcarboxilici (APC) – acidul rozmarinic și acidul cafeic (spoturi de culoare azurie până la albastră) și două flavonoide – rutozida și apigenina (spoturi de culoare galben - galben portocaliu), fiind relevată prezența acestora la toate cele 28 genotipuri de *S. sclarea* analizate (Figura 6.1).

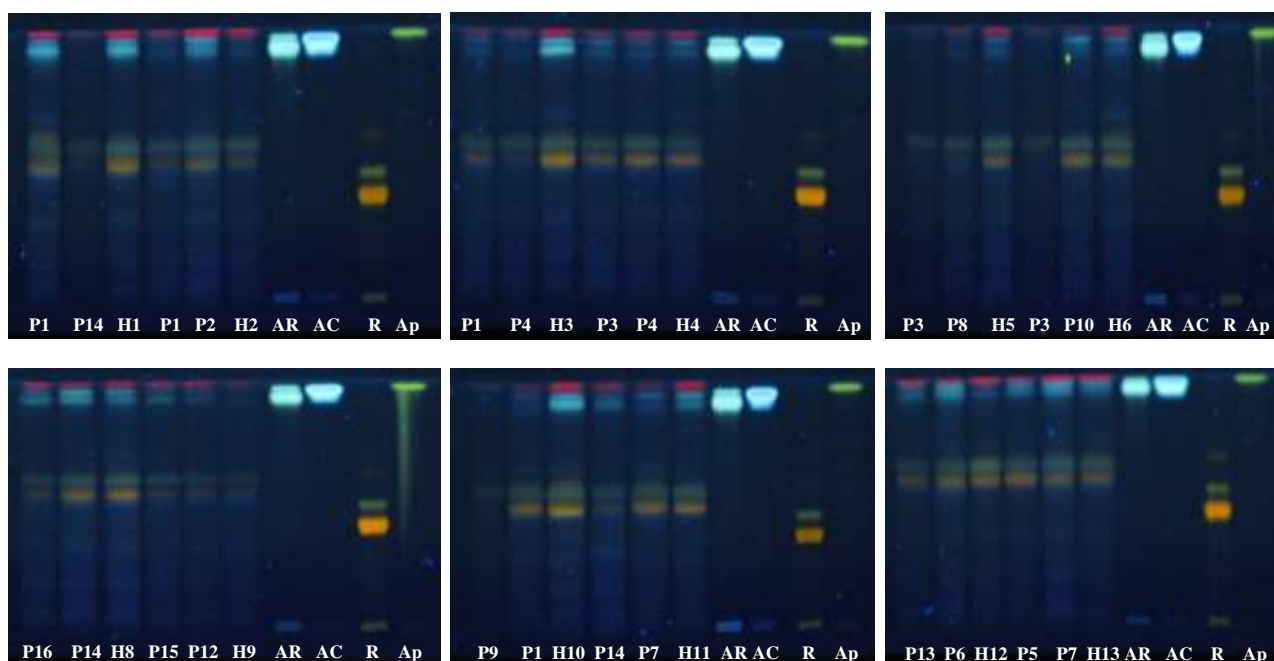


Fig. 6.1. Cromatograma derivaților polifenolici la genotipurile de *S. sclarea*.
(probe *S. sclarea*: P1-P15 forme parentale, H1-H13 hibrizi;
etalioane: A.r - acid rozmarinic , A.c - acid cafeic, R - rutozidă, Ap - apigenină).

Analiza genotipurilor de *S. sclarea* a permis să constatăm o intensitate maximă a benzilor, corelată cu o cantitate sporită a acidului cafeic și acidului rozmarinic la hibrizii H3, H8 și H10, precum și la formele parentale P6, P7 și P8. O intensitate minimă a APC a fost atestată la forma parentală P1. Hibridul H9 a prezentat un profil foarte apropiat față de profilurile formelor parentale.

Studiul flavonoidelor a pus în evidență hibridul H3 și forma parentală P7 cu o intensitate maximă, în timp ce forma parentală P1, similar cu rezultatele pentru acizii polifenolcarboxilici, prezintă cea mai mică colorație a benzilor (Figura 6.1.). Rutozida, comparativ cu apigenina, înregistrează o intensitate mai înaltă a spoturilor cromatografice și, respectiv, un conținut mai mare. O cantitate sporită de rutozidă, se atestă în cazul a șapte dintre hibrizi (H1, H2, H3, H5, H8, H10 și H12) și trei forme parentale (P2, P7 și P9), iar de apigenină – la hibrizii H8 și H13 și formele parentale P6 și P7.

Rezultatele cromatografice a permis relevarea la hibrizi a unui conținut mai mare, asociat cu capacități biosintetice sporite, comparativ cu formele parentale. Astfel, se evidențiază cinci

hibridzi, pentru conținutul de APC (H3, H4, H5, H8 și H9), cinci hibridzi pentru conținutul de rutozidă (H1, H3, H5, H8 și H12) și doi hibridzi pentru conținutul de apigenină (H3 și H8).

Generalizând datele obținute, hibridul H8 și forma paternă P7 au atestat o intensitate maximă a spoturilor polifenolilor studiați. În același timp, genotipurile H3, H8, H10 și P6 s-au remarcat printr-o intensitate mare a benzilor corespunzătoare acizilor polifenolcarboxilici; genotipurile H1, H2, H3, H5, H10, H12, P2 și P9 – pentru rutozidă; hibridul H13 și forma parentală P6 – pentru apigenină. Un nivel minim pentru compușii analizați se atestă la forma parentală P1.

6.2. Analiza cantitativă a conținutului de compuși secundari

Conținutul total de compuși polifenolici, exprimat în acid galic, evaluat în studiu a variat de la 0,11 (P14) până la 0,32 (H3) g acid galic/100 g masă proaspătă (Figura 6.2.), date similare celor raportate și de alți cercetători [26, 30, 35].

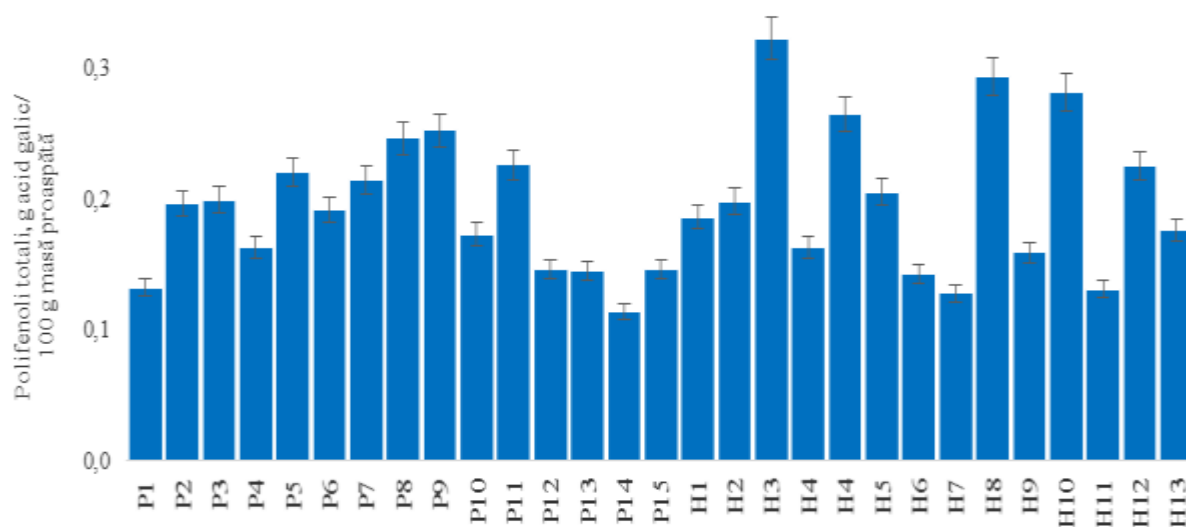


Fig. 6.2. Conținutul total de compuși polifenolici la genotipurile de *S. sclarea*.

Hibridii au prezentat o valoare medie de $0,21 \pm 0,02$ g acid galic/100 g masă proaspătă. O cantitate medie mai scăzută s-a atestat în cazul formelor parentale – $0,19 \pm 0,01$ g/100 g masă proaspătă. Nivelul maxim a fost constatat la hibridul H3 (0,32), urmat de hibridii H8 (0,29 g), H10 (0,28 g) și H4 (0,26 g). Un conținut minim al compușilor au fost remarcat la forma parentală P14.

Rezultatele au permis relevarea unei distribuții simetrice pentru genotipurile de *S. sclarea*. Coeficientul de variație pentru conținutul total de polifenoli a fost de 29,2%, inclusiv, 22,5 % pentru formele parentale și 30,8% pentru hibridi.

Hibridii H1, H2, H3, H4, H8, H9, H10 și H12 au evidențiat o capacitate biosintetică sporită comparativ cu media formelor parentale ale acestora. În aceste cazuri, cu excepția hibridului H9, a fost constatat un efect pozitiv heterozis și față de cel mai bun părinte. Statistic cele mai mari valori au fost relevate în cadrul grupurilor H8 (125/100%) și H3 (118/98%).

Conținutul de acizi polifenolcarboxilici, exprimat în echivalenți de acid rozmarinic, s-a încadrat în intervalul 0,07-0,29 g/100 g masă proaspătă. Cercetările arată că cei 13 hibridi au înregistrat o medie de $0,16 \pm 0,02$, în timp ce formele parentale – $0,15 \pm 0,01$ g/100 g masă proaspătă (Figura 6.3.), confirmând datele din literatura de specialitate [23]. Un conținut maxim de acid rozmarinic, la fel ca și în cazul polifenolilor totali, a fost relevat de hibridul H3 (0,29 g), urmat de hibridii H8 (0,27) și H10 (0,25).

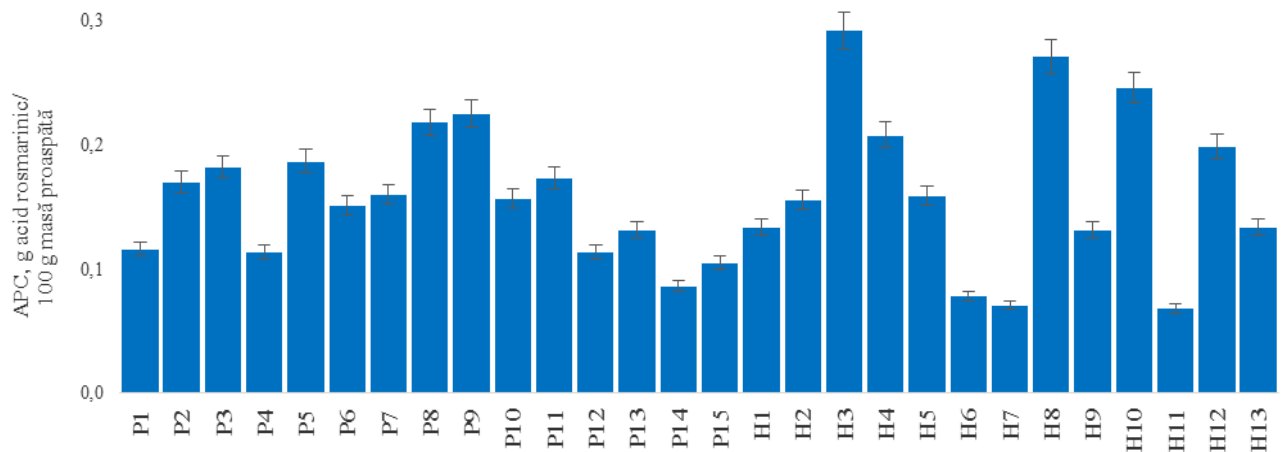


Fig. 6.3 Conținutul de acizi polifenolcarboxilici în cadrul genotipurilor de *S. sclarea*.

Cantități mici a APC au fost constatate la hibridii H6 (0,08 g), H7 (0,07 g) și H11 (0,07 g). Conform conținutului de acid rozmarinic genotipurile studiate se clasifică în trei grupuri: cu conținut înalt – formele parentale P8 și P9 și hibridii H3, H4, H8 și H10; cu conținut mediu – formele parentale P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P10, P11, P12, P13, P15 și hibridii H1, H2, H5, H9, H12 și H13; cu conținut mic – forma parentală P14 și hibridii H6, H7 și H11.

Se relevă o distribuție simetrică a datelor înregistrate, fiind evidențiat un coeficient de variație de 36,6% (27,1% pentru formele parentale și 44,9% pentru hibridi). În cadrul grupurilor genetice, hibridii H1, H3, H4, H8, H9, H10 și H12 manifestă un efect pozitiv al heterozisului față de cel mai bun părinte. În același timp, față de media formelor parentale efectul s-a evidențiat numai în cazul hibridilor H3 (83%) și H8 (69%), care s-au remarcat prin superioritate și după alți indicatori. Șapte dintre hibridi (H1, H3, H4, H8, H9, H10 și H12) au manifestat un nivel semnificativ al efectului heterozis, comparativ cu formele parentale, aceste rezultate fiind corelate cu datele moleculare obținute.

Conținutul de flavonoide, exprimat în echivalenți de rutozidă [28], a prezentat valori situate între 0,05 și 0,32 g/100 g masă proaspătă, cu o medie de 0,15±0,01 (Figura 6.4.)

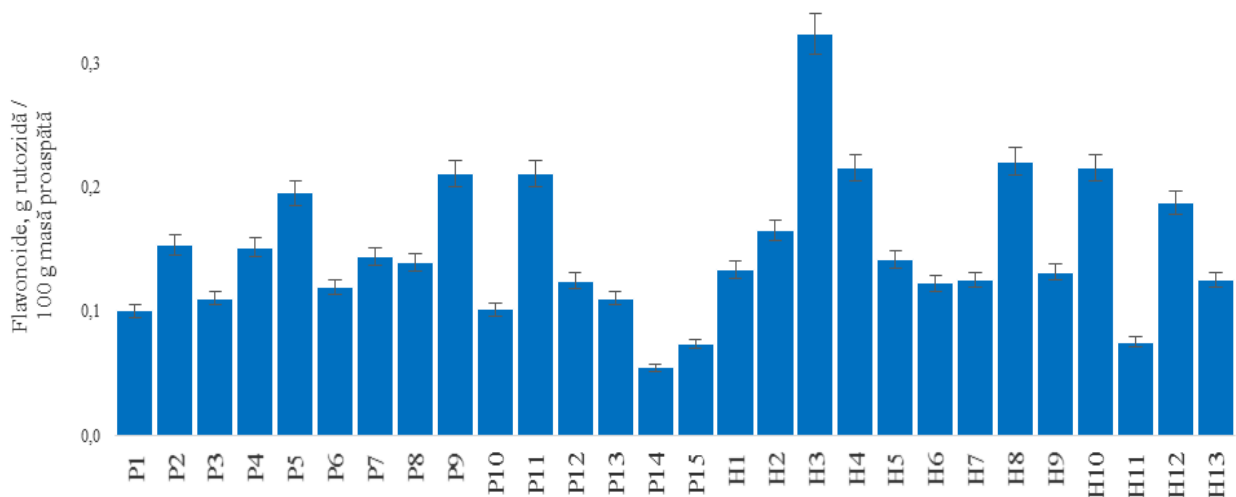


Fig. 6.4. Conținutul de flavonoide în cadrul genotipurilor de *S. sclarea*.

Cea mai mare cantitate de rutozidă, analog polifenolilor totali și APC, a fost înregistrată la hibridul H3 (0,32 g rutozidă/100 g masă proaspătă). Acesta este urmat de

hibrizii H8 (0,22), H10 și H4. Formele parentale P14 și P15 au relevat cantitatea minimă – 0,05 g rutozidă/100 g masă proaspătă. Hibrizii au înregistrat o medie de $0,16 \pm 0,02$, formele parentale – $0,13 \pm 0,01$ g/100 g masă proaspătă. Rezultatele obținute, în urma analizei conținutului de flavonoide, au permis evidențierea unui coeficient de variație de 38,0%, inclusiv 34,6% pentru formele parentale și 38,1% pentru hibrizii de *S. sclarea*. Se relevă o distribuție simetrică a valorilor pentru genotipurile cercetate. Analiza a permis constatarea unor valori maxime, pentru toți compușii studiați, în cazul hibridului H3, cantitățile minime atestându-se la P14.

Majoritatea hibridilor (cu excepția H1, H11 și H13) s-au remarcat printr-o capacitate biosintetică sporită față de formele parentale, cele mai mari valori fiind atestate în cazul hibridilor H8 (246/199%) și H3 (156/113%), similar cu datele pentru polifenolii totali și acizii polifenolcarboxilici. Evaluarea cantitativă a flavonoidelor a permis constatarea manifestării efectului de heteriozis, pentru toți indicatorii, în cazul a trei hibridi: H3, H8 și H10.

În rezultatul analizei comparative a fost demonstrată o corelare mai înaltă a acizilor polifenolcarboxilici, echivalent acid rozmarinic, față de conținutul total de polifenoli, cu valori de 0,93 (Figura 6.5, A), în raport cu gradul de corelare dintre conținutul polifenolilor totali și compușii flavonoidici (0,79) (Figura 6.5, B). Rezultatele permit constatarea faptului că acidul rozmarinic este unul dintre compușii majori din fracția de polifenoli totali.

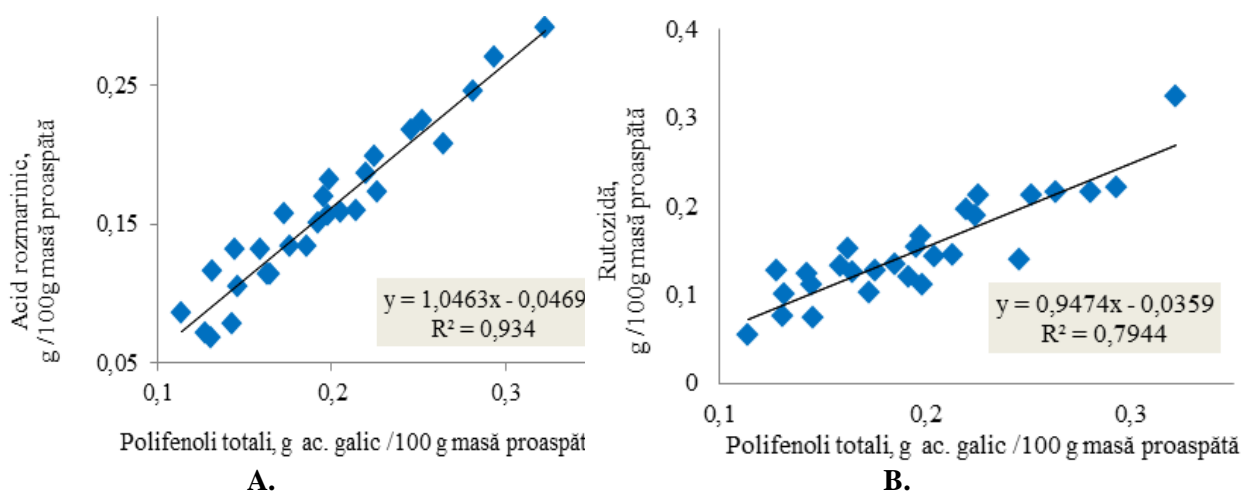


Fig. 6.5. Corelarea dintre conținutul total de polifenoli față de conținutul de acid rozmarinic (A) și conținutul de rutozidă (B).

Conținutul de sclareol. Cercetările recente demonstrează că procesul de cultivare a șerlaiului și randamentul înalt de sclareol sunt factori care au condus la extinderea suprafețelor cultivate, precum și inițierea de studii la nivel biochimic și genetic. Astfel, a fost realizat un studiu asupra hibridilor de *S. sclarea*, fiind cuantificat sclareolul în uleiul esențial, prin analiza HPLC. Cel mai mare conținut de sclareol (10%) a fost evidențiat la hibridul H9, datele fiind corelate cu rezultatele moleculare înregistrate pentru nivelul de expresie al genei *LPSS*, implicată în calea metabolică de sinteză a sclareolului. Hibridul H13 a prezentat cea mai mică

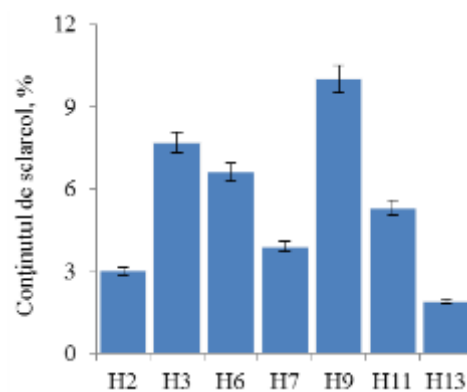


Fig. 6.6. Conținutul de sclareol la hibrizii de *S. sclarea*.

cantitate de sclareol - 1,9%. De asemenea, printr-un conținut scăzut al compusului se caracterizează hibridii H2 și H7 (Figura 6.6.).

Generalizând rezultatele fitochimice, se relevă că hibridii au prezentat un conținut mai înalt comparativ cu forme parentale, pentru toți cei trei compuși studiați. Cel mai mare conținut al tuturor compușilor a prezentat hibridul H3, urmat de H8, H10 și H4.

Forma parentală P14 a relevat o valoare minimă a conținutului total al compușilor polifenolici, exprimat în echivalenți de acid galic și al conținutului de flavonoide, exprimat în echivalent de rutozidă. Forma parentală P5 a indicat un conținut minim de polifenoli totali exprimați în echivalent acid galic; H11, H7 și H6 - pentru conținutul de APC, exprimat în acid rozmarinic; formele parentale P14 și P15 - pentru rutozidă.

Coeficientul de variație al rezultatelor înregistrate pentru conținutul total de polifenoli este de 29,2% (♀), 22,5% (♂) și 30,8% (hibridi), pentru conținutul de acid rozmarinic – 36,6% (♀), 27,1% (♂) și 44,9% (hibridi), pentru rutozidă – 38,0% (♀), 34,6 (♂) și 38,1% (hibridi).

Evaluarea cantitativă a compușilor polifenolici a permis constatarea unei capacități biosintetice sporite față de formele parentale, pentru toți indicatorii, în cazul a doi hibridi (H3, H8), urmați de H4, H9, H10 și H12 cu valori mai moderate.

6.3. Corelarea indicilor moleculari și biochimici

Evaluarea nivelului de variabilitate genetică a materialului biologic, realizată în cadrul studiului prin estimarea variațiilor continue care se referă la caracterele cantitative, inclusiv expresia genelor exprimată în unități convenționale (cap. V), determinarea calitativă (la nivel de intensitatea culorii spoturilor cromatografice) și cantitativă a unor metaboliți secundari (cap. VI) și variațiilor genetice discontinue, controlate, de obicei, de câteva gene, de regulă, alelele unui singur locus (cap. IV) devine primordială pentru biologia sistemică și descrierea relației genă-caracter-fenotip, precum și pentru sporirea eficienței de realizare a genotipului în ontogeneză.

Integrarea datelor la nivel molecular-genetic și fitochimic a permis să constatăm că trei (H3, H4 și H8) dintre cei 13 hibridi de *S. sclarea* au prezentat valori înalte ale efectului heterozis pentru toți parametrii analizați (Tabelul 6.1.).

Tabelul 6.1. Valorile maxime ale unor indicatori la hibridii de *S. sclarea*

| Compus | | Hibridi de <i>S. sclarea</i> | | | | | | | | | | | | |
|--------|-------------------|------------------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|
| | | H1 | H2 | H3 | H4 | H5 | H6 | H7 | H8 | H9 | H10 | H11 | H12 | H13 |
| A | acid rozmarinic | | | | | | | | | | | | | |
| | acid cafeic | | | | | | | | | | | | | |
| | rutozida | | | | | | | | | | | | | |
| | apigenina | | | | | | | | | | | | | |
| B | polifenoli totali | | | | | | | | | | | | | |
| | acid rozmarinic | | | | | | | | | | | | | |
| | rutozida | | | | | | | | | | | | | |
| C | LPPS | | | | | | | | | | | | | |
| | HPPR | | | | | | | | | | | | | |

A – analiza CSS; B – analiza spectrofotometrică; C - analiza expresiei genelor

Rezultatele studiului au relevat o corelație înaltă dintre conținutul de sclareol în uleiul extras și activitatea transcripțională a genei *LPPS* implicată în biosinteza acestuia, valorile gradului de corelare constituind 0,7 (Figura 6.7. A).

Deși conținutul de acid rozmarinic corelează slab cu nivelul de expresie al genei *HPPR* implicată în calea metabolică de sinteză a acestuia (Figura 6.7. B), hibridul H3 se remarcă prin concentrații maxime de AR și un conținut sporit de transcripti ai genei *HPPR* (Figura 6.8.).

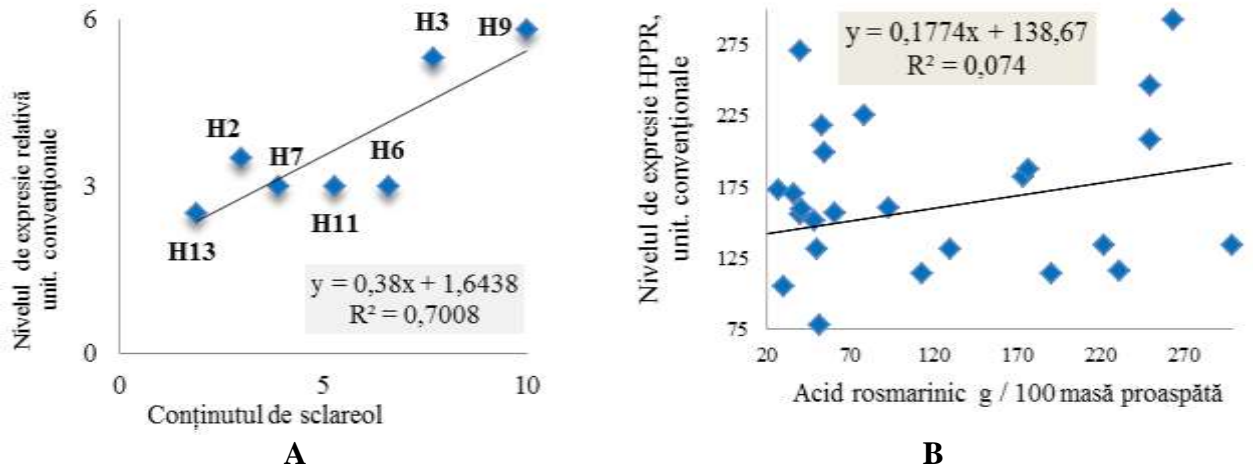


Fig. 6.7 Corelația expresiei genei *LPPS* cu conținutul de sclareol (A) și corelația expresiei genei *HPPR* cu conținutul de acid rozmarinic (B).

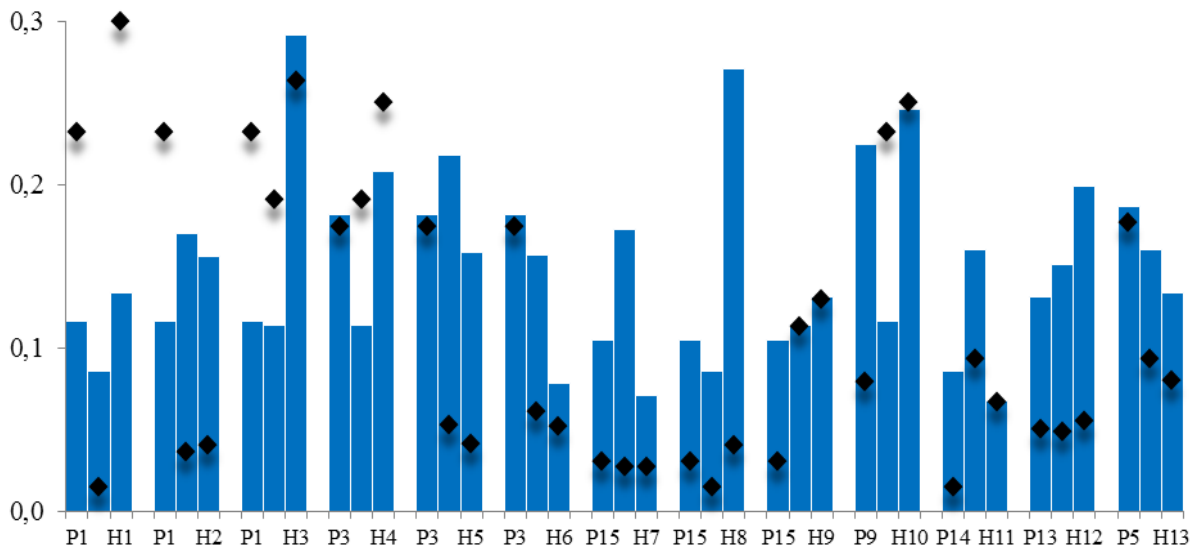


Fig. 6.8. Conținutul de acid rozmarinic și activitatea transcripțională a *HPPR*.

Hibridul H8, care se caracterizează printr-o cantitate înaltă de APC exprimat în echivalent acid rozmarinic, demonstrează cel mai polimorf spectru al ampliconilor în gelul de agaroză - opt fragmente specifice RAPD (A_1^{500} , OPB_{03}^{850} , OPB_{03}^{260} , OPB_{10}^{400} , OPE_{17}^{2100} , OPG_5^{1000} , OPG_5^{350} , OPU_{11}^{2700}). Rezultatele obținute reflectă posibilități de selectare direcționată a acestor hibridi.

Generalizarea rezultatelor obținute în cadrul grupurilor genetice de *Salvia sclarea* L. a permis constatarea unei variabilități înalte a materialului biologic, atât în urma analizelor genetico-moleculare, cât și cele fitochimice. Datele obținute evidențiază hibridii H3 și H8 care au înregistrat, pentru toți indicatorii calitativi și cantitativi, un nivel înalt pozitiv al efectului heterozis.

CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI

A fost evaluată variabilitatea molecular-genetică și fitochimică la 28 genotipuri de *S. sclarea* din Republica Moldova, fiind determinat un polimorfism înalt, care relevă potențialul ameliorativ sporit al formelor incluse în studiu.

1. Estimarea polimorfismului genetic a pus în evidență 379 de fragmente amplificate cu dimensiuni variabile în funcție de genotip și primeri. Numărul de fragmente amplificate per primer se încadrează în intervalul 12 – 29, numărul maxim (29) fiind înregistrat în cazul primerului UBC₂₅₀.
2. Elaborarea dendrogramelor de repartitie în baza fragmentelor RAPD amplificate a relevat câte patru grupuri de bază pentru formele parentale și pentru hibrizi, în timp ce clusterizarea generală - două entități distincte. Distanța genetică (DG) dintre formele parentale, care este considerată un indicator important al performanței hibride, a indicat o corelare pozitivă între DG și superioritatea hibrizilor de prima generație. Cea mai mare DG (1,0) se constată între forma maternă (P1) și cea paternă (P4) a hibridului H3 acesta având un nivel de similaritate mai mare cu forma maternă.
3. Relevarea fragmentelor comune (53) identificate pentru fiecare dintre cele trei genotipuri din cadrul grupurilor genetice specifică zone conservate și stabile care asigură identitatea genetică a speciei. Constatarea fragmentelor specifice (107) doar pentru hibrizi indică fenomenul de supradominanță în interacțiunea alelelor. Atestarea fragmentelor (64) prezente în ambele forme parentale, dar absente în F₁ indică fenomenul de recombinare genetică care asigură polimorfismul genetic și variabilitatea ereditară în cadrul genotipurilor analizate.
4. Analiza Real Time - PCR a demonstrat că activitatea transcripțională manifestă un nivel de variabilitate destul de înalt, coeficientul de variație reprezentând 80,4% (98,3% - forme parentale și 56,01% - hibrizi) pentru gena *LPPS* și, respectiv, 83,2% (76,3% - forme parentale și 85,7% - hibrizi) pentru gena *HPPR*.
5. Analiza comparativă a profilurilor cromatografice (CSS) și densitogramelor pentru compușii polifenolici a permis identificarea acidului rozmarinic, acidului cafeic (acizi polifenolcarboxilici), rutozidei și apigeninei (flavonoide) la toate genotipurile incluse în studiu și a pus în evidență cantități maxime a tuturor compușilor studiați la hibridul H8 și forma paternă P7, un nivel minim fiind relevat la forma parentală P1.
6. Analiza spectrofotometrică a evidențiat hibridul H3 cu un conținut mare al tuturor compușilor analizați. Genotipurile incluse în studiu prezintă un nivel redus de variabilitate, coeficientul de variație reprezentând pentru acidul galic (polifenoli totali) 29,2% (22,5% - forme parentale și 30,8% - hibrizi), pentru acidul rozmarinic (APC) - 36,6% (27,1% - forme parentale și 44,9% hibrizi) și pentru rutozidă (flavonoide) - 38,0%, (34,6% - forme parentale și 38,1% - hibrizi). Gradul înalt de omogenitate la nivel biochimic se explică prin faptul că formele cercetate prezintă genotipuri create și reproduse, care teoretic sunt mult mai omogene în comparație cu populațiile din flora spontană.
7. Analiza comparativă a rezultatelor obținute în baza particularităților evaluate demonstrează superioritatea hibrizilor compartiv cu genotipurile parentale. Astfel, în cadrul celor 13 grupuri genetice, a fost constatat că efectul heterozis se manifestă la toți hibrizii în raport cu formele parentale, după cel puțin un indicator studiat. Trei hibrizi (H3, H4 și H8) au prezentat valori înalte ale efectului heterozis pentru toți parametrii analizați - date fitochimice (calitative și cantitative), corelate cu date moleculare.
8. Asocierea și integrarea datelor biochimice și genetice, precum și corelarea acestora cu nivelul de expresie al genelor *LPPS* și *HPPR* a relevat unele tendințe și legități, care oferă

posibilități de selectare orientată a formelor parentale în crearea genotipurilor productive, inclusiv:

- hibridul H3, formele parentale ale căruia (♀- P1 și ♂- P4) se caracterizează prin cea mai mare distanță genetică, posedă un conținut maxim de acid rozmarinic, corelat cu un nivel înalt de transcripți ai genei *HPPR*;
 - hibridul H8 cu o cantitate mare de acid rozmarinic manifestă și cel mai polimorf spectru al ampliconilor - opt fragmente specifice RAPD (A_1^{500} ; OPB_{03}^{850} ; OPB_{03}^{260} ; OPB_{10}^{400} ; OPE_{17}^{2100} ; OPG_5^{1000} ; OPG_5^{350} ; OPU_{11}^{2700});
 - conținutul de sclareol în uleiul esențial și activitatea transcripțională a genei *LPPS* pune în evidență o corelație înaltă de 0,7, cantitatea maximă fiind prezentată de hibridul H9 (datele fitochimice și moleculare).
9. Instrumentul UDaCoT reprezintă suport pentru extragerea și analiza informațiilor din bazele de date, facilitând procesul de elaborare a reviuului sistematic al literaturii. Analiza explorativă a datelor privind *S. sclarea* cu utilizarea acestei resurse, demonstrează trendul pozitiv al cercetărilor, ceea ce denotă interesul sporit față de specia analizată și pune în evidență numărul redus de publicații în domeniul geneticii și ameliorării șerlaiului.

RECOMANDĂRI PRACTICE

1. Se recomandă perechile de primeri specifici elaborați spre utilizare pentru testarea nivelului de expresie al genei *LPPS* - implicată în calea metabolică de sinteză a sclareolului și genei *HPPR* implicată în calea de sinteză a acidului rozmarinic la *S. sclarea*.
2. Se recomandă primerii RAPD (OPA_2 , OPA_9 , OPG_{10} , OPH_{15} , UBC_{250} și OPK_{17}) în scopul studierii variabilității genetice a genotipurilor de *S. sclarea*.
3. Se recomandă instrumentul UDaCoT pentru analiza informațiilor cu privire la PMA, precum și alte organisme de interes, în procesul de realizare a reviuului sistematic.
4. Se recomandă utilizarea bazei de date Med Plant pentru a obține informații referitoare la speciile de PMA din Republica Moldova.
5. Se recomandă fragmentul OPG_{10}^{1000} ca marker molecular în ameliorarea speciei, acesta fiind specific hibridilor H1, H3, H4, care au prezentat un nivel înalt al expresiei genei *HPPR*, precum și hibridilor H8, H10, care au relevat un conținut înalt de APC, exprimat în echivalent acid rozmarinic.
6. Se recomandă autorilor includerea hibridilor H3, H4 și H8, care au prezentat particularități biosintetice superioare, în crearea soiurilor de proveniență hibridă.

ADNOTARE

Martea Rodica, Variabilitatea genético-moleculară la genotipurile de *Salvia sclarea* L., teză de doctor în științe biologice, Chișinău, 2016. Teza include introducere, șase capitole, concluzii generale și recomandări, bibliografie din 295 titluri, 77 pagini text de bază, 50 figuri și 33 tabele. Rezultatele obținute au fost publicate în 15 lucrări.

Cuvinte cheie: expresia genelor, polimorfism genetic, *Salvia sclarea* L., variabilitate genético-moleculară, variabilitate fitochimică.

Domeniul de studiu: Genetică vegetală.

Scopul cercetării constă în determinarea variabilității genético-moleculare și biochimice a genotipurilor de *S. sclarea* din Republica Moldova și asocierea rezultatelor la nivel de ADN–ARN–proteine–metaboliți, în vederea descrierii proceselor ce țin de potențialul metabolismului secundar și identificării posibilităților de selectare direcționată a formelor cu caractere economic valoroase.

Obiectivele lucrării au fost stabilirea variabilității la *S. sclarea* în baza aplicării instrumentelor bioinformatică, estimarea variabilității genetice a șerlaiului prin evidențierea polimorfismului genetic, analiza nivelului de expresie al genelor *LPPS* și *HPPR*, evaluarea biochimică a conținutului de sclareol și compuși polifenolici, corelarea rezultatelor obținute la nivelele de organizare studiate.

Noutatea și originalitatea științifică a cercetării rezidă în stabilirea în premieră a variabilității genético-moleculare și biochimice a germoplasmei locale de *S. sclarea*, precum și evidențierea particularităților specifice, care relevă capacitatea ameliorativă sporită, și determinarea nivelului de expresie a genei *LPPS*, responsabilă de sinteza lambda-13-en-8-ol difosfat sintazei, care participă în formarea sclareolului, de asemenea și a genei *HPPR*, responsabilă de sinteza hidroxifenilpiruvat reductazei, implicată în calea metabolică de formare a acidului rozmarinic.

Problema științifică soluționată constă în *fundamentarea* științifică a potențialului ameliorativ la *S. sclarea* prin corelarea datelor moleculare cu cele biochimice, *ceea ce a condus la* evidențierea a trei hibrizi (H3, H4 și H8) cu o capacitate biosintetică înaltă privind compușii majori, precum sclareolul și acizii polifenolcarboxilici, exprimați în acid rozmarinic, *fapt care a permis* eficientizarea procesului de ameliorare și crearea hibrizilor înalt competitivi.

Semnificația teoretică a cercetării este susținută de metodologia integrativă de analiză a datelor biochimice și molecular-genetice și corelarea expresiei genelor *LPPS* și *HPPR* cu cantitatea de compuși biologic activi (sclareol și polifenoli), care contribuie la aprofundarea cunoștințelor privind mecanismele genético-moleculare de sinteză a metaboliților secundari și oferă posibilități de pronosticare a formelor productive în baza unui complex de indicatori.

Valoarea aplicativă a lucrării constă în identificarea spectrului polimorfic și modului de moștenire a ampliconilor RAPD, cuantificarea conținutului de sclareol și compuși polifenolici la 28 genotipuri de *S. sclarea*, evidențierea a trei hibrizi cu capacitate biosintetică sporită, precum și elaborarea și implementarea instrumentului UDaCoT și a bazei de date Med Plant în cercetările biologice.

Implementarea rezultatelor. Primerii RAPD și primerii specificii elaborați pentru genele *LPPS* și *HPPR* sunt utilizați în studiul speciei *S. sclarea* în cadrul Centrului Genetică Funcțională și sunt recomandați pentru studii genético-moleculare ulterioare. Rezultatele expuse în teză pot fi utilizate ca suport de referință în programele de ameliorare a speciei și reprezintă material științifico-didactic pentru cursurile de genetică, bioinformatică și biochimie. Se recomandă hibrizii H3, H4 și H8, care au prezentat particularități biosintetice superioare, în scopul evaluării și utilizării în crearea soiurilor de proveniență hibridă.

АННОТАЦИЯ

Мартя Родика, Генетико-молекулярное разнообразие генотипов *Salvia sclarea* L., диссертация кандидата биологических наук, Кишинэу, 2016. Диссертация состоит из введения, 6-и глав, заключения и рекомендаций, библиографии из 295 источников, 77 страниц базового текста, 33 таблиц, 50 графиков. Научные результаты опубликованы в 15 научных публикациях.

Ключевые слова: генетический полиморфизм, генетико-молекулярное разнообразие, фитохимическое разнообразие, экспрессия генов, *Salvia sclarea* L.

Область исследований: Генетика растений.

Цель исследования заключается в определении генетической и биохимической изменчивости генотипов *S. sclarea* из Республики Молдова и корреляции результатов на уровнях ДНК – РНК – белки – метаболиты, описании процессов, связанных с потенциалом вторичного метаболизма и выявлении возможностей целенаправленного отбора форм с экономически-ценными признаками.

Задачи исследования были нацелены на установление изменчивости *S. sclarea* посредством применения подходов биоинформатики, оценки генетического разнообразия местных генотипов в результате выявления молекулярного полиморфизма, анализа уровня экспрессии генов *LPPS* и *HPPR*, биохимического анализа полифенольных соединений и склареола и корреляции полученных результатов на изученных уровнях организации.

Научная новизна и оригинальность исследования заключаются в оценке генетико-молекулярной и биохимической изменчивости, проведенной впервые у местной гермоплазмы *S. sclarea*, выявлении специфических особенностей, установлении высокого селекционного потенциала и определении уровня экспрессии гена *LPPS*, который отвечает за синтез лямбда-13-ен-8-ол дифосфат-синтазы, участвующей в формировании склареола и, также, *HPPR* гена, ответственного за синтез гидроксифенилпируват редуктазы, участвующей в образовании розмариновой кислоты.

Решенная научная проблема состоит в научном обосновании селекционного потенциала генотипов *S. sclarea* посредством корреляции молекулярных и биохимических данных, что привело к выделению трех гибридов (Н3, Н4 и Н8) с высоким биосинтетическим потенциалом образования склареола и розмариновой кислоты, факт позволяющий повысить эффективность селекции и создания высококонкурентных гибридов.

Теоретическая значимость исследования основана на методологии интегративного анализа генетическо-молекулярных и биохимических данных и на корреляции экспрессии генов *LPPS* и *HPPR* с количеством биологически активных веществ (склареол и полифенольные кислоты), которые способствуют расширению знаний о механизмах генетико-молекулярного синтеза вторичных метаболитов и дают возможность прогнозирования продуктивных форм на основе комплекса показателей.

Практическое значение: результаты исследований могут быть использованы для выявления спектра полиморфизма и способа наследования RAPD ампликонов, количественной оценки содержания склареола и полифенолов в генотипах шалфея, выделения гибридов с повышенным биосинтетическим потенциалом, разработки и применения в исследованиях инструмента UDaCoT и базы данных Med Plant.

Внедрение научных результатов. RAPD праймеры и специфичные праймеры, разработанные для *LPPS* и *HPPR* генов, используются в изучении вида *S. sclarea* в Центре Функциональной Генетики и рекомендуются для последующих генетико-молекулярных исследований. Научные результаты могут быть использованы для поддержки селекции данного вида, а также представляют собой научно-дидактический материал для подготовки курсов Генетики, Биоинформатики и Биохимии. Гибриды Н3, Н4 и Н8, которые показали повышенный биосинтетический потенциал, рекомендуется оценить и использовать для создания сортов гибридного происхождения.

ABSTRACT

Martea Rodica, Genetic and molecular variability of *Salvia sclarea* L. genotypes, PhD dissertation in Biological Sciences, Chisinau, 2016. The thesis includes introduction, 6 chapters, conclusions and recommendations, bibliography consisting of 295 sources, 77 pages of main text, 33 tables, and 55 figures. The results of the research are reflected in 15 publications.

Keywords: gene expression, genetic and molecular polymorphism, phytochemical variability, *Salvia sclarea* L.

Field of investigation: Plant genetics.

The purpose of the research is the establishment of genetic, molecular and biochemical variability of *S. sclarea* genotypes from Republic of Moldova, the association of results at DNA-RNA-protein-metabolites levels, in order to describe processes related to the potential of secondary metabolism and to identify the possibility of directed selection of genotypes with economically valuable traits.

Objectives of the thesis have focused on the establishment of *S. sclarea* variability by application of bioinformatics approaches, the estimation of the clary sage variability by demonstration the genetic polymorphism, evaluation of *LPPS* and *HPPR* genes expression level, phytochemical analysis of sclareol and polyphenolic compounds, and correlation of results obtained at studied levels of organization.

Scientific novelty and originality of the research consist in establishing for the first time of the high biochemical and molecular-genetic variability and the specific particularities, that reveal the high ameliorative capacity of local *S. sclarea* germplasm, in determining the expression level of the *LPPS* gene, responsible for the synthesis of lambda-13-en-8ol diphosphate synthase which participate in the formation of sclareol, as well as *HPPR* gene responsible for synthesis of the hydroxyphenylpyruvate reductase which participate in the formation of the rosmarinic acid.

Important scientific problem solved is *scientific validity* of the ameliorative potential of *S. sclarea* genotypes by biochemical and molecular data correlation, which led to the identification of three hybrids (H3, H4 and H8) with a higher biosynthetic potential for major compounds as sclareol and polyphenol acids, expressed as rosmarinic acid, that allows to improve process efficiency and creation of highly competitive hybrids.

The theoretical significance is supported by the integrative methodology of analyzing the biochemical and molecular-genetic data and the *LPPS* and *HPPR* genes expression correlation with the amount of biologically active compounds (sclareol and polyphenols), which contribute to improve the knowledge about genetic-molecular mechanisms of secondary metabolites synthesis and offer new possibilities of predicting productive forms on the base of the complex of indicators.

The applicative value of the work is related to the identification of polymorphic spectrum and the inheritance of RAPD amplicons, quantification of sclareol and polyphenolic content in the clary sage genotypes, to the highlighting the hybrids with increased biosynthetic capacity, as well as elaboration and implementation in biological research by the UDaCoT tool and Med Plant data base resources.

Implementation of scientific results. The RAPD primers and specific primer developed for *LPPS* and *HPPR* genes are used in the study of *S. sclarea* species within the Centre for Functional Genetics and are recommended for subsequent molecular-genetic studies. The scientific results can be used as reference support in amelioration of this species; obtained results represent scientific and didactic material in teaching courses of Genetics, Bioinformatics and Biochemistry. The hybrids H3, H4 and H8, which showed higher biosynthetic capacity, are recommended for the assessment and implementation in creation of varieties of hybrid origin.

LISTA LUCRĂRILOR ȘTIINȚIFICE PUBLICATE LA TEMA TEZEI

Capitole în culegeri

1. **UDaCoT (UnASM Data Collecting Tool):** *Principii de căutare și utilizare a informațiilor din bazele de date bioinformatică*. UnAȘM, CUBM, Lab. de Bioinformatică; resp. de ed.: A. Levițchi.- Chișinău: S.n. 2012, T-PAR SRL – 148 p., ISBN978-9975-4280-0. **Cap. 1-5.**

Articole în reviste științifice naționale

Categoria B

2. Duca M., Port A., Șestacova T., Goncariuc M., **Martea R.** *Expression of genes involved in sclareol biosynthesis in S. sclarea L.* In: Buletinul AȘM. Științe ale Vieții 2015, 2(326) p. 80-86.
3. **Martea R.** *Polimorfismul genetic în cadrul unor genotipuri de S. sclarea L.* In: Buletinul AȘM. Științe ale Vieții, 2014, nr. 3(324), p. 109-116.

Categoria C

4. **Martea R.,** Doroș I., Manole A. *Variabilitatea genetică intraspecifică la S. sclarea L.* In: Studia Universitatis. Seria Științe ale Naturii, 2013, nr. 6 (66), p. 66-71.

Articole în culegeri naționale și internaționale

5. **Martea R.** Șestacova T. and Clapco S. *HPPR gene expression in Salvia sclarea L. from Republic of Moldova.* Studia Universitatis Babeș-Bolyai Biologia, LX, Sp. Iss., 2015, p. 45-47.
6. **Martea R.** *Elaborarea primerilor specifici pentru studierea genelor implicate în sinteza compușilor din uleiul esențial de S. sclarea L.* Conferința științifică internațională „Genetica, fiziologia și ameliorarea plantelor”, ediția a 5-a, Chișinău, 2014, p. 121-125.
7. **Martea R.** *Evaluarea diversității genetice la S. sclarea L. în baza markerilor moleculari.* Simpozionul Științific Internațional „Agricultura Modernă – Realizări și Perspective”, Chișinău: Universitatea Agrară de Stat din Moldova, 2013, Vol. 39, p. 93-97.

Teze ale comunicărilor științifice la conferințe în străinătate

8. Duca M., Port A., Șestacova T., Goncariuc M., **Martea R.** *Expression of genes involved in sclareol biosynthesis in S. sclarea L.* Abstract book of the Xth International Congress of Geneticist and Breeders, Chisinau, Republic of Moldova, 2015. p. 93.
9. **Martea R.** *Marker assisted selection and information technologies strategies for plant breeding.* Abstract book of the Regional Conference "Young Scientists and Science in the Region". Podgorica, Muntenegro, 2013, p. 10-11.
10. **Martea R.** *Management of information for medicinal and aromatic plant.* Abstract book of the Vth Symposium of Ethnopharmacology, Ethnopharmacology, in support of the human health and the environment, Brașov, România, 2013, p. 29. ISSN 1844-6604.
11. **Martea R.** *Assessment of genetic variation of S. sclarea L. by RAPD.* Abstract book of the International Plant Breeding Congress, Antalya, Turkey, 2013, p. 612.

Teze ale comunicărilor științifice la conferințe în țară

12. **Martea R.** *Studiul fitochimic în cadrul genotipuri de S. sclarea L.* Teze ale Conferinței Științifice Internaționale a Doctoranzilor, Chișinău 2015, p. 81.
13. **Martea R.** *Variabilitatea genetică la diverse genotipuri de S. sclarea L.* Teze ale Conferinței Științifice Internaționale a Doctoranzilor, Chișinău 2014, p. 50.
14. **Martea R.,** Port A., Goncariuc M., Duca M. *Estimarea diversității genetice la S. sclarea L.* Teze ale Conferinței Științifice „Biotehnologii avansate – Realizări și Perspective”. Chișinău, 2013, p. 164.
15. **Martea, R.;** Levițchi, A. *UDaCoT-Instrument de colectare a datelor biologice.* International Conference of Young Researchers, X-th edition, November 23, 2012, Scientific abstracts, Chisinau, p. 42.

BIBLIOGRAFIE

1. Bojor O., Popescu O. *Fitoterapia tradițională și modernă*, ediția a III-a. București: Ed Fiat Lux, 2004. 466 p.
2. Goncariuc M. *Salvia L.* Chișinău: Centrul Edit. UASM, 2002, 218 p.
3. Goncariuc M. Cercetări de genetică și ameliorare la *Salvia sclarea L.* În: Akademos, 2013, vol. 3, nr. 30, p. 77-84.
4. **Martea R.** Polimorfismul genetic în cadrul unor genotipuri de *S. sclarea L.* În: Buletinul AȘM. Științe ale Vieții, 2014, vol. 3, nr. 324, p. 109-116.
5. Musteață G. *Cultivarea plantelor aromatice*. Ch.: Cartea Moldovenească, 1980. 240 p.
6. *UnASM Data Collecting Tool: Principii de căutare și utilizare a informațiilor din bazele de date bioinformatică*. UnAȘM, CBM, Lab. de Bioinformatică; Chișinău: S.n. T-PAR SRL, 2012. 148 p. ISBN978-9975-4280-0.
7. Palii A. *Ameliorarea plantelor*, Chișinău: S.n., (Tipogr. Foxtrot). 2014. 216 p.
8. Доспехов Б.А. *Методика полевого опыта*. Москва, Агропромиздат, 1985. 351 с.
9. Конарев В. Г. *Белки растений как генетические маркеры*. М. 1983. 320 с.
10. Alberts B., Johnson A., Lewis J. *Molecular Biology of the Cell*, 5th Edition 5th Edition, 2007, Walter. ISBN 9780815341055
11. Arif A., Bakir M.A., Khan H. A., et. al. Application of RAPD for molecular characterization of plant species of medicinal value from an arid environment. In: Genetic and Molecular Research, 2010, vol. 9, nr. 4, p. 2191-2198.
12. Bandoniene D, Murkovic M., Venskutonis P.R. Determination of rosmarinic acid in sage and borage leaves by high-performance liquid chromatography with different detection methods. In: J Chromatogr Sci. 2005, vol. 43, nr. 7, p. 372-376.
13. Bardakci F. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. In: Turk J. Biol, 2001, vol. 25, p. 185-196.
14. Caissard J.C., Olivier T., Delbecq C, et. al. Extracellular localization of the diterpene sclareol in clary sage (*Salvia sclarea L.*). In: PLoS One, 2012, vol. 7, nr. 10, p. 1-8.
15. Caniard A., Zerbe P., Legrand S. Discovery and functional characterization of two diterpene synthases for sclareol biosynthesis in *Salvia sclarea L.* and their relevance for perfume manufacture. In: BMC Plant Biology, 2012, vol. 129, nr. 119, p. 1-13.
16. Duca M., Port A., Șestacova T., Goncariuc M., **Martea R.** Expression of genes involved in sclareol biosynthesis in *S. sclarea L.* In: Buletinul AȘM. Științe ale Vieții, 2015, vol. 2, nr. 326, p. 80-86.
17. Dweck A.C. The folklore and cosmetics use of various *Salvia*. species. In Sage. The genus *Salvia*.; In: Kintzios, S. E., Ed.; Harwood Academic Publishers: Amsterdam, The Netherlands. 2000. p. 1-25.
18. Echeverrigaray S., Agostini G. Genetic relationships between commercial cultivars and Brazilian accessions of *Salvia officinalis L.* based on RAPD markers. In: Revista Brasileira de Plantas Medicinaias, 2006, vol. 8(esp), p. 13-17.
19. *European Pharmacopoeia* 5th Ed. Main Volume 5.0, 2005 with Supplements 5.1 and 5.2 (European Pharmacopoeia) Council of Europe. 2004.
20. Francia E., Tacconi G., Crosatti C., et al. Marker assisted selection in crop plants. In: Plant Cell Tissue Org, 2005, vol. 82, p. 317-342.

21. Govindaraj M., Vetriventhan M., Srinivasan M. Importance of genetic diversity assessment in crop plants and its recent advances: an overview of its analytical perspectives. In: Genetics Research International, 2015, vol. 2015, p. 1-14.
22. Gülçin I., Uğuz M.T., Oktay M. et al. Evaluation of the antioxidant and antimicrobial activities of Clary Sage (*Salvia sclarea* L.). In: Turk J Agric For, 2004, vol. 28, p. 25-33.
23. Hogeweg P.S., David B. ed. The roots of bioinformatics in theoretical biology. In: PLoS Computational Biology, 2011, vol. 7, nr. 3, p.1-5.
24. Kim G.D., Park Y.S., Jin Y.H. et al. Production and applications of rosmarinic acid and structurally related compounds. In: Appl. Microb. Biot., 2015, vol. 99, nr. 5, p. 2083-2092.
25. Kohler J., Schulze-Kremer S. The semantic metadatabase (SEM-EDA): Ontology based integration of federated molecular biological data sources. In: In Silico Biology. 2002, vol. 2, p. 219-231.
26. Koşar M., Göger F., Can Başer K.H. *In vitro* antioxidant properties and phenolic composition of *Salvia virgata* Jacq. from Turkey. In: J Agric Food Chem., 2008, vol. 56, nr. 7, p. 2369-2374.
27. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-CT} method. In: Methods, 2001, vol.25, p. 402-408.
28. Moon Y.J., Wang X., Morris M.E. Dietary flavonoids: effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. In: Toxicol In Vitro, 2006, vol. 20, nr. 2, p. 187-210.
29. Nuzzo A., Riva A., Bellazzi R. Phenotypic and genotypic data integration and exploration through a web-service architecture. In: BMC Bioinformatics, 2009, vol. 1012, p. 1-5.
30. Ogutcu H., Sokmen A., Sokmen M., et al. Bioactivities of the various extracts and essential oils of *Salvia limbata*. and *Salvia sclarea* L. In: Turk J Biol, 2008, vol. 32, p. 181-192.
31. Petersen M., Simmonds M.S. Rosmarinic acid. In: Phytochemistry, 2003, vol. 62, nr. 2, p. 121-125.
32. Rhee S.Y. Bioinformatics and its applications in plant biology. In: Plant. Biol. 2006. p. 335-360
33. Schalk M., Pastore L., Mirata M.A. et al. Toward a biosynthetic route to sclareol and amber odorants. In: J. Am. Chem. Soc., 2012, vol. 134, nr. 46, p. 18900-18903.
34. Sharma V., Sarkar I.N. Bioinformatics opportunities for identification and study of medicinal plants. In: Briefings in bioinformatics, 2012, vol. 14, nr. 2, p. 238-250.
35. Tosun M., Ercisli S., Sengul M., et. al. Antioxidant properties and total phenolic content of eight *Salvia* species from Turkey. In: Biol Res., 2009, vol. 42, nr. 2, p.175-181.
36. Xiao Y., Zhang L., Gao S. et. Al the c4h, tat, hppr and hppd genes prompted engineering of rosmarinic acid biosynthetic pathway in *Salvia miltiorrhiza* hairy root cultures. In: PLoS One, 2011, vol. 6, nr. 12, p. 1-10.
37. Yeon B.K., Jae K.K., et al. Metabolomics analysis and biosynthesis of rosmarinic acid in agastache rugosa kuntze treated with methyl jasmonate. In: PLoS One, 2013, vol. 8, nr. 5, p. 1-8.
38. Zhang S., Ma P., Yang D., LI W., Liang Z. et al. Cloning and characterization of a putative R2R3 MYB transcriptional repressor of the rosmarinic acid biosynthetic pathway from *Salvia miltiorrhiza*. In: PLoS One, 2013, vol. 8, nr. 9, p. 1-17.
39. maia.gov.md/public/files/catalogul%20soiurilor%20de%20plante/Catalog_2015_Text_Tip_ar.pdf [Catalogul soiurilor de plante pentru anul 2015, 127 p.].

MARTEA RODICA

**VARIABILITATEA GENETICO - MOLECULARĂ
LA GENOTIPURILE DE *S. SCLAREA* L.**

162.01. – GENETICĂ VEGETALĂ

Autoreferatul tezei de doctor în științe biologice

Aprobat spre tipar: 21 octombrie 2016

Hîrtie ofset. Tipar ofset.

Coli de tipar: 2,0

Formatul hîrtiei 60x84 1/16

Tiraj 100 ex.

Comanda nr.

Chișinău, 2016