

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

Teză de doctor în științe biologice

Conducător științific

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

Autor

MARTEA Rodica

CHIȘINĂU, 2016

© **Martea, Rodica, 2016**

CUPRINS

ADNOTĂRI (<i>româna, engleză, rusă</i>)	5
LISTA ABREVIERILOR	8
INTRODUCERE	9
1. STUDIUL INTEGRATIV AL SPECIEI <i>SALVIA SCLAREA</i> L.	16
1.1.Cercetări biologice asupra speciei	16
1.2.Studii privind ameliorarea <i>S. sclarea</i>	27
1.3.Biodiversitatea și metodele de determinare a variabilității genetice	34
1.4.Concluzii la capitolul 1	40
2. MATERIALE ȘI METODE DE CERCETARE	42
2.1.Obiectul de studiu	42
2.2.Metode de cercetare	43
2.3.Analiza statistică a datelor	50
2.4.Concluzii la capitolul 2	52
3. CERCETĂRI BIOINFORMATICE PRIVIND PLANTELE MEDICINALE ȘI AROMATICE	53
3.1.Managementul informațiilor referitoare la plantele medicinale și aromatice	53
3.2.Plantele medicinale și aromatice din flora spontană a Republicii Moldova	56
3.3.Studiul explorativ al datelor privind <i>S. sclarea</i>	59
3.4.Concluzii la capitolul 3	63
4. VARIABILITATEA EREDITARĂ A SPECIEI <i>SALVIA SCLAREA</i> ÎN BAZA STUDIILOR GENETICO-MOLECULARE	64
4.1.Diversitatea genetică evaluată în baza primerilor RAPD	64
4.2.Variabilitatea ampliconilor în cadrul grupurilor genetice	71
4.3.Relațiile de înrudire dintre genotipurile cercetate	81
4.4.Concluzii la capitolul 4	88
5. EXPRESIA GENELOR <i>LPPS</i> ȘI <i>HPPR</i> IMPLICATE ÎN SINTEZA COMPUȘILOR SECUNDARI	89
5.1.Expresia genei <i>LPPS</i> implicată în calea metabolică a sclareolului	89
5.2.Expresia genei <i>HPPR</i> implicată în biosinteza acidului rozmarinic	93
5.3.Aspecte privind expresia genelor în cadrul grupurilor genetice studiate	96
5.4.Concluzii la capitolul 5	99

6. VARIABILITATEA FITOCHIMICĂ A SPECIEI <i>SALVIA SCLAREA</i> L.	101
6.1. Identificarea compușilor polifenolici la genotipurile de <i>S. sclarea</i>	101
6.2. Analiza cantitativă a conținutului de compuși secundari	106
6.3. Corelarea indicilor moleculari și biochimici	115
6.4. Concluzii la capitolul 6	119
CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI	121
BIBLIOGRAFIE	124
DECLARAȚIA PRIVIND ASUMAREA RĂSPUNDERII	138
CV-UL AUTORULUI	139

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 creare a hibridilor 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 hibridii 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 ABREVIERILOR

AC - acid cafeic

AR - acid rozmarinic

Ap - apigenina

APC - acizi polifenolcarboxilici

BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool* (Instrumentul de Căutare a Alinierilor Locale)

BPH - *Better Parent Heterozis* (heterozis după cel mai bun părinte)

CSS - cromatografie în strat subțire

CTAB - *cetyl trimethyl ammonium bromide*

EMBL - *European Molecular Biology Laboratory*

ExpASy - *Expert Protein Analysis System, Swiss Institute of Bioinformatics*

F₁ - prima generație hibridă

GGPP - geranilgeranil pirofosfat

HPLC - *High Performance Light Chromatography*

HPPR - *hidroxifenilpiruvat reductaza*

LPPS - *lambda-13-en-8-ol difosfat sintaza*

m.p. - masa proaspătă

MPH - *Mid-Parent Heterozis* (heterozis în baza mediei formelor parentale)

NCBI - *National Center for Biotechnology Information*

pb - perechi de baze

PMA - plante medicinale și aromatice

qPCR - Real Time PCR (reacția de polimerizare în lanț în timp real)

R - rutozida

RAPD - *Random Amplified Polymorphic DNA*

s.u. - substanță uscată

TAE - Tris-acetat-EDTA

UPGMA - *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean* (Metoda de grupare a perechilor neponderate în baza mediilor aritmetice)

V% - coeficientul de variație

INTRODUCERE

Actualitatea temei. Plantele medicinale se folosesc în scopuri curative încă de la apariția civilizației umane [130, 134]. Până în prezent, acestea rămân a fi sursa principală de compuși chimici utilizați în medicină ca resurse terapeutice primare [195, 196]. 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 utilizate pe larg în industria farmaceutică, cosmetologie, aromoterapie, industria alimentară, culinărie etc. [2, 251].

Flora Republicii Moldova include o diversitate largă de PMA, majoritatea dintre ele regăsindu-se în Cartea Roșie [28]. Cercetările axate pe examinarea microscopică și macroscopică a morfologiei pentru identificarea PMA din flora spontană, evaluarea genofondului în scop de protecție și management al speciilor aflate în pericol [21, 22], păstrarea florei spontane, precum și ameliorarea speciilor introduse în cultură [5, 9] prezintă interes incontestabil având drept finalitate valorificarea PMA în economia națională [23].

Una dintre speciile de PMA de cultură este *Salvia sclarea* L. (familia *Lamiaceae*), bogată în compuși aromatici volatili cu proprietăți antioxidante [126], antiinflamatorii [188], antimicrobiene [126, 138, 236] 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) [90, 229], 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 [72]. 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* se cultivă din 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 [22].

Actualmente, 6 soiuri omologate de proveniență hibridă, create în cadrul Institutului de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor (IGFPP) al AȘM [288], sunt cultivate anual pe circa 2 000 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 [4]. Pe parcursul a mai bine de 20 de ani în cadrul institutului au fost create numeroase genotipuri, hibridi, soiuri, linii consangvinizate androsterile și menținătoare de sterilitate etc., care reprezintă germoplasma din țara noastră de șerlai, precum și un material inițial valoros de ameliorare, fundamental pentru crearea varietăților noi cu productivitate sporită.

În acest context, un rol important revine completării continuă a strategiilor clasice de ameliorare cu tehnici moderne de cercetare, determinate de progresele înregistrate în ultimii ani în domeniul biologiei moleculare [218] 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* [200], care oferă un drum scurt întru caracterizarea productivității fără evaluarea ulterioară a parametrilor morfologici în evaluarea biomasei vegetale.

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 ale speciei *S. sclarea*.

Cercetările ce vizează *S. sclarea* la nivel mondial se axează preferențial pe descrierile fenotipice (morfologice și anatomice) [190, 233], realizate în scopul clasificării acestora, cât și pe cele biochimice [99], fiind evidențiate efectele terapeutice și curative deosebite ale uleiului extras [22]. Literatura de specialitate furnizează și o serie de studii genetice asupra speciilor din cadrul genul *Salvia* din Franța [58], România [73], Croația [55], China [261], Iran [277], Brazilia [91], Mexic [57], Grecia [238], Israel [96].

La nivel național materialul utilizat în ameliorare este studiat din punct de vedere al productivității [115, 117, 118, 121], fenologiei, elaborării soiurilor precoce [119], și cu rezistență la factorii abiotici [13, 120], precum și conținutul de ulei volatil [5], dar practic lipsesc cercetări privind polimorfismul genetic al germoplasmei locale de *S. sclarea*. Pentru valorificarea eficientă a genofondului sunt necesare cercetări genetico-moleculare 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 noi perspective în obținerea unor soiuri, varietăți și hibrizi mai eficiente și competitive. 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 genetico-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 a 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 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 permite* eficientizarea procesului de ameliorare și creare a 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 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 sporiți 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 indicatorii studiați: *nivelul de expresie al genei LPPS*, *nivelul de expresie al genei HPPR*, *conținutul total de polifenoli exprimat în echivalent acid galic*, *conținutul de acizi polifenolicarboxilici exprimat în echivalent acid rozmarinic* și *conținutul de flavonoide exprimat în echivalent rutozidă*).

Sumarul compartimentelor tezei.

Teza include adnotare prezentată în limbile: română, engleză și rusă, lista abrevierilor, introducere, șase capitole, concluzii generale și recomandări, bibliografie, declarația privind asumarea răspunderii și CV-ul autorului.

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.

Capitolul 1. Studiul integrativ al speciei *S. sclarea* L. conține o analiză a datelor din literatura de specialitate, fiind puse în evidență fundamentele teoretice și conceptuale ale cercetărilor biologice, molecular-genetice și biochimice asupra speciei.

Capitolul 2. Materiale și metode de cercetare include obiectul de studiu și condițiile de colectare, fiind prezentate formele parentale și hibridii studiați, precum și metodele de cercetare, inclusiv RADP-PCR – pentru estimarea polimorfismului genetic și descrierea variabilității, Real Time-PCR – pentru analiza expresiei genelor, cromatografia în strat subțire – pentru identificarea acizilor polifenolcarbozilici și a flavoidelor în extractele de *S. sclarea*, spectrofotometria – pentru analiza conținutului de compuși polifenolici investigați, cromatografia de lichide de înaltă performanță – pentru cuantificarea sclareolului în probele de ulei esențial etc.

Capitolul 3. Cercetări bioinformatică privind plantele medicinale și aromatice cuprinde o prezentare a resurselor bioinformatică și a tipurilor de date disponibile pentru evaluarea PMA, precum și un studiu explorativ al datelor disponibile privind *S. sclarea*, realizat cu ajutorul instrumentului UDaCoT. Studiul bioinformatic a pus în evidență portalul NCBI cu cel mai mare volum de date, atestându-se o creștere exponențială a informațiilor de la an la an. Majoritatea informațiilor relevă publicații privind descrierea *S. sclarea* la nivel morfologic și fenotipic, precum și rezultate biochimice privind utilizarea compușilor biologic activi în medicină și tratamentul naturist. Numărul publicațiilor și datelor genético-moleculare cu referire la structura genetică, identificarea genelor asociate cu caractere agronomic valoroase pentru *S. sclarea* este destul de limitat.

Capitolul 4. Variabilitatea ereditară a speciei *Salvia sclarea* L. în baza studiilor genético-moleculare reflectă rezultate privind analiza profilurilor electroforetice ale ampliconilor RAPD la 28 de genotipuri de *S. sclarea* cultivate în Republica Moldova în baza a 20 primeri arbitrari. Rezultatele au permis constatarea diferențelor majore între genotipurile cercetate, dar și a eterogenității speciei, fiind demonstrat un potențial ameliorativ sporit al genotipurilor locale. A fost constatat că cele mai distanțate la nivel genetic sunt formele parentale ale hibridului H3 (forma ♀-P1 și forma ♂-P4), cele mai apropiate fiind formele parentale P10 (forma ♂ a hibridului H6) și P11 (forma ♂ a hibridului H7).

Capitolul 5. Expresia genelor *LPPS* și *HPPR* implicate în sinteza compușilor secundari include rezultatele privind nivelul de transcripti al genelor *LPPS* și *HPPR*, realizare pentru prima dată la genotipurile *S. sclarea* din țara noastră. Expresia genelor,

evaluată pentru fiecare hibrid și formele sale parentale în cadrul a 13 grupuri genetice demonstrează o activitate transcripțională mai mare în cazul hibrizilor comparativ cu forme parentale, fapt ce relevă capacitatea biosintetică înaltă a acestora. La genotipurile de șerlai studiate s-a constatat un nivel de variabilitate destul de înalt al activității transcripționale. Coeficientul de variație este de 80,4% pentru *LPPS*, și respectiv, 83,2% pentru *HPPR*. Hibridul H3 a prezentat valori mari ale expresiei relative pentru ambele gene investigate. Rezultatele contribuie la aprofundarea cunoștințelor privind mecanismele genetico-moleculare de sinteză a sclareolului și acidului rozmarinic, asigurând noi posibilități de pronosticare la nivel molecular a formelor productive.

Capitolul 6. Variabilitatea fitochimică a speciei *Salvia sclarea* L. Conține rezultatele analizelor fitochimice (cromatografice și spectrofotometrice) asupra acizilor polifenolcarboxilici (acid cafeic și acid rozmarinic) și a flavonoidelor (apigenina și rutozida) din extractele de masă vegetală, precum și cuantificării sclareolului din probele de ulei volatil. Studiile cromatografice au permis identificarea compușilor polifenolici cercetați la toate genotipurile de șerlai, intensități maxime a spoturilor acestora fiind puse în evidență la hibridul H8 și la forma paternă P7. Rezultatele stectrofotometrice obținute pentru acizii polifenolici (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) a permis evidențierea unei cantități maxime a compușilor polifenolici în cazul hibridului H3. Se prezintă analiza integrativă a datelor privind gradul de corelare a indicilor moleculari și biochimici obținuți pentru cele 28 de genotipuri de *S. sclarea* prin studiul polimorfismului genetic, estimarea activității transcripționale a genei *LPPS* și cuantificarea biochimică a sclareolului din probele de ulei volatil, precum și determinarea cantității de acizi polifenolicarbixilici exprimați în echivalent acid rozmarinic asociată cu evaluarea nivelului de expresie a genei *HPPR*. O atenție deosebită se acordă evaluării capacității biosintetice a hibrizilor cercetați.

Concluziile generale și recomandările conțin o sinteză a principalelor rezultate ale cercetărilor efectuate, structurate conform capitolelor descrise.

Aprobarea rezultatelor științifice. Cercetările realizate și datele obținute au fost prezentate și discutate anual la ședințele Consiliul științific al IGFPP și Consiliului științific al Centrului de Genetică Funcțională (CGF), UnAȘM, precum și în cadrul Conferinței Internaționale a Tinerilor Cercetători (Chișinău, 2012), Congresului de Etnofarmacologie

(Braşov, România, 2013), Simpozionului Ştiinţific Internaţional „Agricultura modernă-realizări şi perspective, dedicat aniversării a 80 ani ai Universităţii Agrare de Stat din Moldova” (Chişinău, 2013), Conferinţei Regionale „Young Scientists and Science in the Region” (Podgorica, Muntenegru, 2013), Simpozionului Naţional cu participare internaţională „Biotehnologii avansate-Realizări şi Perspective” (Chişinău, 2013), Congresului Internaţional de Ameliorare a Plantelor (Antalia, Turcia, 2013), Conferinţei Ştiinţifice Internaţionale „Genetica, fiziologia şi Ameliorarea plantelor” (Chişinău, 2014), Conferinţei Ştiinţifice Internaţionale a doctoranzilor „Tendinţe contemporane ale dezvoltării ştiinţei: Viziuni ale tinerilor cercetători” (Chişinău, 2014; 2015), Congresului Internaţional al Geneticienilor şi Amelioratorilor (Chişinău, 2015), Conferinţei Internaţionale „Molecular Biology-Current Aspects and Prospects” (Cluj-Napoca, România, 2015).

Publicaţiile la tema tezei. Rezultatele obţinute sunt reflectate în 15 lucrări ştiinţifice (inclusiv 8 fără coautori), un capitol în culegere (studii ştiinţifice), 3 articole în reviste recenzate naţionale, 2 articole în culegeri ştiinţifice şi 9 comunicări în cadrul unor manifestări ştiinţifice naţionale şi internaţionale.

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

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

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

Cercetările comparative privind diversitatea la nivel de chemotip și genotip asigură o descriere complexă a variabilității caracterelor economic valoroase [152] și conduc la o nouă paradigmă de valorificare eficientă a acestora și anume ameliorarea integrativă [200].

1.1. Cercetări biologice asupra speciei

Plantele, în special, cele medicinale și aromatice reprezintă surse consacrate de principii bioactive, cu o deosebită importanță economică, care se folosesc pe larg în diverse ramuri ale industriei, precum obținerea de produse farmaceutice, alimentare, cosmetice, agrochimice etc. În același timp, sunt recunoscute drept culturi ornamentale și melifere valoroase, utilizate frecvent în scopul valorificării terenurilor mai puțin productive, asigurând, astfel, venituri considerabile și constituind un substanțial material de export.

Folosirea plantelor pentru tratarea sau prevenirea unor boli datează de circa 7000 de ani. Drumul lung al fitoterapiei a parcurs numeroase etape, a creat curente, școli și sisteme terapeutice naturiste, specifice zonelor geografice sau vechilor culturi și civilizații. Utilizarea PMA este cunoscută în medicina tradițională din China (*Chinese medicine*) [206], Japonia (*Kampo medicine*) [277], India (*Ayurved*) [192], Indonezia (*Jamu*) [94] etc. Actualmente, la nivel mondial din cele aproximativ 40000-70000 de specii de plante descrise [256], în mod frecvent, în scopuri medicinale sunt utilizate mai mult de 4000 - 10000 de specii (până la 15%) [245].

La nivel global se atestă o creștere a cererii de PMA, care plasează accentele pe calitatea înaltă și certificarea condițiilor de colectare și producere, în acord cu cerințele privind protecția ecosistemelor naturale și dezvoltarea durabilă. Cererea este atât de mare, încât, datele privind volumul comerțului internațional sunt incomplete. China și India sunt țările care produc și exportă cele mai mari cantități de PMA, urmate de Thailanda, Coreea de Sud, Brazilia, Mexic, Egipt, Indonezia, Nepal, Filipine, Kenia, etc. Se atestă că în Europa cel mai mare volum se importă din China - circa 80% din plantele medicinale utilizate.

Printr-o diversitate bogată în PMA se remarcă și regiunea Europa de Sud-Est. Bulgaria, Albania, Croația și România, care furnizează pe piața europeană cantități semnificative de materie primă. Astfel, mai mult de 36000 de tone de plante cu proprietăți farmaceutice sunt exportate din Europa de Est și de Sud-Est în fiecare an [153].

Utilizarea în medicină a plantelor autohtone reprezintă o direcție de perspectivă, cu importanță economică esențială pentru Republica Moldova, flora căreia conține o vastă diversitate de taxoni care pot fi administrați pentru combaterea și prevenirea unor boli cardiovasculare, infecțioase, oncologice etc. Condițiile pedoclimatice din țara noastră sunt favorabile pentru cultivarea unei mari diversități de plante în ocoluri silvice și spații deschise (câmpie, șes etc.).

Investigațiile efectuate de oficiul local al „Convenției cu privire la diversitatea biologică” a pus în evidență posibilitatea valorificării a mai bine de 150 de specii de plante aromatice și 200 specii de plante medicinale din flora spontană [289]. Cu toate acestea în cultură sunt introduse puține specii. De menționat, însă, că numărul speciilor este în continuă descreștere [23], iar recoltarea irațională a condus la faptul ca unele specii să fie pe cale de dispariție, fiind incluse în Cartea Roșie a Republicii Moldova cu restricții de colectare.

Familia *Lamiaceae* sau ***Labiatae*** este una dintre cele mai importante familii de plante dicotiledonate, care cuprinde peste 210 genuri, repartizate de Cantino (1992) în opt subfamilii (*Ajugoideae*, *Chloanthoideae*, *Lamioideae*, *Nepetoideae*, *Scutellarioideae*, *Teucroideae*, *Viticoideae*, *Pogostemoideae*) [63], cu aproximativ 6000 de specii răspândite pe tot globul. Majoritatea speciilor din această familie prezintă semnificație medicinală, meliferă și ornamentală.

Genul *Salvia* L. este unul dintre cele mai numeroase genuri ale familiei *Lamiaceae* [173], care face parte din subfamilia *Nepetoideae*, tribul *Mentheae* [260] și cuprinde, după Nickavar, 700 de specii [197], după Çadirci - 900 de specii [56], după Walker - 1000 de specii [45, 260].

Denumirea latină a speciei indică clar importanța sa în fitoterapie: *salvia* (latin: *salvare* - a vindeca). Astfel, cele mai multe specii din cadrul genului *Salvia* sunt utilizate în medicina tradițională locală a țărilor de origine [146, 236] datorită proprietăților analgezice, antiinflamatoare [67, 135], antioxidante [52, 246], antibacteriene [86, 236], antitumorale, astringente, antidiabetice, sedative, antiinflamatoare [216], precum și a efectelor pozitive asupra memoriei și influenței spasmolitice [97, 147]. Astfel, sunt utilizate în industria alimentară, farmacologie, fitoterapie, aromaterapie, parfumerie și cosmetologie [148, 252], de asemenea sunt cultivate ca plante ornamentale [143, 165].

Una dintre speciile genului, care prezintă calități valoroase apreciată la un nivel înalt în industria parfumeriei și a aromaterapie, este și *S. sclarea*. În prezent cercetările privind specia se rezumă, în special, la studiul compușilor fitochimici, a căilor de sinteză a acestora și influență asupra organismului uman.

Încadrarea sistematică a speciei. *Salvia sclarea* L. → *Salvia* → *Lamiaceae* → *Lamiales* → *Asteranae* → *Magnoliophyta* → *Angiosperme* → *Spermatophyta* → *Tracheophyta* → *Streptophyta* → *Viridiaeplantae* → *Plantae* (Figura 1.1).



Fig.1.1. *Salvia sclarea* L.

Caracteristica generală a speciei. *S. sclarea* ($2n=22$) este una dintre speciile importante de PMA, intens valorificată datorită conținutului de ulei esențial [90, 148, 229] bogat în compuși aromatici volatili cu proprietăți antioxidante [126], antiinflamatoare [188], antimicrobiene [138, 236] etc. Specia dată mai este cunoscută ca șerlai, salvia tămăioasă în popor este numită „iarba sf. Ioan” [12].

Salvia sclarea L. (familia *Lamiaceae*) are o istorie îndelungată de utilizare fiind bogată în compuși aromatici volatili cu proprietăți antioxidante [126], antiinflamatorii [188], antimicrobiene [126, 138, 236] etc. Uleiul esențial (circa 0,38% în masa proaspătă și 0,39-2,54% în masa uscată) [90, 229] este solicitat pe piața externă la prețuri avantajoase.

S. sclarea se întâlnește în cultură preponderent flora spontană din partea sudică și centrală a Europei, în nordul Africii, în Asia Mică, America de Nord, precum și în Iran, Afganistan, Caucaz și Crimeea (Figura 1.2) [26, 72]. În prezent, conform datelor Asociației Europene a Producătorilor de Plante (EUROPAM), este cultivată în scopuri comerciale preponderent în Franța (5000 ha anual), Bulgaria (2000 ha), Grecia (1000 ha) etc. În Republica Moldova *S. sclarea* se crește de circa 70 de ani. cele mai mari suprafețe (în jur de

14000 ha) fiind înregistrate în perioada anilor '80-'90, când țara ocupa unul dintre primele locuri în Europa la creșterea culturilor etero-oleaginoase [22].

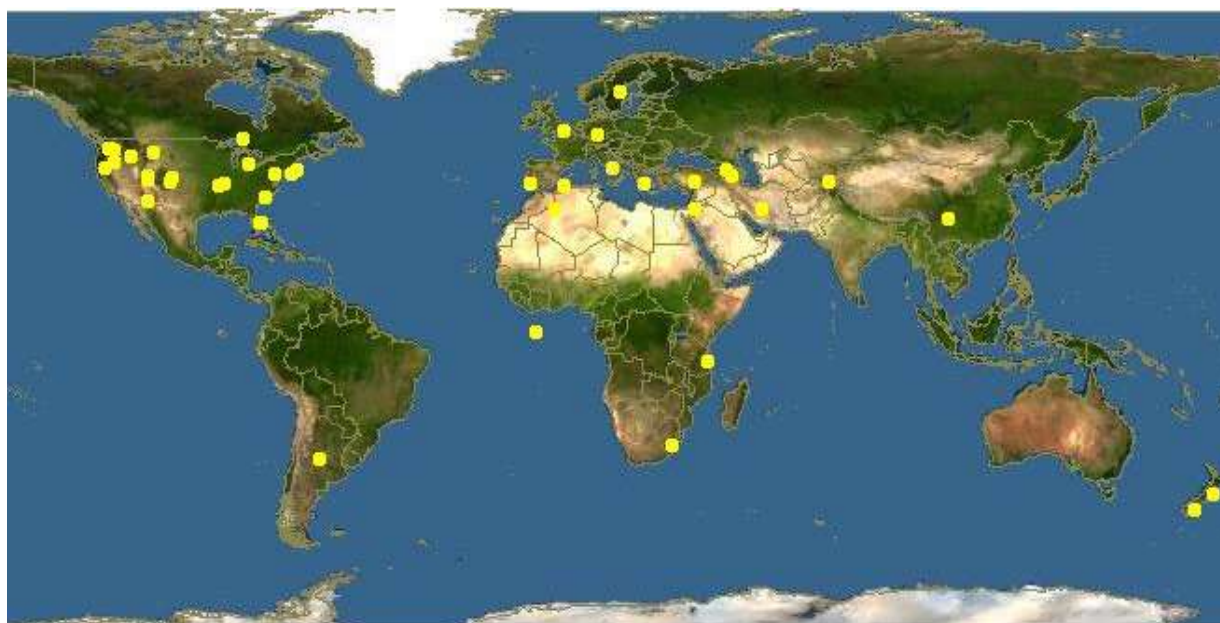


Fig. 1.2. Răspândirea speciei pe glob [286].

În perioada anilor 1977-1994 specia se găsea în 20 de gospodării agricole specializate pe întreg teritoriul țării: la Nord în raioanele Râșcani și Glodeni, în centru - raioanele Grigoriopol, Criuleni, Anenii-Noi și Căinari, iar în zona de Sud - în raioanele Cantemir și Leova. Totodată, în R. Moldova în această perioadă era obținut 40% din volumul total de ulei, fabricat în fosta URSS [5], principalii factori ce influențează pozitiv calitatea uleiului local fiind solurile bogate și insolația abundentă [12]. În unii ani suprafețele de *S. sclarea* ajungeau până la 14 mii hectare [22], având o producție de 60-70 kg /ha de ulei esențial în trei ani de exploatare a plantației [4]. După o scădere, în prezent, suprafețele cultivate cu *S. sclarea* constituie 2000 ha și se află în continuă ascensiune [12].

S. sclarea este o plantă erbacee, alogamă, entomofilă, cu rădăcină de culoare brună de 1,5-3 cm în diametru, pe care se formează numeroase rădăcini secundare scurte și subțiri [98]. Tulpina este patrunghiulară, erectă, înaltă de 1,2-1,7 m, cu o grosime cuprinsă între 1-2 cm, acoperită cu numeroși peri glandulari.

Cu toate că specia dată este considerată bienală, sau perenă, tulpina ei este întotdeauna anuală și se termină cu inflorescență. Frunzele sunt opuse, lat ovate și diferite ca mărime în funcție de poziția pe tulpină. Astfel, frunzele din rozetă au pețiol lung, care lipsește la cele de pe tulpină, iar dimensiunile limbului variază între 10-25 cm lungime și 7-15 cm lățime.

Ambele fațete ale frunzelor sunt puternic încrețite și acoperite cu numeroși perișori, care le dau un aspect catifelat, având un rol deosebit în reglarea transpirației. Florile sunt grupate în inflorescențe mari, lungi de 20-60 cm, puternic ramificate, paniculiforme. Inflorescența este formată din 6-10 pseudoverticile, fiecare având câte 4-6 flori, așezate la subțioara unor bractee nepedunculate, colorate în alb-verzui. Corola este bilabiata, lungă de 2-2,5 cm, cu labiul superior violaceu (rar roz sau alb), iar cel inferior format din doi dinți laterali și o porțiune mediană curbată în jos. Staminele sunt în număr de 4, din care numai 2 sunt bine dezvoltate. Ovarul superior are 4 ovule. Înfloreste din luna iulie până la începutul lui septembrie, cu o perioada de înflorire ce durează aproximativ 25-30 de zile. Fructele, impropriu numite semințe, sunt nucule, rotunde, mici, netede, cafenii deschis. Greutatea a 1000 de nucule este de aproximativ 3,5-4,0 g. În momentul maturării caliciul se îndoaie, iar nuculele se scutură foarte ușor. În contact cu apa acestea se acoperă cu o masă mucilaginoasă, mărindu-și volumul. Imediat după ce se zvântă, semințele păstrează o parte din umiditate, dar nu-și pierd puterea de germinare [12, 26].

Aspecte biochimice ale speciei. *S. sclarea* datorită principiilor biologice active pe care le conține, se utilizează pe larg în medicină, farmaceutică, cosmetică, aromoterapie, alimentație, Compușii aromatici volatili cu proprietăți specifice conferă speciei proprietăți curative deosebite. Principalele componente chimice conform grupelor de compuși organici sunt [155, 210]:

- **esteri:** acetat de linalil (49,0-7,18%), acetat de geranil (0,3-2,1%), acetat de neril (0,1-1,1%), butirat, valerat, acetat de bornil (0,2%), acetat de α -terpinil (0,1%);
- **monoterpene:** α -pinen (0,02-0,2%), β -pinen (0,01-0,2%), sabinen, camfen (0,01-0,03), mircen (0,3-0,9%), terpinolen, r-cimene, α -terpinen (tracce), limonen (0,1-0,8%);
- **aldehide:** trans-20 hexanal (0,1%);
- **oxizi:** 1,8 cineol, trans-linalool;
- **secviterpene:** β -cariofilen (0,8-3,0%), germacren D (1,6-4,0%), curcumen, trans - calamen, trans-ocimene (0,4-1,0%), terpinolen (0,1-0,4%), α -copaene (0,1-0,5%), β -bourbonene (0,1);
- **cetone:** α și β -tuion;
- **alcooli:** linalool (8,9-28,5%), α -terpineol (0,2-2,6%), nerol (0,05-0,6), geraniol (tracce - 2,0%), borneol, isoborneol, tuiol, terpinen-4-ol (<0,1%), α -bisabol, junerol, sclareol (0,2-2,0%), cis-3-hexanol.

Conform Farmacopei Europene (ed. V), uleiul esențial de *S. sclarea* conține acetat de linalil: 56,0-78,0% (ester), linalool: 6,5-24,0% (ester), α -terpineol: până la 5,0% (alcool),

germacrene-D: 1,0-12,0% (sescviterpenă), α - și β -tuiona: până la 0,2% (alcool), sclareol 0,4-2,6% (alcool) etc. [98, p. 1311]. Dintre compușii aromatici, constituenții ai uleiului, se enumeră α -eudesmol, δ -cadinene și δ -amorphene [154].

În literatura de specialitate, se atestă că după Casabianca și colab. (1996) *S. sclarea* deține un conținut semnificativ (>5%) de oxid de cariofilen (24,1%), urmat de sclareol (11,5%), spatulenol (11,4%), H-naftan (21,6) piran (8,6%) și β -cariofilen (5,1%) [66], iar după Verma și colab. [254] componentele principale ale uleiului sunt linaloolul (27,1-62,5%) și acetatul de linalil (până la 43,01%).

Cercetările asupra uleiului extras din plantele provenite din Republica Slovacă au permis evidențierea unor cantități mari de linalool (18,9%) și sclareol (15,7%), cantități moderate de acetat de linalil (13,7%) și cantități scăzute de germacrene D (5,0%) [99], în timp ce analiza uleiului conținut în plantele din Italia a demonstrat cantități mari de linalool (28,9% și 25,6%), acetat de linalil (34,9% și 52,7%) și germacrene D (10,6% și 3,9%), dar și cantități mici de sclareol (0,1% și 0,06%) [65]. Studiul uleiului extras din plantele din Ungaria a relevat acetatul de linalil în cantitățile cele mai ridicate (38,6-48,1%), urmat de linalool (7,9-22,5%) și germacrene D (8,2-19,8%) și numai 1,1-2,7% de sclareol [162]. Astfel, se atestă o variabilitate biochimică înaltă a compoziției calitative și cantitative a uleiurilor, care este semnificativ influențată de genotip, condițiile de cultivare și poziția geografică.

Este important de menționat că, principiile active nu se găsesc doar în inflorescențele, dar și în alte organe ale plantei. În extractul obținut din rădăcini de *S. sclarea*, au fost identificate: salvipisona și aethiopinona [259]. Semințele de *S. sclarea*, au un conținut bogat de ulei esențial - 27,24%, în care au fost identificați acidul α -linoleic (52,1%) și acidul oleic (22,05%) [272].

Cercetări privind metaboliții secundari la PMA. Studiile recente evidențiază faptul că anual peste 1500 de compuși noi sunt identificați în diferite specii de plante, iar aproximativ un sfert dintre medicamentele prescrise la nivel global conțin substanțe de origine vegetală. Valorificarea potențialului PMA este foarte profitabilă, aceste specii constituind principalul furnizor de compuși fitochimici utilizați în diverse ramuri industriale. În același timp, rapiditatea procesului de extincție a speciilor și de limitare a bazei genetice a resurselor vegetale a stimulat atât reconsiderarea importanței vitale a resurselor naturale, cât și interesul pentru obținerea metaboliților de interes prin metode neconvenționale. Astfel, circa jumătate dintre produsele industriei chimico-farmaceutice au la bază plantele medicinale, la acestea sumându-se și produsele utilizate la prepararea ceaiurilor medicinale [62].

Pe lângă metaboliții “primari”, cu rol major în menținerea viabilității plantei (proteine, glucide și lipide), sunt sintetizați și o serie de compuși care includ terpene, steroizi, antociani, antrachinone, fenoli și polifenoli, care aparțin metabolismului “secundar”. Metaboliții secundari sunt prezenți numai la anumite specii, adesea manifestând specificitate de organ sau de țesut și pot fi identificați doar într-un anumit stadiu al dezvoltării plantei, sau pot fi activați în perioadele de stres, cauzate, spre exemplu, de atacul unor microorganisme sau diminuarea nutrienților. Sinteza lor pare fără semnificație directă pentru celula sintetizatoare, dar poate fi decisivă pentru dezvoltarea și funcționarea organismului. Cu toate că sinteza acestora nu constituie o parte indispensabilă a programului expresiei genice și dezvoltării, metaboliții au o structură foarte diversificată și pot fi adesea incluși în procesele metabolice. În prezent, delimitarea între metabolismul primar și cel secundar este încă incertă, întrucât mulți dintre intermediarii metabolismului primar îndeplinesc roluri similare și în cadrul metabolismului secundar [80].

Terpenele (izoprenoide) sunt metaboliți secundari volatili, importanți pentru sinteza uleiurilor eterice, a insecticidelor, substanțelor bactericide și parfumurilor [109]. Cele mai multe terpene sunt de origine vegetală și conferă plantei caracteristicile sale organoleptice [202]. Grupa cuprinde peste 8000 de terpene și peste 30000 de substanțe înrudite numite terpenoide.

Importanța *S. sclarea* este marcată de prezența alcoolului natural din clasa diterpenelor lambdanice, cu valoare deosebită în parfumerie - sclareolul (lambd-13-en-8-ol difosfat) (Figura 1.3) componentul de care depinde nota parfumerică și însușirea de a fixa și înprospăta aroma altor substanțe aromatice [226].

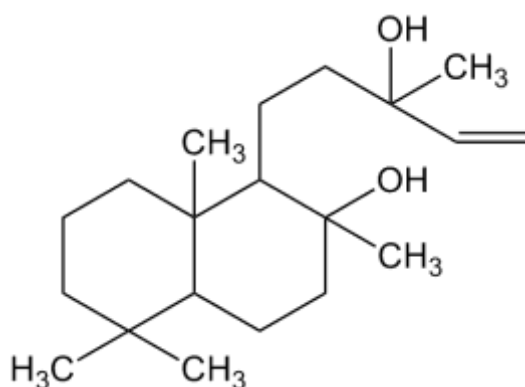


Fig. 1.3. Structura chimică a sclareolului.

Sclareolul este un compus natural important [226] conținut în cantități mari (circa 0,4-2,6%) la *S. sclarea*, de asemenea la speciile *Cistus reticus* L. (fam. *Cistaceae*), *Nicotiana*

glutinosa L. (fam. *Solanaceae*) și *Cleome spinosa* L. (fam. *Brassicaceae*) [60]. La specia *S. sclarea* a fost constatată și prezența izomerului sclareolului - 13-episclareol [83, 127]. De asemenea, în cantități semnificative s-au mai identificat oxidul de sclareol [127] și 13-episclareolul [154], compuși sintetizați din geranilgeranil pirofosfat - intermediar important în calea metabolică de sinteză a diterpenelor [266]. Cercetările recente demonstrează că procesul de cultivare a *S. sclarea* și conținutul înalt de sclareol fac ca specia să fie utilizată, în mod preponderent, pentru obținerea și izolarea compusului, toate acestea determinând și extinderea suprafețelor cultivate și inițierea de studii la nivel molecular-genetic, biochimic etc. Sclareolul obținut de la *S. sclarea* este folosit pe scară largă în procesul de prelucrare a produselor alimentare, precum și în procesul de producere a băuturilor alcoolice și nealcoolice [147].

Acizii polifenolcarboxilici (APC) formează un grup important de antioxidanți naturali din grupa polifenolilor, fiind principala acțiune a acestora fiind prevenirea formării radicalilor liberi și lupta împotriva îmbătrânirii [220, 215, 219]. Astfel, valoarea medicinală a APC este determinată de activitatea biologică, în special, proprietățile antioxidante, anti-inflamatoare, antivirale, antibacteriene, antidepresive etc. asigurând astfel, o gamă largă de aplicații de la industria alimentară până la industria cosmetică [272]. Plantele cu cel mai mare conținut al acestor compuși sunt: *Cynarae folium* (acid clorogenic, cinarină și derivații acesteia), *Cichorii radix et herba* (acid cicoric), *Echinaceae radix* (echinacozidă, acid feruin-tartric), *Verbasci folium et flores* (verbascozidă), *Plantaginis majoris folium* (plantamajozidă), *Rosmarinus officinalis* (acid rozmarinic), *Prunus virginiana* (acid cafeic) [262].

Acidul rozmarinic (AR) este un acid polifenolcarboxilic, fiind un ester al acidului cafeic și a acidului 3,4-dihidroxifenilactic (Figura 1.4, A), care reprezintă un compus de bază al plantelor din familia *Lamiaceae* (Labiata), astfel, acidul mai este numit și „acid labiatenic”.

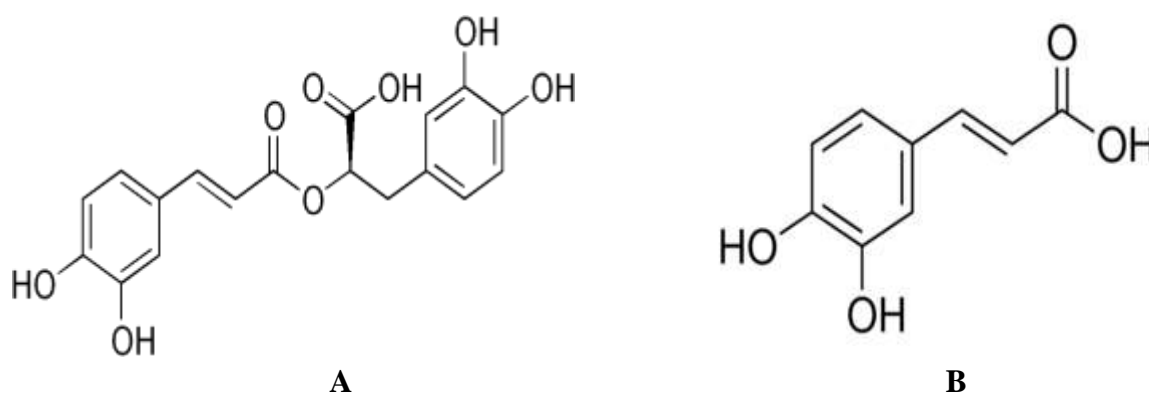


Fig. 1.4. Structura chimică a acidului rozmarinic și a acidului cafeic (B).

A fost identificat în concentrații mari la *Origanum vulgare*, *Rosmarinus officinalis*, *Ocimum basilicum*, *Satureja hortensis*, precum și la speciile genurilor *Salvia* și *Mentha*. Acidul este unul dintre compușii de aromă [212] și manifestă o activitate antioxidantă puternică, anihilând acțiunea radicalilor de oxid și peroxid care intervin în procesele infecțioase și de îmbătrânire [145]. Prezența AR în plantele medicinale are un efect benefic de promovare a sănătății, asigurând inclusiv o gamă largă de aplicații de la industria alimentară până la industria cosmetică [275]. În același timp, prezența compusului în masa vegetală de *S. sclarea* atestă faptul că există compuși cu o puternică acțiune antioxidantă, antifungică și antibacterică asemenea sclareolului. În plante, se presupune că acidul rozmarinic are un efect de apărare, acumulându-se constitutiv [212].

Acidul cafeic (acid 3,4-dihidroxi-cinamic) (Figura 1.4, B) [225] este un compus organic – hidroxicinamic, care se găsește în toate plantele, fiind un intermediar cheie în biosinteza ligninei [71]. În cantități sporite a fost identificat la *Prunus virginiana* (141 mg per 100 g), urmat de *Vaccinium vitis-idaea* (6 mg la 100 g), *Summer savory*, *Salvia* sp. și *Mentha longifolia* (20 mg la 100 g), în condimente: *Ceylon cinnamon* și *Pimpinella anisum* (22 mg la 100 g), în semințele de *Helianthus annuus* (8 mg la 100 de g)[225].

Flavonoidele (bioflavonoidele) (*flavus* - galben) sunt compuși glicozidici, care reprezintă o clasă importantă de metaboliți secundari ai plantelor, cunoscuți pentru proprietățile lor antioxidante [70]. La ora actuală, se cunosc aproximativ 5000 flavonoide naturale descoperite în regnul vegetal cu proprietăți antiinflamatoare, imunomodulatoare și anticancerigene [189]. Acest grup de substanțe a fost descris și clasificat conform structurii chimice în șase grupe mari [101, 208].

Rutozida (cvercetin-3-rutinozid, soforina, fitomelina, eldrina) (Figura 1.5, A) este un compus fenolic format între flavonol verticină și dizaharid rutinozidă (ramnoză și glucoză) cu proprietăți antioxidante, antibacteriene, antiinflamatoare, antifungice etc. [95],

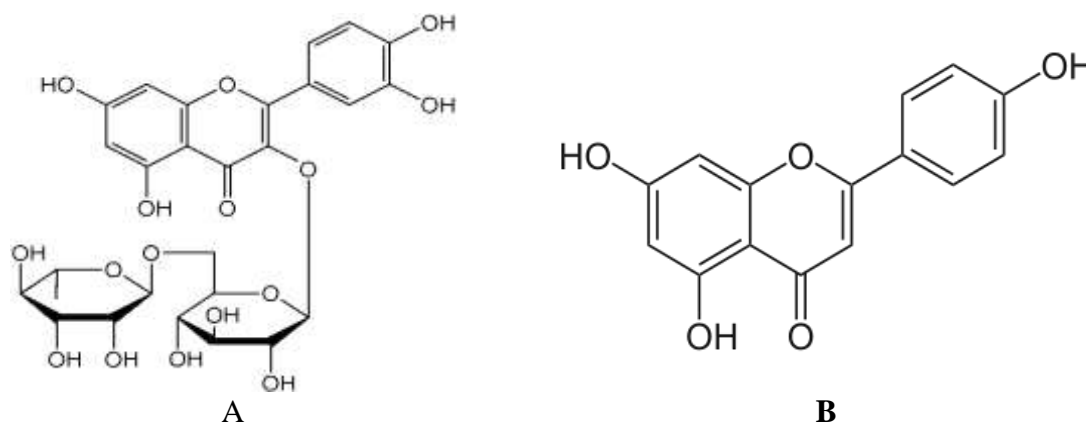


Fig. 1.5. Structura chimică a rutozidei (A) și a apigeninei (B).

Compusul este asociată, cu proprietăți de ameliorare a hiperglicemiei [70]. Denumirea substanței provine de la specia *Ruta graveolens*, la care compusul a fost identificat.

Apigenina (apigenol, spigenina, versulina) (Figura 1.5, B) este un flavonoid bioactiv cu proprietăți antioxidante și antiinflamatoare sporite, studiile recente au demonstrând un efect anticancerigen considerabil, precum și un efect de stimulare a sistemului imunitar [238].

Datorită unei toxicități mai scăzute și a influenței sale față de celulele canceroase apigenina se remarcă printr-un interes medical deosebit, în comparație cu alți compuși din același grup [128]. Apigenina este prezentă în fructe și legume [234], principalele surse fiind *Petroselinum crispum*, *Apium graveolens*, condimentele de *Rosmarinus officinalis*, *Origanum vulgare*, *Ocimum basilicum*, *Satureja hortensis*, *Coriandrum sativum*, *Matricaria chamomilla*, *Eugenia caryophyllata*, *Mentha piperita*, *Cynara scolymus* [180].

Proprietățile farmacologice ale speciei *S. sclarea*. Evaluarea potențialului farmaceutic al PMA reprezintă o direcție de perspectivă cu importanță economică [46]. Rezultatele cercetărilor efectuate de-a lungul timpului asupra PMA au demonstrat că valoarea terapeutică se datorează relației stabilite între structura chimică a substanțelor active identificate și extrase din materialul vegetal și acțiunea farmacodinamică pe care acestea o exercită asupra elementelor reactive ale organismului. Astfel, complexul de substanțe biologic active, ce se conțin în uleiul esențial extras din *S. sclarea*, conferă plantei proprietăți deosebite.

Specia manifestă o activitate antioxidantă înaltă împotriva radicalilor liberi [44]. Un șir de rezultate obținute *in vitro* relevă că în viitorul apropiat extractele de *S. sclarea* vor putea fi utilizate în tratarea bolilor neurodegenerative [201]. O altă proprietate importantă, caracteristică uleiului esențial de *S. sclarea* este acțiunea antibacterială și antifungică [151] datorată, în exclusivitate, prezenței linalil acetatului și linaloolului [91].

Printre alte efecte terapeutice se enumeră acțiunea: antiinflamatoare [188], antivirală [82], antiseptică, antileucoreică, astringentă, cicatrizantă, calmantă, antidepresivă, antispastică, diuretică, precum și capacitatea de reglare a activității glandelor endocrine. De rând cu aroma fină pe care o conferă, grație însușirii de a fixa, întări și îmbogăți mirosul altor substanțe aromatice naturale sau de proveniență sintetică, uleiul se utilizează în calitate de stabilizator [91].

În același timp, studiile au demonstrat că unul dintre efectele sclareolului obținut de la *S. sclarea*, este inducerea apoptozei celulelor leucemice [83, 84]. De rând cu mecanismul de inducere a apoptozei, se mai evidențiază acțiunea antitumorală, fiind stabilită influența sclareolului asupra modulării celulelor T reglatoare (supresoare ale celulelor T helper), care induc toleranța organismului față de autoantigeni. Posibilitatea de modulare a celulelor T

reglatoare facilitează transplantul de organe, inhibă dezvoltarea cancerului și a maladiilor autoimune [198]. Uleiul s-a dovedit a fi eficient în tratarea disfuncției endoteliale induse de stresul cronic în cadrul unui studiu efectuat pe șobolani. În același timp, se constată că uleiul de *S. sclarea* este eficace în prevenirea și tratamentul bolilor cardiovasculare determinate de expunerea la stres [264].

Uleiul din semințe, produs prin presare la rece, prezintă un șir de proprietăți farmacologice importante (Tabelul 1.1), astfel analog uleiului de *Olea europaea* uleiul din semințe de *S. sclarea* este o sursă importantă de Omega 3.

Tabelul 1.1.
Proprietăți farmacologice ale uleiului din semințele de *S. sclarea*

Compus	Activități farmacologice
Coenzima Q10	Antiviral, antioxidant, antiinflamator, antibacterial
Sclareol	Anticarcinogenic
Linalool și linalil acetat	Antinflamator, antifungal, antibacterial
Manol	Anticoagulant, remediu împotriva candidozelor
Oxidul de cariofilen	Antimicotic
Steroli	Reduce nivelul de colesterol
Vitamina E	Antioxidant

În ultimele decenii a fost înregistrată o creștere a gradului de conștientizare cu privire la importanța conservării biodiversității, inclusiv a biodiversității agricole. Accentul se pune pe înțelegerea distribuției și a variabilității genetice, încât, diversitatea să fie conservată cu rigoare și eficient utilizată. Principiu a stat la baza elaborării „Convenției privind biodiversitatea biologică și a Planului Global de Acțiune în Alimentație și Agricultură” elaborată de Organizația Națiunilor Unite [189]. Amploarea și distribuția diversității în cadrul speciilor de plante depind de cursul evolutiv, sistemul de reproducere, factorii ecologici și geografici, prin care a trecut specia dată, și deseori, de influența factorului uman. Astfel, studierea diversității genetice la nivel interpopulațional pune în evidență asocierea unor elemente ale genomului cu anumite capacități de adaptare a indivizilor la condițiile ecologice, climaterice, poziția geografică etc. [130].

Cercetarea diversității constituie unul dintre vectorii de interes pentru industria obținerii substanțelor fitochimice, atât pentru unele specii noi, cât și pentru plantele cu efect

fitoterapeutic bine cunoscut. O importanță deosebită în domeniu îl reprezintă studierea variabilității genetice în vederea asocierii cu markeri genetici a caracterelor fenotipice, precum producția de substanțe biologic active, oferind o serie de utilizări practice.

Generalizând datele prezentate în acest subcapitol, se atestă că majoritatea cercetărilor cu referire la PMA, inclusiv specia *S. sclarea*, se axează pe descrierea sistematică, morfologică, a efectelor farmacologice, utilizarea în medicina tradițională ș.a. Pentru valorificarea eficientă a PMA sunt necesare și studii ample referitoare la polimorfismul genetic, ceea ce ar permite obținerea unui randament înalt de materie primă și ulei esențial, precum și obținerea orientată a compușilor biochimici de calitate superioară, corelarea datelor moleculare cu descrierea efectelor farmacologice și altor proprietăți.

1.2. Studii privind ameliorarea *S. sclarea*

Cunoașterea particularităților de creștere și dezvoltare a PMA, în raport cu factorii de mediu, este esențială pentru asigurarea unor condiții de cultivare similare habitatelor naturale, minimalizându-se, astfel, intervenția asupra ecosistemelor naturale. Deși speciile de PMA sunt cunoscute și utilizate de milenii, actualmente suprafețele ocupate de speciile introduse în cultură sunt relativ mici, circa 95% din materia primă fiind încă recoltată din flora spontană [105]. Până în prezent au fost create soiuri, pentru un număr relativ redus de specii, iar ameliorarea PMA rămâne cu mult în urmă comparativ cu alte grupuri de plante.

Posibilitățile de obținere a semințelor de PMA sunt limitate, comparativ cu semințele de cereale și legume spre exemplu. În același timp, cerințele față de calitatea materiei prime vegetale au crescut considerabil. Originea semințelor trebuie să fie înregistrată chiar și în cazul în care, în mod tradițional, plantele sunt colectate din flora spontană. În acest context, crearea unor colecții oferă avantajul ameliorării genetice orientate în vederea producerii medicamentelor fitoterapeutice în corespundere cu toți indicii de calitate.

Se constată că pentru speciile de salvie (genul *Salvia*) în literatura de specialitate pot fi disponibile informații privind substanțele biologic active și referitor la rezultatele evaluărilor agronomice și morfologice. Însă, datele cu privire la capacitatea biosintetică se limitează practic numai la două specii *Salvia officinalis* și *Salvia triloba*. Astfel, având în vedere numărul mare de specii ale genului se atestă o lipsă de informații agronomice și morfologice comparative între diferite specii care sunt importante pentru caracterizarea speciilor, oferind o serie de aplicații la nivel economic [190].

Compoziția metaboliților secundari este influențată de diverși factori ecologici pe parcursul ciclului de dezvoltare a plantelor și chiar pe parcursul variații diurne.

Studierea caracterelor chimice prezintă un interes deosebit în cercetarea plantelor, iar în cazul PMA se acordă o atenție deosebită referitor la moștenirea și variabilitatea acestora. În același timp, pe lângă scopurile obișnuite de creștere - de ex, pentru a spori producția de plante, un rol important îl are și ameliorarea pentru calitatea uleiului conținut. Astfel ameliorarea nu se axează numai asupra trăsăturilor agronomice dar, de asemenea, asupra îmbunătățirii caracteristicilor fitochimice ale plantei, în special pentru a dezvolta o concentrație mare și uniformă a constituenților activi.

Dintre principalele specii de PMA, *S. sclarea* este o specie recent inclusă în cultură. Primele culturi, după cum prezintă Păun și colab., au fost realizate cu semințe recoltate din flora spontană, în unele țări limitrofe bazinului mediteranean (Franța, Spania și Italia) în care șerlaiul crește spontan [26]. Solul, relieful și condițiile climaterice din Republica Moldova sunt de asemenea favorabile pentru cultivarea speciei.

În țară, șerlaiul se cultivă, în funcție de soi sau populația locală, ca specie anuală, bianuală sau trianuală. Cele mai bune premergătoare sunt culturile care eliberează din timp terenul, îl lasă curat de buruieni, bine structurat și asigurat cu substanțe nutritive. Musteață și Makovskii [22] au propus următoarele rotații ale culturilor: rotația de 5 ani: 1 - grâu de toamnă; 2 - șerlai anul I; 3 - șerlai anul II; 4 - porumb boabe; 5 - cereale de primăvară; rotația de 9 ani: 1 - grâu de toamnă; 2-3 - șerlai, anul I și al II-lea; 4 - porumb boabe; 5 - cereale de toamnă; 6 - grâu de toamnă; 7-8 - șerlai, anul I și al II-lea; 9 - porumb boabe.

S. sclarea se înmulțește prin semințe semănate direct în câmp, având în vedere că toate soiurile reprezintă un amestec, în diferite proporții, de biotipuri anuale sau bianuale, cu înflorire în anul I și al II-lea sau numai în anul al II-lea, epoca de semănat se va stabili în funcție de biotipurile predominante. Astfel, se recomandă ca formele bianuale să fie semănate toamna timpuriu (septembrie-octombrie), pentru a răsări și forma de rozetă (8-10 frunze) încă din toamnă. În această fază, plantele ierneză foarte bine și dau producțiile scontate. În cazul în care, semănatul nu s-a realizat în perioada optimă, se va semăna „sub iarnă“ la începutul lunii noiembrie, înaintea înghețului, pentru ca plantele să răsară primăvara. Biotipurile anuale se pot semăna „sub iarnă“ sau în „ferestre“, în lunile ianuarie-februarie. În toate cazurile se va evita semănatul din primăvară, deoarece foarte multe plante nu vor forma inflorescențe. Totuși, pentru unele zone se recomandă semănatul în primăvară, ca plantă ascunsă în culturile de ovăz. În asemenea cazuri, după recoltarea plantei principale, până în toamnă plantele de

șerlai au posibilitatea să formeze o rozetă bogată, care poate rezista bine la condițiile de iernare.

Cantitatea de sămințe necesară pentru un hectar este de 7-12 kg, rezultate bune se obțin folosind 8-10 kg/ha. Acestea trebuie să posede o germinație minimă de 70-60% și o puritate fizică de minimum 95-90. Expunerea semințelor la soare contribuie nu numai la sporirea germinației, dar și la scurtarea repausului seminal, fenomen care se explică prin reducerea umidității acestora. Semințele păstrate în condiții corespunzătoare nu-și pierd germinația timp de 27 de luni.

Se cunosc numeroși dăunători atât specifici șerlaiului, cât și polifagi, care anual produc pagube imense, plantele atacate prezintă producții scăzute de ulei volatil și de sămințe.

În acest context, se constată că *S. sclarea* este atacată în primul rând de *Ovularia ocata* (Funk.) Sacc., *Septoria salviae* Pass var. *sclareae* Mass și *Erysiphe salviae* (Jacq) Blum. Acestea provoacă boli care se pot trata prin igiena culturală a câmpului. La apariția larvelor, pentru combatere se recomandă stropirea cu produse organofosforice și carbonice.

Un alt dăunător sunt larvele gărgăriței lăstarilor (*Ceuthorrhynchus topiarius* Germ) care apar în martie-aprilie și care distrug mugurii și lăstarii foarte tineri.

Țânțarul salviei (*Dasyneura salviae* Kieff.) este și el un dăunător, fiind descoperit relativ recent în culturile de șerlai. Acesta atacă în perioada butonizării, pătrunzând în muguri, unde larvele apărute distrug organele florale. La un atac puternic se întrerupe creșterea inflorescențelor, acestea se deformează și nu se mai deschid.

Un alt dăunător al *S. sclareae* este buha solanaceelor (*Chloridea peltigera* Schiff), care formează anual două generații și apare în masă în lunile mai-iunie. Depune ouă, individual, pe muguri și pe frunze, larvele apărute hrănindu-se cu acestea.

De la șerlai se recoltează inflorescențele, însă și alte organe vegetative conțin ulei volatil, dar în cantități mai mici. Frunzele și tulpinile analizate la sfârșitul perioadei de înflorire, conțin cantități reduse de ulei volatil, în jur de 10%. Acest ulei este de foarte slabă calitate.

Recoltarea în cultura mare a șerlaiului se începe în momentul formării complete a semințelor din primele 2-3 verticile inferioare ale inflorescențelor, înainte ca acestea să se brunifice. Procesul se face manual, cu secera, sau cu ajutorul unor mașini special adaptate. Există mașini agricole care pot tăia la o înălțime reglabilă între 20 și 75 cm, pe o lățime de lucru de 2,5 m și care au o productivitate de 1,2 ha/oră. Calitatea uleiului volatil obținut din inflorescențele recoltate mecanizat este întotdeauna inferioară celei recoltată în mod manual, deoarece în materia primă se găsesc foarte multe frunze.

Cercetările asupra conținutului de ulei esențial de *S. sclarea* [96, 99, 210] au permis constatarea faptului că deși compoziția este influențată în mod semnificativ de o serie de factori, etapele de recoltare și depozitare sunt primordiale [254].

Recoltatul se face când semințele din partea inferioară a inflorescenței principale se află în faza de coacere lapte-țeară. Stabilirea momentului optim de recoltare este o lucrare de mare responsabilitate și importanță pentru obținerea producțiilor planificate. Astfel, cercetările realizate cu privire la conținutul și compoziția uleiului extras, de la plantele din regiunea Kumaon, Himalaya, din inflorescențe colectate în cinci etape (înainte de coacerea semințelor, semințele verzi deschise, semințe semi maro, semințele maro și semințe zdrobitoare). Uleiul a fost izolat prin hidrodistilarea și analizat prin gaz cromatografie și gaz cromatografie cuplată cu mass cromatografie. Studiul a arătat că etapele de recoltare și depozitare (0-96 h) au un efect semnificativ asupra conținutului de ulei. Cantitatea a variat pe parcursul acestor etape în limitele 0,2-0,3%. Componentele principale ale uleiului au fost linalool (25,4-34,3%), acetat de linalil (27,9-48,6%), terpineol (4,03-5,2%) și sclareolul (1,02-1,6%). Depozitarea inflorescențelor la umbră timp de 96 ore înainte de distilare a redus semnificativ conținutul de ulei extras (0,3-0,1%). Prin urmare, se constată că recoltarea inflorescențelor în timpul etapei semințe semi maro și distilarea imediat după recoltare asigură obținerea a celor mai bune rezultate în ceea ce privește cantitatea, dar și calitatea uleiului esențial [255].

Inflorescențele de șerlai se distilează după tehnologia prelucrării lavandei, însă inflorescențele *S. sclarea*, fiind acoperite de glande oleifere mult mai fine, prin transport sau păstrare în condiții necorespunzătoare, pierd foarte ușor cea mai mare parte din conținutul în ulei volatil. Aceasta impune ca inflorescențele de șerlai să fie încărcate în mijloacele de transport concomitent cu recoltarea și să fie descărcate direct în cazanele de distilare. Distilatul care se scurge din vasul florentin conține aproximativ 0,04-0,05% ulei volatil, acesta se poate recupera prin trecerea acestuia peste cărbune activ. Uleiul volatil de *S. sclarea* se păstrează în vase emailate sau inoxidabile.

Hibridare intraspecifică este utilizată pe scară largă în ameliorarea genetică a speciilor din genul *Salvia*. Activitatea de hibridizare realizată de Elnir și colab. (1991) este de mare importanță în primul rând dintr-un punct de vedere teoretic. Chemotipuri sălbatice din Israel și Rusia au fost încrucișate cu cele din cultură pentru a studia modelul de moștenire și compoziția uleiului. În urma acestor cercetări s-a demonstrat că uleiul a prezentat o variabilitate sporită după proprietățile manifestate. Astfel, hibridizarea reciprocă a permis obținerea a două tipuri diferite de hibrizi. Primul se caracterizează prin prezența linalolului

(22,0%), acetatului de geranil (22,5%) și geraniolului (22%). Cel de al doilea tip – prin prezența acetatului de linalil (12,6%) și geraniolului (7,2%). În plus, cele mai multe componente ale uleiului esențial al hibridilor au prezentat caractere intermediare față de cele ale părinților. Cu toate acestea, se pare, că în acest caz, variabilitatea chimică intraspecifică existentă nu pot fi utilizată în mod eficient pentru stabilirea soiurilor speciale, deoarece hibridii s-au dovedit a fi complet sterili, în ciuda meiozei normale observate [96].

Rezultate practice considerabile au fost realizate în urma hibridizării liniilor de șerlai în Ucraina și Bulgaria. Pentru a obține soiuri cu productivitate ridicată, hibridizarea a fost începută la începutul anilor '60 simultan în ambele țări. În cadrul programului de creștere a soiurilor locale în Bulgaria, au fost hibridizate cu cele mai bune tipuri din Ucraina pentru a obține descendenți cu productivitate sporită și rezistență la îngheț [139]. Ca rezultat al procesului îndelungat de selecție au fost create 4 soiuri: "Lazour", "Slunchev Luch", "Roza" și "Zarya", care au depășit populațiile standard privind conținutul de ulei extras (care a variat în limitele 0,20-0,24%).

În Ucraina obiectivul principal al ameliorării speciei este obținerea soiurilor cu productivitate ridicată, datorită ciclurilor de dezvoltare (anuală și bienală) și a materialului vegetal cu rezistență la *Thielaviopsis basicola* (Bek. et Br. Ferraris), prin hibridare intraspecifică utilizând metoda de castrare. Astfel, au fost create "Crimsky odnoletniy" și "Crimsky ultraskorospely" [282].

S. sclarea este o specie alogamă, astfel este bine cunoscut procesul de consangvinizare ca metodă de creare a materialului inițial de ameliorare. Se consideră că heterozigoția populației alogame micșorează variabilitatea până la o valoare medie necesară pentru adaptarea populației la condițiile pedoclimatice locale. Un rol important în cercetările efectuate de Goncariuc și colab. este crearea liniilor consangvinizate (S_1 - S_{15}) [116]. Din unul și același soi, formă inițială, au fost obținute, de asemenea, linii care înfloresc și se coc concomitent cu soiul sau forma de la care provin, dar și linii cu perioada de vegetație mai scurtă sau mai lungă.

Astfel, amelioratorii IGFP au creat linii cu particularități noi, față de soiurile sau formele de la care proveneau, precum și față de liniile S_2 - S_3 , care prezintă un grad mai ridicat de rezistență la iernare, cu inflorescențe foarte compacte. Din formele inițiale, tipice de doi ani, care nu formează tulpini florale în primul an de vegetație, s-au obținut linii la care 60-80% din plante înfloresc totuși în primul an de vegetație. Frecvența apariției liniilor cu caractere noi, valoroase a fost mai mare la soiul Moldovenesc 69 [116]. În cazul consangvinizării, declanșarea sau lipsa procesului de degenerare, apariția unor caractere noi și

gradul lor de manifestare, au loc în funcție de genotipul formelor inițiale. Includerea liniilor performante în schemele de hibridare a contribuit la crearea hibrizilor simpli, treiliniari, dubli, în trepte, a soiurilor de proveniență hibridă care garantează producția de materie primă și ulei esențial din primul an [14].

De asemenea, prin intermediul consangvinizării au fost create linii cu productivitate înaltă. În acest context, Vlasova și colab. (1986) a produs linii diferite cu caractere morfologice de interes și cu producție înaltă, astfel, cantitatea de ulei a crescut până la 2%. Aceste linii s-au dovedit a fi utile pentru alte metode de ameliorare, cum ar fi selectarea simplă sau soiuri sintetice. Consangvinitatea combinată cu selecția multiplă au permis obținerea unor rezultate practice. Astel, a fost creat un nou soi cu maturitate târzie sub numele de "Crinsky pozdny" introdus pe scară largă în cultură [283].

Mekhraz și colab. (1988) printr-un tratament de 24 ore cu colchicină au obținut un nou soi de *S. sclarea* [177], s-a dovedit astfel că inducerea formelor mutante și poliploide poate contribui la îmbunătățirea fondului genetic al speciei. În același timp, rezultatele lui Savchenko și colab. (1990) au permis caracterizarea și selectarea formelor în baza formei frunze, culorii, suprafeței și numărul de pori de germinare în granulele de polen chiar înainte de înflorire [223].

Populațiile de *S. sclarea* din flora spontană din Croația și Israel au fost studiate în aspectul estimării variabilității, fiind determinate un șir de aspecte precum: variabilitatea fenotipică, greutatea inflorescențelor, randamentul inflorescenței, randamentul de ulei extras. Aceste studii au permis corelarea randamentului inflorescenței cu randamentul de ulei esențial, corelarea greutății inflorescenței cu randamentul inflorescență, corelarea greutății inflorescență cu lungimea inflorescenței, precum și corelarea inflorescențelor alungite cu un conținut mai mare de ulei.

În Israel și Croația, populațiile ajung la înflorire deplină în perioada sfârșitului lunii mai-începutul lunii iunie, ceea ce corespunde, în medie, până la 397,5 zile după plantare. Acetatul de linalil, linaloolul, α -terpineolul, sclareolul și acetatul de geranil sunt cele mai importante componente din uleiul esențial. Cu toate acestea, diferențele evidențiate în compoziția uleiului sugerează că eforturile de creștere ar trebui să se concentreze separat pentru fiecare sistem de producție agricolă [284].

În Republica Moldova, obiectivul principal în ameliorarea speciei constă în sporirea producției globale de ulei, precum și obținerea uleiului cu concentrații sporite de componenți principali, precum acetatul de linalil, acetatul de linalool, sclareolul [12]. Investigațiile efectuate în țară se axează pe elaborarea de hibrizi și soiuri noi cu productivitate sporită

(materie primă) și ulei extras, cu termeni de maturizare tehnică diferiți, adaptate la condițiile pedoclimatice ale Moldovei.

În urma cercetărilor realizate în cadrul Laboratorului Plante aromatice și medicinale, IGFPP, alegerea formelor parentale pentru hibridare s-a efectuat în baza unui șir de principii precum: particularitățile fiziologice și biochimice, perioada de vegetație, indicii productivității, înflorirea în primul an de vegetație etc. [113, 114]. Astfel, rezultatele obținute de Gonceariuc și colab, demonstrează manifestarea efectului heterozis la următoarele caractere cantitative: talia plantei, lungimea inflorescenței, numărul de ramificații de gradul I și II. Cercetările au evidențiat că majoritatea hibrizilor simpli în prima generație manifestă heterozis la caracterele cantitative de care depinde productivitatea, fapt ce determină și heterozisul privind conținutul de ulei. Cel mai înalt efect al efectului a fost descris la următoarele caracterele: numărul de ramificații (59-106%) și la conținutul de ulei esențial (până la 123,6%).

Manifestarea heterozisului în F_2-F_n prezintă un interes sporit. Spre deosebire de heterozisul instabil, care se manifestă numai în prima generație (F_1) și își pierde amploarea în generațiile ce urmează, heterozisul transmisibil, constant se consolidează în sistemele genetice ale organismului și devine o valoare a evoluției [6, 7, 8]. Astfel, în cadrul IGFPP, au fost create populații hibride la care producerea semințelor este la fel ca la soiurile obținute, iar productivitatea de materie primă este ridicată [115, 119, 120, 122]. În acest context, din formă instabilă heterozisul a devenit transmisibil, fixat, constant [11], fiind manifestat în toate generațiile următoare. În același timp, în baza unor hibrizi simpli heterotici au fost create populații hibride, care au stat la baza elaborării soiurilor de proveniență hibridă omologate până în prezent în țara noastră. Astfel, la nivel local sunt omologate șase soiuri: Ambra Plus, Balsam, Dacia 50, Dacia 99, Nataly Clary, Victor [118, 123].

În procesul de creare a soiurilor performante de proveniență hibridă un rol important îl au hibrizii treiliniari, dubli și în trepte la aceștia în F_1 efectul heterozisului în raport cu cea mai bună formă parentală, la caracterul lungimea inflorescenței, are valori de până la +37%, iar la producția de ulei esențial – până la +93%. La unii din acești hibrizi efectul este și mai mare pentru conținutul de ulei, fiind în unele combinații hibride de peste +120%. După manifestarea efectului la principalii indici ai productivității în F_2-F_n hibrizii treiliniari, dubli și în trepte se împart, ca și hibrizii simpli, în trei grupe [12]:

- hibrizi care își păstrează heterozisul în F_2-F_n în raport cu ambele forme parentale (forma transmisibil);
- hibrizi la care efectul heterozisului crește în F_2-F_n în raport cu formele parentale;

- hibrizi la care efectul heterozisului în F_2 - F_n scade considerabil sau variază de la indici negativi în F_2 - F_3 , la indici pozitivi în F_4 - F_n în raport cu una sau cu ambele forme parentale.

Înlăturarea inflorescențelor masculine pentru creșterea efectivă a heterozisului la *S. sclarea*, nu este o metodă rentabilă din punct de vedere economic, însă un șir de studii au stat la baza elaborării hibrizilor [30], precum și crearea de soiurilor de proveniență hibridă cu productivitate sporită, calitate superioară a uleiului esențial, cu termeni de coacere diferiți, rezistenți la iernare, secetă și boli [13, 121]. Totodată, în producția de semințe pe scară largă sunt necesari omologii masculini sterili [183].

Cel mai timpuriu soi, creat de Goncariuc și colab, este Balsam care reprezintă un hibrid complex în trepte în generația F_{10} . Acesta a fost testat în culturi comparative de concurs (TCCC) și permite obținerea a peste 21 t/ha de inflorescențe și, respectiv, 79,5 kg/ha de ulei esențial, în trei ani de exploatare a plantației.

Concentrația componentilor care determină calitatea uleiului esențial la cele mai bune soiuri create în IGFPP este una ridicată: acetat de linalil 65-70%, în unii ani fiind de 75-76%, sclareol - 6,0-12,0%. Dintr-o tonă de inflorescențe sau deșeurii de la fabricarea uleiului esențial se pot obține de la 7-8 până la 8-10 kg de concret în funcție de performanța instalației de extracție și respectarea tehnologiei de procesare. Calitatea concretului fabricat este superioară, deoarece potențialul concentrației sclareolului este de 68-70%.

Generalizând, rezultatele obținute la nivel local cu referire la specia *S. sclarea*, se constată că obiectivul major este obținerea de forme cu conținut înalt în ulei esențial și selecția unor forme caracteristice prin predominanța unui anumit component al uleiului esențial (spre exemplu, sclareol). Cu toate că *S. sclarea* reprezintă un obiect valoros de studiu, ameliorarea în aspectul sporirii productivității este destul de dificilă, iar numeroase informații rămân a fi neelucidate, spre exemplu, aspectele genetico-moleculare, precum și sinteza metaboliților secundari și mecanismele de declanșare a metabolismului secundar caracteristic speciei. Practic lipsesc cercetările asupra variabilității molecular-genetice a germoplasmei de *S. sclarea* din Republica Moldova.

1.3. Biodiversitatea și metodele de determinare a variabilității genetice

Biodiversitatea reprezintă fundamentul existenței organismelor vii, care cuprinde diversitatea la nivel de ecosistem - biodiversitatea ecologică, diversitatea între specii - biodiversitatea interspecifică și în cadrul speciilor - biodiversitatea intraspecifică [108].

Biodiversitatea intraspecifică constituie elementul cheie al evoluției organismelor vii [103] și reprezintă variabilitatea (intrapopulațională, individuală) existentă în interiorul unei specii pe întregul areal de răspândire.

Diversitatea genetică intrapopulațională sau variabilitatea indivizilor dintr-o populație este reflectată prin polimorfismul genetic [156], care reprezintă proprietatea organismelor ce aparțin aceleiași specii, de a manifesta aspecte diferite, care se referă la caracterele morfologice, fiziologice, ecologice, comportamentale etc. [165]. Variația genetică la nivel populațional este determinată de numărul și frecvența alelelor fiecărui locus și de măsura în care alelele se organizează în combinații neîntâmplătoare. Fenomenul se datorează varietății de alele și combinațiilor acestora, exprimate în diferențe morfologice (de ex., culoarea, forma florii la plante), biochimice (de ex., structura proteinelor, proprietățile izoenzimelor etc.) și moleculare (polimorfisme ale secvențelor de nucleotide) [78].

Pentru a conferi mai multă precizie termenului de „polimorfism”, în prezent, în această noțiune se include numai polimorfismul la nivel genetic [219]. Variația genotipică are o importanță deosebită, asigurând apariția caracterelor noi și respectiv a unor posibilități largi de adaptare la condiții de mediu și de viață la descendenți, contribuind, implicit, la supraviețuirea organismelor. Datorită acestui tip de variabilitate, prin metode empirice, a fost posibil de a obține un număr mare de soiuri tradiționale sau locale [59].

Mecanismele principale ale diversității genetice sunt determinate de:

- modificările materialului ereditar (mutații), care apar în rezultatul erorilor de replicații sau acțiunii diferiților factori mutageni - fizici, chimici sau biologici [185];

- capacitatea de recombinare a moleculelor de ADN și, ca rezultat, apariția unor combinații noi de gene, respectiv, de caractere [264];

- recombinarea intracromozomială (crossing-over) în cursul diviziunii reducționale (prima diviziune meiotică). Drept urmare a schimbului de segmente dintre cromatidele nesurori ale cromozomilor omologi, apar cromatide recombinante cu combinații noi de gene, ceea ce determină eterogenitatea populațiilor [1, 69].

Diversitatea organismelor poate fi detectată cu ajutorul markerilor genetici (morfologici, biochimici și moleculari). Metodele disponibile pentru studierea diversității organismelor permit estimarea polimorfismului la diverse nivele de organizare a materiei vii, care fac posibilă localizarea și vizualizarea directă, la nivel molecular, atât a genelor responsabile de fenogeneza unui anumit caracter calitativ (monogenic), cât și proteinelor, metaboliților secundari etc. Toate acestea prezintă o importanță deosebită în procesul de selecție a formelor

înalt productive cu alternative rentabile în obținerea de materii prime deficitare în domenii economice, cu valoare în aplicațiile științifice, tehnologice și comerciale [75].

Astfel, în procesul de ameliorare a plantelor, rezultatele cercetărilor comparative asupra variației la nivel de fenotip, chemotip și genom permit realizarea unei descrieri complexe a variabilității caracterelor [152]. Selecția modernă, în aspectul exploatării potențialului genetic în ontogeneză, impune integrarea datelor la diverse nivele de organizare a materiei vii [200], în contextul în care potențialul genetic, explică variațiile organismelor.

Marcarea morfologică se realizează, de obicei, prin identificarea genelor ce determină manifestarea vizuală a caracterelor calitative cum ar fi culoarea florii, forma seminței, talia plantei, acestea sunt limitate ca număr, fiind influențate neesențial de mediul de cultură [32].

Marcarea biochimică se axează preponderant pe analiza proteinelor de rezervă și permite cercetarea polimorfismului proteic cu estimarea procentului polimorfic și gradului de heterozigoție [27, 29, 32, 219].

Un alt tip de marcarea este cea moleculară, care permite identificarea regiunilor de ADN, inclusiv și a celor necodificatoare și oferă posibilitatea analizei oricărui țesut, indiferent de stadiul de dezvoltare al organismului. Acești markeri relevă fidel variabilitatea genetică, nefiind supuși influențelor mediului [78].

Descoperirea markerilor moleculari și utilizarea lor pentru detectarea și exploatarea polimorfismului ADN reprezintă una din cele mai semnificative realizări în domeniul geneticii moleculare. Utilizarea succesiunilor polimorfe de ADN în calitate de sisteme de marcarea, create pe bază de PCR, a rezolvat problema impregnării genomului plantelor și a permis marcarea, regiunilor ADN de interes.

Astfel, progresele înregistrate în ultimii ani în domeniul biologiei moleculare și al manipularilor genetice garantează obținerea unor succese remarcabile în aprecierea diversității genetice, selectării formelor parentale și a caracterelor calitative și cantitative [104].

Selecția asistată de markeri moleculari (MAS - Marker Assisted Selection) a determinat o ascensiune puternică a eficienței programelor de ameliorare a PMA, oferind o aplicare practică în vederea identificării speciilor, descrierii taxonomice, realizării hărților genetice, clonării unor gene de interes, realizării studiilor filogenetice etc. [102]. Cei mai utilizați markeri sunt cei bazați pe analiza ADN deoarece sunt prezenți la toate organismele vii. Aceștia pot fi strâns legați de un mare număr de trăsături agronomice, spre exemplu, rezistența la boli etc. [228].

Diversitatea genetică în cadrul PMA poate fi corelată cu diferențe calitative și cantitative a profilelor metabolice. Markerii genetici linkați cu acestea pot fi aplicate pentru a

selecta genotipurile mai performante. Tehnicile moleculare utilizate în evidențierea variabilității genetice oferă perspective promițătoare pentru avansarea cunoștințelor în domeniul biologiei vegetale și marchează un salt calitativ asigurat de perfecționarea metodelor de investigare, cristalizându-se aspectul molecular al ameliorării, fiziologiei plantelor și al științelor agricole [179].

În ultimii 50 de ani metodele moleculare au fost aplicate pe scară largă pentru caracterizarea diversității genetice a plantelor [74]. Astfel, pentru evidențierea polimorfismului genetic și a variabilității plantelor se utilizează o serie de metode bazate pe PCR (Tabelul 1.2).

Tabelul 1.2.
Tehnici moleculare bazate pe markerii PCR

Metodă		Referință
RAPD	<i>Random amplified polymorphic DNA</i> - analiza ADN-lui polimorf amplificat	Williams et al., 1990 [258]
AFLP	<i>Amplified fragment length polymorphism</i> - polimorfismul lungimii fragmentelor amplificate	Vos et al., 1995 [248]
RFLP	<i>Restriction fragment length polymorphism</i> - polimorfismul lungimii fragmentelor de restricție	Botstein et al., 1980 [45]
SCAR	<i>Sequence-characterized amplified region</i> - caracterizarea secvenței regiunii amplificate	Agustí et al., 1999 [35]
SSR	<i>Simple sequence repeat</i> - analiza markerilor microsateliți	Akkaya et al., 1982 [36]
ISSR	<i>Inter simple sequence repeat</i> - analiza inter secvențelor repetitive	Godwin et al., 1997 [103]

În prezent, disponibilitatea tehnologiilor Next Generation Sequencing (NGS) conduce la o revoluție în domeniul ameliorării plantelor. Aceasta permite secvențierea masă a genomurilor și transcriptomurilor. Împreună cu numărul tot mai mare de genomuri de plante secvențiate și o mai bună înțelegere a proceselor biochimice care duc la producerea de produse naturale din PMA, a devenit posibilă identificarea relațiilor directe între nivelul unui compus de interes și a variației genetice a componentelor implicate în calea metabolică.

Plantele medicinale și aromatice sunt mai puțin studiate din perspectiva genomică și

genetico-moleculară comparativ cu plantele model și culturile agricole tradiționale. Totuși există unele cercetări pentru selectarea și cartografierea genelor de interes, care reflectă utilizarea tehnicilor RAPD și AFLP, bazate pe utilizarea fragmentelor aleatorii și metodele RFLP și SSR, care permit analiza genelor în baza primerilor specifici, [228].

Astfel, studiul profilurilor RAPD [49] la 11 specii de PMA (*Andrachne telephioides*, *Zilla spinosa*, *Caylusea hexagyna*, *Achillea fragrantissima*, *Lycium shawii*, *Moricandia sinaica*, *Rumex vesicarius*, *Bassia eriophora*, *Zygophyllum propinquum subsp migahidii*, *Withania somnifera*, *Sonchus oleraceus* etc.) a permis stabilirea relațiilor de rudenie dintre acestea [43]. A fost constatată eficiența utilizării metodei menționate, inclusiv, pentru evaluarea diversității genetice (intraspecifice) în cadrul unor specii de PMA [77, 276], inclusiv *Panax ginseng* [253], *Astragalus microcephalus* [176], *Ocimum basilicum* L. [174], *Embelica ribes* [125], *Aloe vera* [251] etc. De asemenea, au fost descrise relațiile de filogenie dintre speciile *Echinacea purpurea*, *Echinacea angustifolia*, *Echinacea pallida* [218], *Glycyrrhiza glabra*, *Abrus precatorius* [222], precum și pentru unii reprezentanți ai genului *Chaenomeles* [51].

Sultan [243] a studiat specia *Podophyllum hexandrum* din regiunile de latitudine mare din Himalaya, relevând o diversitate înaltă, dependentă de condițiile geografice și climatice. Similar, a fost evaluată diversitatea genetică la unele specii de plante pe cale de dispariție [253], fiind analizate un șir de plantele din ierbar [231].

Pentru identificarea diferențelor genetice la *Hypericum perforatum* [211], *Swertia perennis* [182], *Plectranthus* sp. [207], *Echinacea* sp. [221] etc. a fost aplicată și metoda AFLP. De asemenea această tehnică a fost utilizată pentru studierea relațiilor sistematice și taxonomice a speciilor *Panax* sp. [129, 143], estimarea polimorfismului genetic la trei specii din genul *Zingiber* (*Z. officinale*, *Z. montanum* și *Z. zerumbet*) [110], precum și diversitatea unor specii de *Actaea* spp. (*A. cordifolia*, *A. pachypoda*, *A. podocarpa* și *A. racemosa*) [279].

Descrierea relațiilor de rudenie dintre șase specii: *Desmodium giganteum*, *Marmelos aegle*, *Solanum xanthocarpum*, *Solanum indicum*, *Tribulus terrestris* și *Oroxylum indicum*, evaluarea diversității genetice în cadrul speciei *Panax ginseng* [253], evaluarea diversității între *Boerhavia diffusa* și speciile *Trianthema portulacastrum* și *Trianthema monogyna* [53], precum și diferențierea speciei *Angelica sinensis* de alte șapte specii din genul *Angelica* [100] au fost realizate utilizând metoda RFLP [54].

Analiza SCAR [271] a permis certificarea unui șir de specii de plante medicinale și aromatice inclusiv, *Bacopa monnieri* [266], *Ophiopogon japonicus* [158], *Lonicera japonica* [105]. În alte studii markerii SCAR s-au utilizat pentru diferențierea speciilor *Aconitum*

heterophyllum și *Cyperus rotundus* [227], *Phyllanthus amarus*, *Phyllanthus fraternus*, *Phyllanthus debilis* și *Phyllanthus urinaria* [247].

Relațiile filogenetice dintre speciile de *Anthemideae*, *Asteraceae*, *Capsicum* [232], *Juniperus* [181], *Rhododendron* [79] au fost evaluate, prin aplicarea metodei SSR, iar identificarea specifică a *Rheum officinale*, *R. palmatum*, *R. tanguticum* [262] a fost posibilă grație analizei ISSR [112]. De asemenea, prin metoda ISSR au fost autentificate și speciile *Swertia spp.* (*S. angustifolia*, *S. chirayita*, *S. cordata*, *S. densifolia*, *S. lurida*, *S. ciliate*, *S. paniculata*, *S. alata*, *S. bimaculata*) [244].

Analiza variabilității genetice la *S. sclarea* cu utilizarea markerilor SSR, cu referire la transcriptom, a permis identificarea a 3446 secvențe SSR (16,8% din 16142 secvențe asamblate). De menționat că multe dintre secvențele SSR identificate au fost asociate cu secvențe unice care codifică enzime implicate în metabolismul fenilpropanoizilor și al terpenoidelor. Spre exemplu, au fost detectate secvențe SSR pentru fenilalanin amonia-liaza, 4-cumarat-CoA ligaza, hidroxifenilpiruvat dioxigenaza, flavonoid 3'-hidroxilaza, cinamil alcool dehidrogenaza, lignan glicosiltransferaza – enzimă importantă în calea metabolică a fenilpropanoizilor. Au fost găsite secvențe asociate cu genele din metabolismul 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfatului (1-deoxi-D-xiluloza 5-fosfat sintaza, 1-deoxi-D-xiluloza 5-fosfat reductoizomeraza, 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfat citidilil transferaza, 4-hidroxi-3-metilbut-2-enil difosfat sintaza), genele din calea metabolică a acidului mevalonic și un șir de gene implicate în sinteza terpenoidelor (isopentenil difosfat izomeraza, citocrom P450 71D18, pinen sintaza, squalene sintaza, squalen monoxigenaza) [132, 133].

Un progres remarcabil este utilizarea metodei Real-Time PCR pentru analiza expresiei genelor de interes [191], astfel fiind realizate analize asupra unor specii importante de PMA, precum *Rhazya stricta*, *Fagonia indica*, *Parthenium hysterophorus*, *Whithania coagulans*, *Capparis decidua*, *Verbena officinalis*, *Aerva javanica* etc. Evaluarea comparativă a expresiei a 25 de gene asociate cu acumularea carotenoizilor [160] a pus în evidență genele implicate în biosinteza flavonolului la *Lycium barbarum* și *Lycium ruthenicum*.

În contextul studiului planului filogenetic și a barcodajului plantelor se utilizează metodele bazate pe analiza genomului pentru autentificarea plantelor medicinale [150, 203, 239]. Locii genetici comuni utilizați pentru autentificarea plantelor medicinale includ regiunile ITS (*internal transcribed spacers*) [40], care separă regiunile codificatoare a genelor nucleare 5,8S, 18S și 26S [41, 47] și spațiile intergenice care separă multiplele copii repetate ale genei nucleare 5S ARNr [137]. În același timp unii loci genetici utilizați în studiile filogenetice includ gene cloroplastice [203], ca de exemplu *atpF*, *matK*, *rbcL*, *rpoB* și *rpoC1*,

la fel intronul genei *trnL* și spațiile intergenice dintre genele *trnC-trnD*, *trnL-trnF*, *trnH-psbA* și *psbK-psbKI*.

Scopul principal urmărit în procesul de ameliorare constă în obținerea de soiuri și hibrizi noi, ce posedă caractere superioare față de genotipurile deja utilizate în cultură. Tehnicile contemporane contribuie la reducerea perioadei de timp pentru crearea liniilor consangvinizate și a altor forme homozigote, chiar și la crearea unor soiuri noi [10, 24]. Realizarea acestor deziderate este posibilă numai dacă amelioratorii urmăresc obiective foarte bine definite, iar tehnicile sunt alese cu mare atenție [24], individual pentru fiecare specie. Astfel, se atestă că posibilitățile oferite de metodele moderne în evidențierea variabilității se află la o nouă etapă de dezvoltare.

Generalizând datele privind studiul integrativ al plantelor medicinale și aromatice, se relevă că cunoașterea diversității intraspecifice prezintă un interes important pentru identificarea, ameliorarea și introducerea în cultură a noi forme cu caractere dorite. În cadrul cercetării literaturii de specialitate se constată necesitatea realizării studiilor molecular-genetice și biochimice pentru *S. sclarea*, ca completare a rezultatelor obținute în câmp și în laborator.

1.4. Concluzii capitoul 1

1. Combinarea informațiilor genetice, moleculare și biochimice cu cele fenotipice devine primordială pentru compararea diversității genetice intra- și interspecifice prin descrierea relației *genă-caracter-fenotip*.

2. Contextul actual al cercetărilor pe plan mondial privind specia *S. sclarea* se axează, în special, pe studiile botanice, morfologice și biochimice și mai puțin pe cele genético-moleculare cu referire la structura genetică, gene de interes, variabilitate și polimorfism.

3. Investigațiile privind specia *S. Sclarea*, din Republica Moldova sunt focusate preponderent pe ameliorare, evaluarea fitochimică, perfecționarea tehnologiei de cultivare și a măsurilor agro-tehnice, în timp ce cercetările asupra variabilității molecular-genetice sunt destul de limitate, studiul genetic fiind o noutate științifică în cercetările genetice din țară.

4. Corelarea rezultatelor obținute de colectivul de amelioratori din cadrul IGFPP cu noi date molecular-genetice poate contribui la facilitarea procesului de selectare a genotipurilor cu caractere economic valoroase.

Astfel, 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 se axează pe soluționarea următoarelor obiective:

- 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.

2. OBIECTUL ȘI METODELE DE CERCETARE

Cercetările privind estimarea variabilității la *S. sclarea* au fost realizate cu utilizarea metodelor genotico-moleculare, biochimice (cromatografice și spectrofotometrice), precum și aplicarea metodelor matematice de prelucrare statistică a datelor.

2.1. Obiectul de studiu

În calitate de obiect de studiu au fost utilizate 28 genotipuri de *S. sclarea* a Laboratorului Plante medicinale și aromatice, IGFPP, care au inclus 15 forme parentale și 13 hibridi, formând 13 grupuri genetice (Tabelul 2.1) [18].

Tabelul 2.1.

Genotipurile de *S. sclarea* cercetate

<i>Forma</i> ♀*		<i>Forma</i> ♂*		<i>Hibrid</i> F ₁₋₂ **	
P1	<i>S. s. Turkmen/N</i> S ₇	P14	(<i>K-36 x 0-41</i>) F ₂ x (<i>0-19</i>) F ₁ x (<i>0-22</i>) B ₄ x (<i>L-15</i>) F ₈	H1	[<i>S. s. Turkmen/N</i> S ₇ x (<i>K-36 x 0-41</i>) F ₂ x (<i>0-19</i>) F ₁ x (<i>0-22</i>) B ₄ x (<i>L-15</i>) F ₈] F ₁
P1	<i>S. s. Turkmen/N</i> S ₇	P2	(<i>S-1122 528 S₃ x K-50</i>) F ₁ x (<i>0-48</i>) F ₆	H2	[<i>S. s. Turkmen/N</i> S ₇ x (<i>S-1122 528 S₃ x K-50</i>) F ₁ x (<i>0-48</i>) F ₆] F ₁
P1	<i>S. s. Turkmen/N</i> S ₇	P4	(<i>Rubin x S1122 9S₃</i>) F ₁ x (<i>0-56 x V-24</i>) F ₁	H3	[<i>S. s. Turkmen/N</i> S ₇ x (<i>Rubin x S1122 9S₃</i>) F ₁ x (<i>0-56 x V-24</i>) F ₁] F ₁
P3	(<i>V-24-86 809 S₃ x 0-33 S₆</i>) F ₇	P4	(<i>Rubin x S1122 9S₃</i>) F ₁ x (<i>0-56 x V-24</i>) F ₁	H4	[(<i>V-24-86 809 S₃ x 0-33 S₆</i>) F ₇ x (<i>Rubin x S1122 9S₃</i>) F ₁ x (<i>0-56 x V-24</i>) F ₁] F ₁
P3	(<i>V-24-86 809 S₃ x 0-33 S₆</i>) F ₇	P8	(<i>S1122 528 S₃ x S. s. TianShan/sud</i>) F ₅ x (<i>S. s. Tian-Shan/sud</i>) B ₅	H5	[(<i>V-24-86 809 S₃ x 0-33 S₆</i>) F ₇ x (<i>S1122 528 S₃ x S. s. Tian-Shan/sud</i>) F ₅ x (<i>S. s. Tian-Shan/sud</i>) B ₅] F ₁
P3	(<i>V-24-86 809 S₃ x 0-33 S₆</i>) F ₇	P10	<i>Cr. p. 160 S₁₁</i>	H6	[(<i>V-24-86 809 S₃ x 0-33 S₆</i>) F ₇ x <i>Cr. p. 160 S₁₁</i>] F ₁
P15	<i>M-69 655 S₉</i>	P11	(<i>S-1122 528 S₃ x (Rubin x S-786)</i>) F ₁ x (<i>0-33 S₃ x L-15</i>) F ₇	H7	23 - [<i>M-69 655 S₉ x (S-1122 528 S₃ x (Rubin x S-786)</i>) F ₁ x (<i>0-33 S₃ x L-15</i>) F ₇] F ₁
P15	<i>M-69 655 S₉</i>	P14	(<i>K-36 x 0-41</i>) F ₂₀₋₁₉ F ₁ x (<i>L-15</i>) B ₅	H8	[<i>M-69 655 S₉ x (K-36 x 0-41)</i> F ₂₀₋₁₉ F ₁ x (<i>L-15</i>) B ₅] F ₁
P15	<i>M-69 655 S₉</i>	P12	(<i>M-69 429-82 S₃ x 0-40 S₅</i>) F ₇	H9	[<i>M-69 655 S₉ x (M-69 429-82 S₃ x 0-40 S₅)</i> F ₇] F ₁
P9	<i>Cr. p. 11 S₁₁</i>	P1	<i>S. s. Turkmen/N</i> S ₇	H10	[<i>Cr. p. 11 S₁₁ x (S. s. Turkmen/N</i> S ₇)] F ₁
P14	(<i>K-36 x 0-41</i>) F ₂ x (<i>0-19</i>) F ₁ x (<i>0-22</i>) B ₄ x (<i>L-15</i>) F ₈	P7	(<i>M-44S₄xL-15</i>) F ₁ x (<i>L-15</i>) B ₆	H11	[(<i>K-36 x 0-41</i>) F ₂ x (<i>0-19</i>) F ₁ x (<i>0-22</i>) B ₄ x (<i>L-15</i>) F ₈] F ₇ x (<i>M-44S₄ x L-15</i>) F ₁ x (<i>L-15</i>) B ₆] F ₂
P13	(<i>K-50</i>) F ₅ x (<i>S 1122 (102+113)</i>) F ₂ x (<i>K-43</i>) F ₄	P6	(<i>0-57S₅x0-21S₄</i>) F ₈	H12	[(<i>K-50</i>) F ₅ x (<i>S 1122 (102+113)</i>) F ₂ x (<i>K-43</i>) F ₄ x (<i>0-57 S₅x0-21S₄</i>) F ₈] F ₂
P5	(<i>M-55+130 S₄ x (K-44 x L-15)</i>) F ₂ x (<i>0-47</i>) F ₆	P7	(<i>M-44 S₄ x L-15</i>) F ₁ x (<i>L-15</i>) B ₆	H13	[(<i>M-55+130 S₄ x (K-44 x L-15)</i>) F ₂ x (<i>0-47</i>) F ₆ x (<i>M-44 S₄ x L-15</i>) F ₁ x (<i>L-15</i>) B ₆] F ₂
* P1 – P16 forme parentale				** H1 – H13 hibridi F ₁ /F ₂	

Materialul a fost oferit cu amabilitate de șeful laboratorului Plante aromatice și medicinale, IGFPP - doctorul habilitat în științe agricole Maria Goncariuc.

Probele au fost colectate, în data de 24 aprilie 2013, 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 3-4 frunze de la câte 4 plante, fiind fixate în azot lichid și păstrate la temperatura de -80°C , pentru analizele ulterioare.

2.2. Metode de cercetare

Metode moleculare de cercetare. Tehnicile moleculare disponibile pentru studierea polimorfismului vizează metodele de amprentare genetică, care fac posibilă localizarea și vizualizarea directă, atât a genelor responsabile de manifestarea unui anumit caracter calitativ (monogenic), cât și a segmentelor de ADN (markeri moleculari, care delimitează anumite gene majore sau anumiți loci cantitativi, prezenți în vecinătatea lor).

Extragerea ADN-ului a fost realizată în conformitate cu protocolul standard după Murray și Thomson [193, 267] cu anumite modificări [38, 87]. Probele de ADN au fost extrase de la cele patru plante colectate pentru fiecare genotip.

Materialul vegetal a fost omogenizat în azot lichid până la consistența de praf. Soluția tampon de extragere utilizată a fost CTAB cu următoarea compoziție: 0,1 M Tris-HCl pH 8,0, 1,4 M NaCl, 0,02 M Na_2EDTA , CTAB 2%, PVP 2%, acid ascorbic 0,1% (w/v) și 0,1% β -mercaptoetanol (v/v). ADN-ul a fost incubat timp de 60 min la 65°C pe baia de apă, pentru liza țesuturilor și extragere. Deproteinizarea și purificarea ADN-ului de pigmenți și de polizaharide a fost realizată în prezența soluției de cloroform și alcool izoamilic (24:1). Alcoolul izopropilic a fost adăugat pentru sedimentarea ADN-ului izolat. Purificarea s-a efectuat în prezența alcoolului etilic de 70%. La fiecare etapă probele au fost centrifugate, conform protocolului. Probele uscate au fost dizolvate cu H_2O sterilă. În final probele extrase au fost amestecate într-o singură probă (*bulked*).

Extragerea ARN-ului s-a realizat cu TRI Reagent Solution (*Ambion, Applied Biosystems*) conform recomandărilor producătorului. Astfel, omogenizarea materialului și liza țesuturilor vegetale s-a făcut în azot lichid până la obținerea unui praf, la care, pentru disocierea nucleoproteinelor, a fost adăugată soluție de extracție, cu incubarea probelor la temperatura camerei timp de 5 min. Deproteinizarea și purificarea ARN-ului izolat au fost efectuate conform protocolului. Sedimentarea ARN-ului a avut loc în prezența izopropanol BM. Purificarea ARN-

ului s-a realizat cu etanol de 75%. ARN-ul purificat s-a dizolvat în H₂O lipsită de nucleaze (*Fermentas*).

Evaluarea calitativă și cantitativă a probelor de acizi nucleici extrase a fost realizată prin analiza electroforetică și analiza spectrofotometrică. Determinarea calitativă prin electroforeză a fost efectuată în gel de agaroză de 0,8 și 1,5% (pentru ADN) și, respectiv, 1,4% (pentru ARN) în câmp electric. Pentru colorarea probelor a fost folosită soluția de bromură de etidium (0,5 mg/ml). Separarea fragmentelor a decurs în prezența soluției tampon de migrare 1x TAE (Tris-acetat-EDTA). Vizualizarea și documentarea rezultatelor a fost realizată în spectrul UV cu ajutorul transiluminatorului (*Consort*). Cuantificarea ADN-ului în probele extrase la 260 și 280 a fost efectuată cu ajutorul T60 UV-VIS Spectrophotometer (*PG Instruments limited*). Determinarea calității extractului s-a realizat prin calcularea raportul A_{260}/A_{280} care indică puritatea probelor. Concentrația ADN s-a estimat conform formulei: $A_{260} \times \text{factor de diluție} \times 50 = \mu\text{g ADN/ml}$, iar concentrația ARN - $A_{260} \times \text{factor de diluție} \times 40 = \mu\text{g ARN/ml}$.

Analiza RAPD. Estimarea variabilității genetico-moleculare a fost realizată prin analiza RAPD, tehnică rapidă de identificare a polimorfismului genomic [49]. Pentru analiză au fost utilizați 23 primeri arbitrari (Tabelul 2.2).

Tabelul 2.2.

Primerii RAPD utilizați în amplificarea ADN

Nr.	Primer	Secvența 5' - 3'	T °C	Nr.	Primer	Secvența 5' - 3'	T °C
1.	OPA2	TGCCGAGCTG	36	13.	OPJ01	CCCGGCATAA	34
2.	OPA9	GGGTAACGCC	36	14.	OPK17	CCCAGCTGTG	36
3.	OPA11	CAATCGCCGT	34	15.	OPI16	TCTCCGCCTT	34
4.	OPB01	GTTTCGCTCC	36	16.	OPU11	AGACCCAGAG	34
5.	OPB03	CATCCCCCTG	36	17.	OPV09	TGTACCCGTC	34
6.	OPB10	CTGCTGGGAC	36	18.	Oligo9_ A1	GGTGCGGGAA	36
7.	OPE17	CTACTGCCGT	34	19.	Oligo10_ A2	AAGAGCCCGT	34
8.	OPG05	CTGAGACGGA	34	20.	Oligo11_ A3	CCCGTCAGCA	36
9.	OPG06	GGTCCCTGAC	36	21.	UBC251	TCACACGTGC	34
10.	OPG10	AGGGCCGTCT	34	22.	UBC250	CGACAGTCCC	34
11.	OPG6	GTGCCTAACC	36	23.	P28	AGGTCACTGA	34
12.	OPH15	AATGGCGCAG	34				

Reacția PCR a avut loc într-un mediu de 15 μ l cu următoarea compoziție: 50 ng ADN, 200 μ M dNTP (*ThermoScientific*) de fiecare tip, 0,4 - 0,6 μ M primer, 1 unități/ reacție Dream Taq DNA Polymerase (*ThermoScientific*), în soluție tampon corespunzătoare și 2,5 mM MgCl₂ (*Fermentas*). Testarea s-a realizat cu ajutorul amplificatorului GeneAmp PCR System 9700 (*Applied Biosystems*) cu următorul program: 3 minute la 95⁰ C – predenaturare, urmată de 35 de cicluri cu următorul profil de temperatură: 45 secunde la 95⁰ C – denaturare; 1 minut la 34 - 36⁰ C - fixarea primerilor; 1 minut la 72⁰ C – extensie și 5 minute la 72⁰ C – extensia finală.

Analiza Real-Time PCR. Evaluarea activității transcripționale a fost estimată prin analiza PCR în timp real, tehnică care permite amplificarea exponențială a unei secvențe de interes [161, 209], cu măsurarea ampliconilor după fiecare ciclu. Metoda utilizează primeri specifici care se leagă de ADN dublu catenar pentru amplificarea secvenței țintă.

În cadrul studiului a fost estimat nivelul de transcripți ai genei (*LPPS*), responsabilă de sinteza lambda-13-en-8-ol difosfatului din calea metabolică a sclareolului și al genei hidroxifenilpiruvat reductaza (*HPPR*) implicată în calea de sinteză a acidului rozmarinic.

Probele de ARN total au fost în prealabil tratate cu dsDNase (*ThermoScientific*), reacția a decurs 30 min la 37⁰ C. Sinteza primei catene de ADNc a fost efectuată cu ajutorul 200U/ μ l RevertAid Reverse Transcriptase Kit (*ThermoScientific*). Alinierea Oligo (dT) și random hexamer primer (*Fermentas*) a fost realizată timp de 5 min la 75⁰ C.

Etapă de reverstranscripție cu 20 U/ μ l RiboLock RNase Inhibitor (*ThermoScientific*) și 10 mM dNTP (*ThermoScientific*) a decurs prin incubarea la 25⁰ C pentru 5 min și, ulterior, de 60 min la 42⁰ C.

Reacția PCR cantitativ a avut loc într-un mediu de 15 μ l, utilizând Maxima SYBR Green/ROX PCR Master Mix (*Fermentas*), particulele cărui se atașează de ADN dublucatenar, iar pe măsură ce reacția progresează și cantitatea de ampliconi se amplifică, crescând direct proporțional și nivelul de fluorescență care se detectează. Pentru fiecare probă de ARN reacția a fost montată în trei repetări analitice, în amplificatorul DTprime 96 Real-time Detection Thermal Cyler (*DNA-Technology*).

Design-ul primerilor specifici pentru studiul expresiei genelor s-a realizat cu ajutorul resursei PRIMER3web [285]. Primerii utilizați au fost elaborați în baza secvențelor genelor de interes pentru generarea unui produs de amplificare de 75-150 pb. Dintre perechile generate, conform parametrilor specifici pentru Real-Time PCR, au fost selectate rezultatele cu cel mai mic indice de formare a legăturilor secundare [16] (Tabelul 2.3).

Lista primerilor specifici utilizați în cercetare

Primerii		Sucesiunea de nucleotide (5'- 3')	Start	Tm	Amplicon	Secvența
RM2	LEFT	GAGCACCAGCAGCGATTAT	23	56,7	133	JQ478434.1
	RIGHT	GAGAGTTGCTTAGGACGGATTT	134	58,4		
RM4	LEFT	GACTCCAGAAACAACCCACATT	675	58,4	138	DQ099741.1
	RIGHT	CCCAGACGACCCTCCACAAGA	812	63,7		
Actina	LEFT	TGGATTTGCTGGAGACGATG	108	57,3	293	HM231319.1
	RIGHT	CACGATTGGCCTTGGGATTA	400	57,3		

Concomitent au fost elaborați și primeri specifici pentru actina la salvie (NCBI: HM231319.1) [280], care s-au utilizat în experimentele Real-Time PCR ca genă de referință și au servit la normalizarea datelor experimentale.

Programul de amplificare a inclus: 10 minute la 95⁰ C - predenaturare, succedate de 5 cicluri cu următorul profil de temperatură:

- denaturare – 15 secunde la 95⁰ C
- fixarea primerilor – 30 secunde la 60⁰ C

și 40 cicluri

- denaturare – 15 secunde la 95⁰ C
- fixarea primerilor – 30 secunde la 60⁰ C
- extensie – 30 secunde la 72⁰ C

extensia finală – 15 secunde la 65⁰ C, după care a urmat 10⁰ C.

Detectarea fluorescenței s-a realizat pe parcursul elongării, iar analiza probelor - în baza programului specific instrumentului de PCR utilizat (RealTime_PCR v 7.3.4.0). Amplificarea produselor nespecifice și formarea primerilor dimerizați a fost confirmată prin analiza curbelor de topire după finisarea programului și electroforeza în gel de 1% agaroză.

Nivelul de expresie (2.1), în cadrul amplificărilor Real - Time PCR, a fost calculat pentru fiecare genă conform Livak și Schmittgen (2001) [161] prin utilizarea formulei de calcul:

$$2^{-\Delta Ct} \quad (2.1)$$

unde Ct - (*Cycle Threshold*) reprezintă ciclul în cadrul căruia intensitatea fluorescenței probei a depășit intensitatea de fundal.

Metode biochimice de cercetare. Valoarea fitoterapeutică, medicinală și industrială a speciilor de PMA depinde de conținutul compușilor bioactivi, reflectând astfel importanța studiilor fitochimice asupra metaboliților secundari, care determină proprietățile farmacodinamice ale acestor specii.

Obținerea extractelor etanolice. Extractele din materia primă vegetală au fost obținute din probele fixate în alcool etilic 70% (2 g : 30 ml) [45, 131]. Fixarea a avut loc la -72°C . Procesul de extragere a avut loc pe baia de termostatare la 80°C , cu ajutorul a 5 aparate de distilare cu condensator, timp de 30 minute, de trei ori cu câte 30 ml alcool, la final fiind filtrat printr-un filtru de hârtie. Soluția extractivă obținută s-a concentrat până la 100 ml (Figura 2.1).



Fig. 2.1. Obținerea (A), filtrarea (B) și stocarea (C) extractelor de *S. sclarea*.

Separarea uleiului esențial de *S. sclarea*. Uleiului volatil a fost obținut din inflorescențe proaspete prin hidrodistilare în aparate Ginsberg. După distilare uleiul esențial s-a uscat cu Na_2SO_4 și s-a păstrat în congelator pentru analizele ulterioare.

Cromatografia în strat subțire (CSS) a acizilor polifenolcarboxilici și flavonoidelor. Analiza cromatografică a polifenolilor din extractele vegetale în cadrul grupurilor genetice studiate s-a efectuat prin cromatografia pe strat subțire [169, 248], folosind ca etaloanele acidul rozmarinic (AR) și acidul cafeic (AC) - acizii polifenolcarboxilici, și rutozida (R) și apigenina (Ap) - flavonoide. Probele și soluțiile etaloane s-au aplicat pe placa cromatografică (plăci silicagel 10 x 20 cm) cu ajutorul micropipetelor calibrate. Placa uscată, a fost supusă dezvoltării

în vasul cromatografic saturat timp de circa 1h, la 20-30° C, ca developant servind următorul amestec de solvenți: 100 ml acetat de etil, 11 ml acid formic, 1000 ml acid acetic, 20 ml H₂O. Vizualizarea probelor a fost realizată după uscarea plăcii, prin expunerea la lumină UV la 365 nm.

În baza cromatogramelor obținute, pentru o descriere mai detaliată a genotipurilor investigate și confirmarea rezultatelor calitative, au fost elaborate densitogramele corespunzătoare spoturilor APC și flavonoidelor cu ajutorul programului ImageJ [291]. Astfel, rezultatele au permis gruparea benzilor cromatografice în trei grupuri:

- benzi cu intensitate mare – 90-120 GrayValue;
- benzi cu intensitate medie – 60-90 GrayValue;
- benzi cu intensitate mică – 40-60 GrayValue.

Analiza spectrofotometrică. Conținutul total de polifenoli a fost exprimat în echivalenți de acid galic (g ac. galic/100 g masă proaspătă), aplicat extractelor metanolice. Conținutul de acizi polifenolcarboxilici a fost exprimat în echivalenți de acid rozmarinic (g ac. rozmarinic/100 g masă proaspătă), iar cel de flavonoide - în echivalenți de rutozidă (g rutozidă/100 g masă proaspătă).

Determinarea polifenolilor totali - metoda Singleton & Rossi [235]. Principiul metodei constă în colorația specifică determinată de polifenoli în mediu puternic alcalin, în prezența reactivului Folin – Ciocalteu. Colorația albastră ce se formează este colorimetrabilă la 765 nm. Proba de analizat a fost diluată cu 8,85 ml apă distilată, la care a fost adăugat 0,4 ml de reactiv Folin-Ciocalteu, iar după 5 minute – 1,5 ml carbonat de sodiu 20%. După omogenizare proba a fost lăsată timp de 2 ore pentru dezvoltarea și stabilizarea culorii, care a fost citită, față de un blank, preparat individual pentru fiecare extract (preparat la fel ca și proba fără a crea, însă, mediul alcalin) (Figura 2.2).

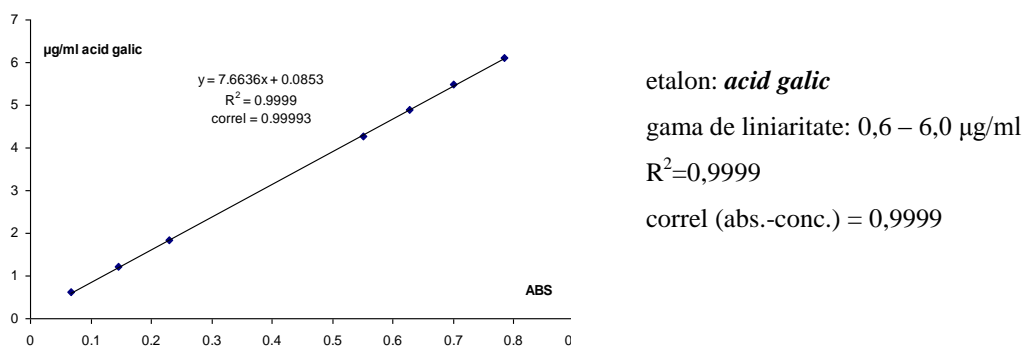
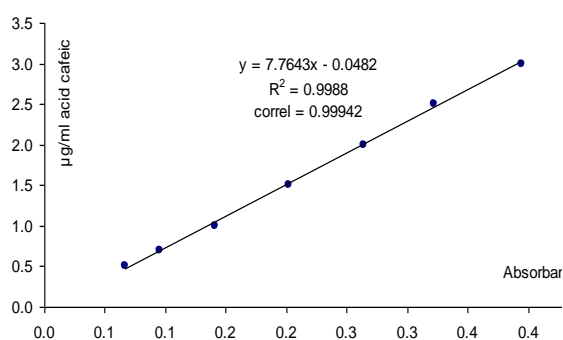


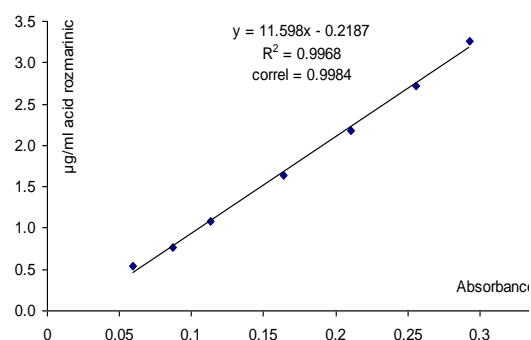
Fig. 2.2. Curba de calibrare a polifenolilor totali, acid galic.

Determinarea acizilor polifenolcarboxilici (APC). Principiul metodei constă în faptul că în mediu alcalin acizii polifenolcarboxilici formează cu acidul fosfotungstic o colorație albastră colorimetricabilă la 660 nm. Pentru analiză proba în volum de 3 ml a fost tratată cu 2 ml acid fosfotungstic, amestecul a fost omogenizat prin agitare timp de 2-3 minute. Din aceasta 2 ml au fost transferate într-un balon de 25 ml și s-a adus la cotă cu carbonat de sodiu 20%, $\text{Na}_2\text{CO}_3 \times 10 \text{H}_2\text{O}$. Timp de 60 secunde a fost citită intensitatea culorii față de un blank preparat similar probei cu excepția utilizării apei distilate în loc de carbonat de sodiu (Figura 2.3).



etalon: *acid cafeic*
 gama de liniaritate: 0,5 – 3,0 µg/ml
 $R^2=0,9988$; correl (abs.-conc.) = 0,9994

A



etalon: *acid rozmarinic*
 gama de liniaritate: 0,5 – 3,0 µg/ml
 $R^2=0,9968$; correl (abs.-conc.) = 0,9984

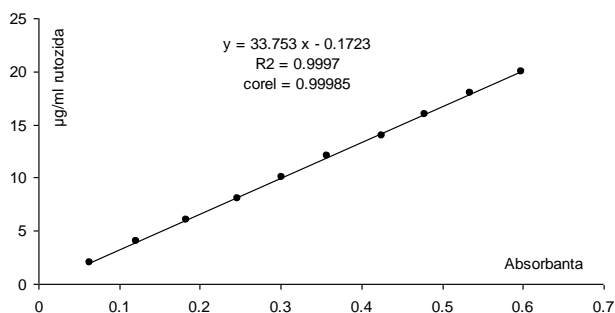
B

Fig. 2.3. Curba de calibrare a acidului cafeic (A) și acidului rozmarinic (B).

Genotipurile au fost clasificate după conținutul de acid rozmarinic în trei grupuri:

- cu conținut mare – 0,2-0,3 g / 100 g masă proaspătă;
- cu conținut mediu – 0,1-0,2 g / 100 g masă proaspătă;
- cu conținut mic – 0-0,1 g / 100 g masă proaspătă.

Determinarea flavonoidelor. Flavonoidele extractibile în solvenți hidrofilii formează în prezența cationului Al^{3+} complecși interni, colorați în galben intens, pentru care se măsoară absorbanta la $\lambda=413$ nm - apiginină, și la $\lambda=430$ nm - rutozidă. Cota parte din proba de analizat a fost diluată cu etanol 70%, în concordanță cu concentrația inițială a flavonoidelor în extract. La aceasta a fost adăugat acetat de sodiu și clorură de aluminiu în volume cunoscute. Absorbanta probei a fost măsurată la $\lambda=413/430$ nm, rezultatele fiind exprimate în echivalent de rutozida (Figura 2.4).



etalon: **rutozida**

gama de liniaritate: 2 - 20 µg/ml

$R^2=0,9997$; correl (abs.- conc.) = 0,9998

Fig. 2.4. Curba de calibrare a flavonelor, rutozida.

Analiza cromatografică de lichide de înaltă performanță. Conținutul de sclareol din uleiul esențial de *S. sclarea* a fost determinat prin analiza cromatografică lichidă de înaltă performanță (HPLC) (Gilson: 303 pump series, 803C manometrice, 231 injector, RI 131 refracție detector de indice, Kipp & Zonen BD41 recorder), cu sistem de gradient în baza solvenților hexanici pentru eluare cu 1,0% (v/v) alcool izopropilic [61]. A fost folosită coloana de tipul SGX CN (*Prague*) 150 x 3,5 mm, fază mobilă la un debit de 0,7 ml/min și presiunea de operare de 18 bar. Detecția fost realizată la 270 nm. Estimarea concentrației sclareolului în extracte a fost efectuată prin metoda de etalonare absolută, ca soluții standart de sclareol pentru referință.

2.3. Analiza statistică a datelor

Prelucrarea statistică a datelor obținute s-a efectuat prin calcularea următorilor parametri [31]:

1. **Media aritmetică, \bar{x}**
$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad (2.2)$$

2. **Eroarea mediei, $s_{\bar{x}}$**
$$s_{\bar{x}} = \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (2.3)$$

3. **Deviația standard, s**
$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (2.4)$$

4. **Varianța, s^2**
$$s^2 = \frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1} \quad (2.5)$$

5. **Coeficientul de variație, V** prezintă variația în cadrul unui șir de date ce permite compararea variabilității care ia valori în intervalul [0;100] (%). Cu cât valorile sunt mai apropiate de 0, cu atât seria statistică este mai omogenă și media \bar{x} este mai reprezentativă. Cu cât valorile sale sunt mai apropiate de 100, împrăștierea valorilor individuale observate este mai mare, Utilizarea

practică a coeficientului de variație a stabilit ca prag de trecere de la omogenitate la eterogenitate procentul 30% - 35%. Valorile mari (aproprate de limita superioară) ale indicatorului indică o serie eterogenă (neomogenă), iar media calculată \bar{x} este mai puțin reprezentativă, astfel, un coeficient de variație mai mic indică o grupare mai bună în jurul valorii medii și se calculează după formula:

$$V = s / \bar{x} \quad (2.6)$$

6. Coeficientul de corelație, r este o valoare cantitativa ce descrie relația dintre două sau mai multe variabile, cu valori cuprinse în intervalul -1 și +1, unde valorile extreme presupun o relație perfectă între variabile, în timp ce 0 înseamnă o lipsă totală de relație liniară. Se estimează după formula:

$$r = \frac{(x - \bar{x})(y - \bar{y})}{\sqrt{(x - \bar{x})^2 (y - \bar{y})^2}} \quad (2.7)$$

7. Gradul de corelare, R^2 arată cât din varianța (2.5) variabilei dependente este explicată de ecuația estimată. Coeficientul exprimă ponderea influenței simultane a tuturor variabilelor factoriale în totalul variației variabilei rezultative. În cazul în care R^2 are valori apropiate de 1, înseamnă ca ponderea influenței variabilelor factoriale în totalul variației variabilei rezultative este mare, adică exista o corelație multiplă puternică. Dacă R^2 are valori apropiate de 0 - ponderea influenței variabilelor factoriale în totalul variației variabilei rezultative este mica și corelația multiplă este slabă sau chiar inexistentă.

8. Efectul de heterozis în cadrul grupelor genetice a fost exprimat prin două valori [104]:

- **heterozis relativ** – estimat față de media părinților (MPH - *Mid-Parent Heterozis*), calculat după formula:

$$MPH = \frac{\bar{F}_1 - \bar{P}}{\bar{P}} \quad (2.8)$$

unde \bar{F}_1 este media aritmetică a parametrului observată la forma hibridă, iar \bar{P} – valoarea medie a mediilor aritmetice a parametrului estimate la formele parentale;

- **heterozis real** – estimat față de cel mai bun părinte (BPH - *Best Parent Heterozis*), calculat după formula:

$$BPH = \frac{\bar{F}_1 - \bar{P}_B}{\bar{P}_B} \quad (2.9)$$

unde \bar{P}_B este valoarea medie a parametrului la cea mai bună formă parentală.

9. **Similaritatea genetică (SG)** a genotipurilor a fost estimată conform formulei:

$$SG = \frac{2N_{ij}}{N_i + N_j}$$

(2.10)

unde N_{ij} este numărul de benzi comune genotipului i și j , iar N_i și N_j – numărul de benzi la genotipul i și, respectiv, j .

10. **Distanța genetică (DG)** s-a determinat după [178, 194] în baza indicelui de similaritate *Jaccard* aplicând SG conform:

$$DG = -\ln(SG) \quad (2.11)$$

În baza matricelor generate s-au elaborat dendrogramele de repartiție a genotipurilor, utilizând metoda UPGMA (*Unweighted Pairwise Group Method with Arithmetic mean*) [265, 287].

11. **Coeficientul cofenetic de corelare** s-a utilizat pentru ierarhizare și prezentarea distanțelor dintre clustere. Acesta se definește ca fiind coeficientul de corelație dintre cele $n(n-1)/2$ distanțe dintre cele n obiecte și distanțele cofenetic din dendrograme, adică distanțele dintre clustere. Considerând $d(i,j)$ distanța Euclidenă dintre două obiecte, i și j , și $t(i,j)$ distanța dintre două clustere i și j , iar d , respectiv t valorile medii ale acestor distanțe, coeficientul de corelație cofenetic, c , poate fi definit astfel:

$$c = \frac{\sum_{i < j} (x(i,j) - \bar{x})(t(i,j) - \bar{t})}{\sqrt{[\sum_{i < j} (x(i,j) - \bar{x})^2][\sum_{i < j} (t(i,j) - \bar{t})^2]}} \quad (2.12)$$

2.4. Concluzii capitolul 2

Au fost caracterizate genotipurile de *S. sclarea* – obiect de studiu al prezentei teze. Au fost identificate și descrise metodele clasice și moderne, ce asigură evaluarea eficientă a polimorfismului genetic (RAPD-PCR, Real-Time-PCR) și biochimic (CSS, spectrofotometrie, HPLC) și analiza statistică a datelor obținute.

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 [111], permit analiza complexă a proceselor genético-moleculare și fiziologice și determină o evoluție rapidă în domeniul biologiei plantelor. Abordările bioinformatic facilitează managementul datelor în aspectul evaluării materialului inițial [151], fiind instrumente binevenite în cadrul programelor de ameliorare și obținerea soiurilor și hibrizilor de perspectivă [78, 169].

3.1. Managementul informațiilor referitoare la plantele medicinale și aromatice

Investigarea bazelor de date biologice, realizată în cadrul studiului de față, a permis constatarea unui volum crescând al informației referitoare la PMA, care necesită a fi sistematizat și analizat. În acest context, pentru explorarea, transformarea și modelarea datelor un rol important revine domeniilor analitice ale biologiei precum este bioinformatica [75, 136].

Cercetările bioinformatic se axează pe două categorii: managementul informațiilor biologice și biologia computațională [106], iar hotarul dintre acestea două este dificil de specificat [186]. La etapa actuală, accentul se pune pe crearea și dezvoltarea bazelor de date, algoritmi de calcul și tehnici statistice pentru a rezolva problemele formale și practice generate de gestionarea și analiza datelor biologice, necesitate ce derivă din vasta informație acumulată ca rezultat al finalizării mai multor proiecte de secvențiere a genomurilor, precum și inițierea multiplelor proiecte pentru studiul transcriptomului și proteomului la diverse organisme [50]. Metodele bioinformatic se aplică în studierea datelor la nivel morfologic, fiziologic, biochimic și genetic [76, 126, 205], inclusiv a celor referitoare la genom, transcriptom, proteom și metabolom, date care sunt fiind liber accesate de întreaga comunitate științifică, fiind stocate în BD [158].

Resursele bioinformatic devin un element esențial în activitățile de documentare a activităților de cercetare [157]. Astfel, un obiectiv major în domeniu este dezvoltarea de sisteme informaționale destinate procesului de colectare, stocare și analiză a informațiilor biologice [25].

Resurse bioinformatic disponibile pentru studiul PMA. Studiul de față a permis evidențierea faptului că informațiile cu privire la speciile de PMA au avansat considerabil. În prezent, metodele tradiționale de descriere a plantelor, care se inițiază cu studiile botanice, sunt

completate prin noi cercetări, ce au la bază implementarea metodelor moderne de biologie moleculară și a tehnologiilor de înaltă performanță [230]. În același timp, abordările contemporane privind PMA includ studii biotehnologice și biochimice [214]. Toate aceste elemente asigură un grad înalt de rezoluție și generează un volum mare de date, care necesită a fi analizat în procesul de cercetare. Astfel, în prezent are loc o adevărată revoluție ca efect al aplicării instrumentelor bioinformaticice, capabile de a selecta, stoca, manipula și organiza sistematic informațiile biologice [81]. Cea mai bună metodă de studiu a plantelor este ierbalizarea și, respectiv, compararea speciilor. Actualmente este posibil de a consulta ierbarele on-line (*Digital Herbarium of Medicinal & Aromatic Plants in India* - ICAR-DMAPR) [293].

Analizând informațiile disponibile au fost identificate mai multe baze de date, care au fost dezvoltate pentru catalogarea informațiilor privind aspectele importante de studiu ale plantelor: descriere botanică și taxonomică, utilizările farmacologice, informații genomice sau transcriptomice, ținte moleculare ale substanțelor biologice active etc. [209].

Informațiile privind PMA pot fi găsite în resursele generale, precum sunt bazele de date ale portalurilor **NCBI** (*National Center for Biotechnology Information*), **EMBL-EBI** (*European Molecular Biology Laboratory - European Bioinformatics Institute*) și **ExPASy** (*Expert Protein Analysis System*).

NCBI reprezintă compartimente esențiale de investigare în domeniul științelor vieții asigurând accesul la o serie de baze de date relevante pentru biotehnologie și biomedicină. Este o sursă majoră în domeniu. Portalul face parte din Librăria Națională de Medicină (NLM, *National Library of Medicine*), fiind componentă a Institutului Național pentru Sănătate, SUA (NIH, *National Institute of Health*), care a fost înființat în 1988. Portalul este structurat în șase categorii: *Literature, Health, Genomes, Genes, Proteins, Chemicals* [204].

EMBL-EBI este un centru de cercetare și servicii în bioinformatică, parte a (EMBL), dedicat cercetării fundamentale în domeniul ramurilor biologiei moleculare. Portalul furnizează date primare din experimente științifice de viață, efectuează cercetarea de baza în biologia computațională și oferă un program extins de instruire a utilizatorilor, sprijinirea cercetătorilor din mediul academic și industrie [142].

ExPASy este un portal de resurse bioinformaticice operat de Institutul Elvețian de Bioinformatică (SIB), care prezintă o resursă multidisciplinară, extensibilă și integrativă, dezvoltată pentru accesarea unui șir de baze de date științifice și care conferă acces la instrumente de analiză în diferite domenii ale științelor vieții. Portalul este destinat atât pentru utilizatorii de experți și pentru cei care nu sunt familiarizați cu un domeniu specific al științelor vieții [107].

De rând cu aceste resurse generale, informații privind PMA pot fi găsite și într-un șir de resurse specifice care au fost identificate pentru PMA:

Baza de date Internațională de Etnobotanice (*The International Ethnobotany Database-ebDB*) este o resursă cu date botanice, care conține un set larg de caracteristici, fiind elaborată special pentru studiile plantelor și a efectelor terapeutice ale acestora [237].

Baza de date NAPALERT (*The NAPRALERT database*) este o resursă ce se axează pe identificarea și analiza datelor experimentale referitoare la produsele naturale, inclusiv cele din sursele vegetale [163].

Baza de date de informații privind Medicina Tradițională Chineză (*Traditional Chinese Medicine Information Database-TCM-ID*) conține informații complete referitoare la plantele utilizate în medicina chinezească, fiind un suport în obținerea de noi medicamente precum prescripții, metaboliți, structură și funcția moleculară a compușilor, proprietățile farmaceutice, efectele terapeutice și de toxicitate, [68, 141, 278].

Substanțe țintă din plantele medicinale (*Herb Ingredient's Target-HIT*) include informații valoroase referitoare la proprietățile și acțiunea compușilor biologic activi din plante [274]. resursa cuprinde date referitoare la obiectivele terapeutice pentru substanțele din plante [159].

Departamentul de Agricultură al Statelor Unite ale Americii (*The United States Department of Agriculture-USDA*) menține o BD cu informații privind plantele medicinale, compușii biologic activi și utilizările lor în fitoterapie. Această, conține șase categorii: reacții inflamatorii, boli cardiovasculare, obezitate, hipertensiune, boli renale și diabet [199].

De asemenea, sunt disponibile mai multe baze de date specifice precum: **CMKb** (flora Australiei) [106], **Raintree** (flora din regiunea Amazonului) [290], **EGENES** [175] etc.

La nivel fundamental, fiecare resursă descrisă reprezintă un sistem de organizare și prelucrare a informațiilor, respectiv teleprelucrare (la distanță) a informației, fiind un ansamblu integrat de date, structurat și dotat cu o descriere a acestora. Descrierea poartă numele de dicționar de date (*metadate*) și creează o interdependență între datele propriu-zise [147].

Cu toate acestea, un blocaj major devine faptul că datele curente, cu privire la speciile de PMA și a compușilor biologic activi, sunt dispersate, cea mai mare parte fiind descrise în literatura de specialitate sub o formă nestructurată. Rezultatele din domeniile genetică moleculară, fiziologie, botanică etc. operează fiecare cu vocabulare specifice de termeni, fiind dificil de a integra și de a corela aceste date [268]. Astfel, continuă să fie necesar de a dezvolta tehnici care pot extrage, stoca și reprezenta datele într-un format util pentru analiză (*data mining*). O modalitate de a depăși acest obstacol este procesul de adnotare a datelor folosind un

vocabular comun controlat sau dezvoltarea unor ontologii (*ontology*) de termeni [241, 242], care face posibilă sistematizarea acestor informații [172].

În contextul celor enunțate, pentru facilitarea căutării informațiilor biologice în cadrul Universității Academiei de Științe a Moldovei, a fost elaborat **instrumentul UDaCoT** [292] (proiect pentru tineri cercetători, 2011-2012). Acesta este destinat extragerii și analizei datelor din diverse resurse științifice importante din domeniul științelor biomedicale. Instrumentul este o elaborare intraramurală, care facilitează procesul de căutare a informațiilor pentru un șir de domenii de interes, în baza cuvintelor cheie prestabilite. Acest algoritm de procesare a datelor reprezintă un suport informațional flexibil ce poate fi folosit pentru diverse obiecte de studiu [15]. Datele extrase sunt analizate din punct de vedere semantic, cu referire la termenii utilizați pentru reprezentarea acestora [20].

Generalizând informația anterior expusă, se evidențiază un volum crescând de date disponibile pentru analiza *in silico*, dar și insuficiența resurselor de analiză a acestora. Prin confluența dintre biologie și informatică, aplicațiile software în biologia moleculară permit rezolvarea unor probleme complicate, fiind actuală dezvoltarea de noi instrumente bioinformatic, menite să faciliteze analiza și interpretarea rezultatelor genomice generate în baza metodelor avansate de cercetare în domeniul – precum este și instrumentul UDaCoT.

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

Etapa inițială a cercetărilor prezentate s-a axat pe analiza informațiilor referitoare la speciile de plante medicinale și aromatice din flora spontană a țării, dar și unele specii introduse în cultură. Astfel au fost investigate bazele de date biologice pentru a analiza compoziția cu efect farmaceutic major. Analiza a fost focalizată pe analiza numărului de referințe bibliografice, secvențe nucleotidice și aminoacidice, proiectelor genomice, metaboliților secundari și compușilor biochimici valorificați în farmaceutică.

În cadrul acestor cercetări s-au analizat 102 specii de plante medicinale din flora indigenă spontană și cea de cultură. A fost constatat faptul că 94 din cele 102 specii de PMA posedă o taxonomie bine stabilită, bazată pe caractere morfofiziologice și genetico-moleculare. Nouă specii de plante (*Gnaphalium uliginosum*, *Aronia melancarpa*, *Astragalus dasyanthus*, *Xanthium spinosum*, *Verbascum thapsiforme*, *Rumex comfertus*, *Centaurium 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 taxonomice.

Numărul total de referințe pentru speciile studiate, variază în limite foarte largi, de la câteva până la 7 mln. (Figura 3.1).

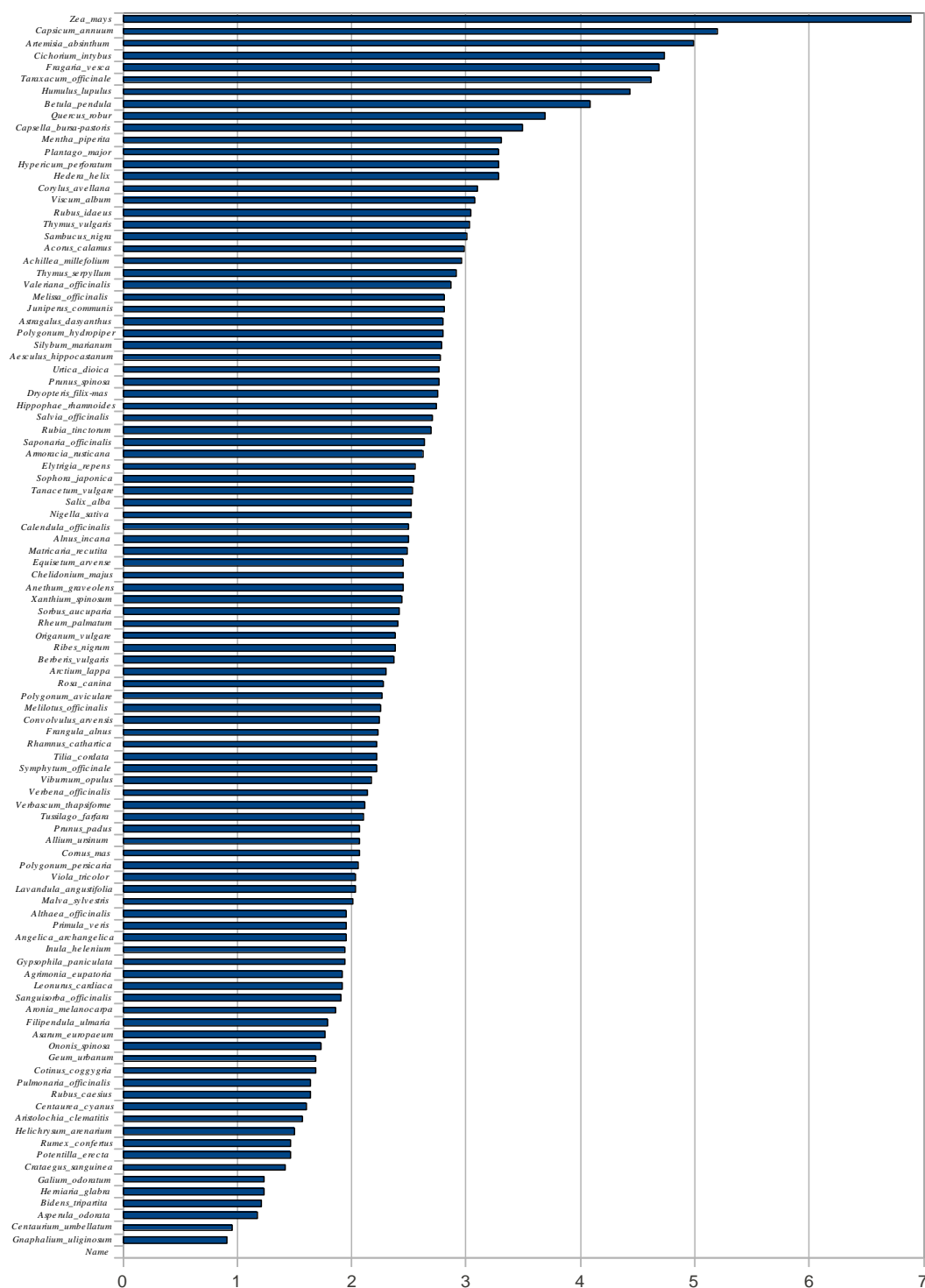


Fig. 3.1. Numărul de referințe identificate în bazele de date a portalului NCBI pentru speciile de plante medicinale (date în forma logaritmică-log₁₀).

Se atestă că nivelul de informare este înalt, în special, pentru speciile cultivate cum ar fi: *Capsicum annuus*, *Fragaria vesca*, *Humulus lupulus*, *Mentha piperita* etc.

Explorarea colecțiilor de secvențe din câteva surse (GenBank, RefSeq și PDB) a permis să stabilim că numărul total de secvențe din aceste BD nu este stabil și crește exponențial. Conform datelor obținute speciile de plante studiate au fost clasificate convențional în patru grupe. Primul grup (A) cuprinde plantele ce nu posedă nici o secvență nucleotidică secvențiată, grupul doi (B) cuprinde plante ce posedă până la 100 de secvențe nucleotidice, grupul trei (C) cuprinde plante ce posedă secvențe cunoscute în număr dintre 100 și 1000 și ultimul grup (D) cuprinde plante ce posedă secvențe nucleotidice cunoscute în număr mai mare de 1000 de secvențe (Figura 3.2).

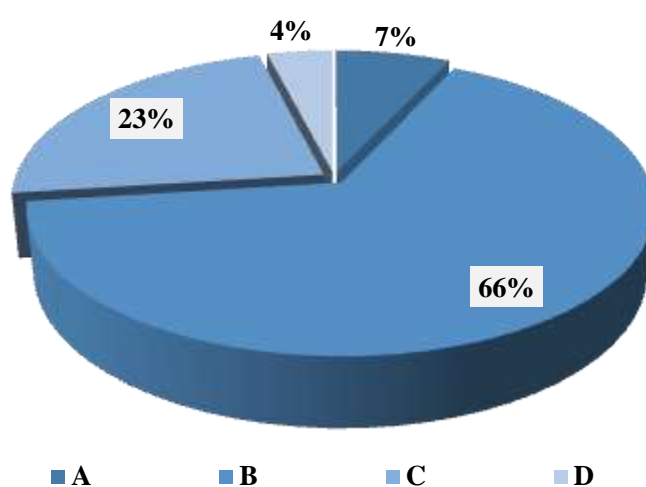


Fig. 3.2. Grupuri de specii cu numărul diferit de secvențe din baze de date.

Cinci specii de plante (*Corylus avellana*, *Capsicum annuum*, *Zea mays*, *Quercus robur*, *Rubus idaeus*) prezintă interes pentru proiectele genomice internaționale. Pentru aceste plante există colecții complete sau incomplete (în progres) de secvențe pe scară largă, asamblări, adnotări și cartografieri ale genelor studiate. Numărul datelor pentru speciile menționate crește continuu, ceea ce este foarte important din punct de vedere al utilizării acestora drept organisme model pentru analiza plantelor înrudite.

În Republica Moldova nu există o bază de date unică pentru plantele medicinale. La momentul analizei informații privind plantele medicinale din flora Republicii Moldova puteau fi găsite fragmentar [295]. În baza rezultatelor obținute a fost elaborată resursa **Med Plant** accesibilă *on-line* [294], ca resursă unică privind plantele medicinale din țară. Actualmente, această BD oferă posibilitatea de a accesa informații ce țin de: caracteristica genetică, taxonomia, arealul de răspândire, acțiunea terapeutică, substanțele biologic active, centrele, institutele,

laboratoare care cercetează plantele medicinale, referințe și nu în ultimul rând, poate fi vizualizată 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 privind *S. sclarea* au fost analizate informațiile din bazele de date a trei portaluri cu o 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 [15], după următoarea schemă de lucru (Figura 3.3).

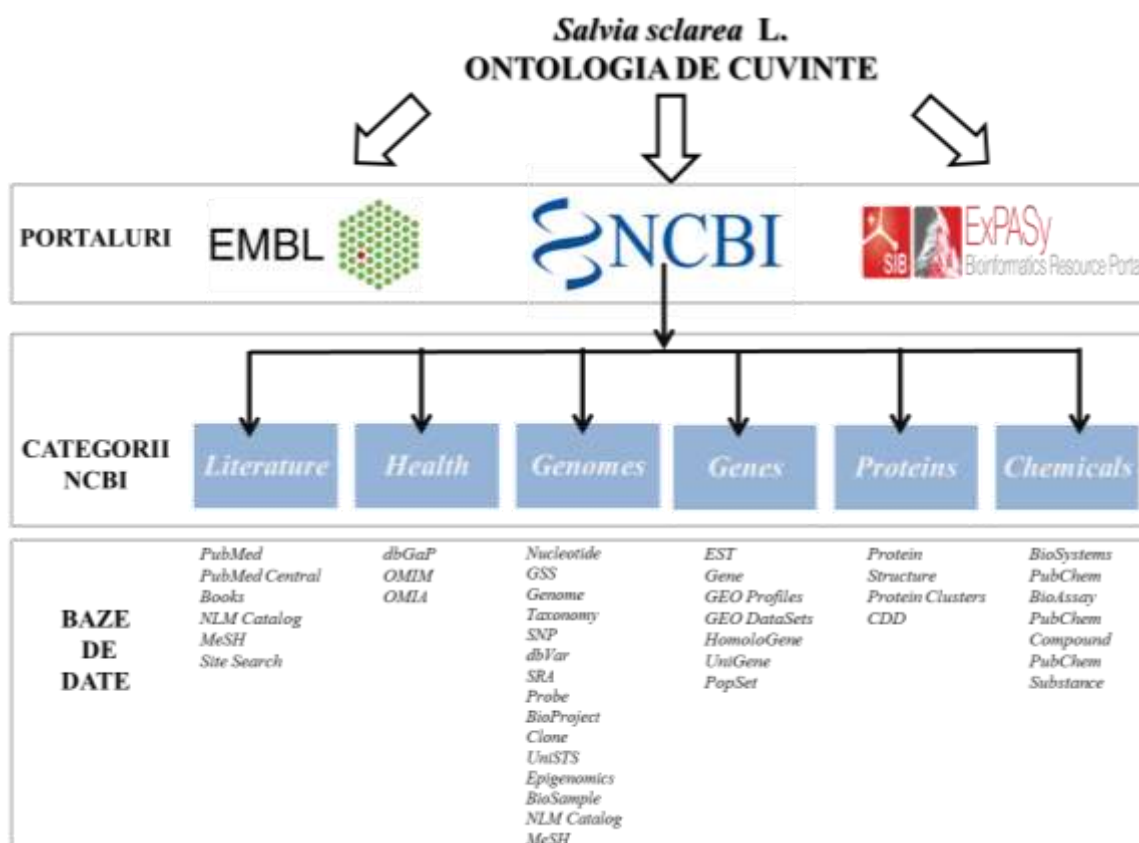


Fig. 3.3. Schema de analiză a datelor.

Astfel, pentru investigarea literaturii de specialitate în domeniu au fost utilizate următoarele cuvinte cheie: *Salvia sclarea RAPD*; *Salvia sclarea genetic polymorphism*; *Salvia sclarea gene expression*; *clary sage RAPD*; *clary sage genetic polymorphism*; *clary sage gene expression*; *Salvia sclarea HPPR*; *Salvia sclarea LPPS*; *Salvia sclarea geranylgeranyl pyrophosphate*; *Salvia sclarea phytochemic*; *Salvia sclarea polyphenolic acid*; *Salvia sclarea*

rosmarinate/rosmarinic acid; Salvia sclarea caffeic acid; Salvia sclarea rutin/rutoside; Salvia sclarea apigenin; Salvia sclarea sclareol; clary sage HPPR; clary sage LPPS; clary sage geranylgeranyl pyrophosphate; clary sage phytochemic; clary sage polyphenolic acid; clary sage rosmarinate/rosmarinic acid; clary sage caffeic acid; clary sage rutin/rutoside; clary sage apigenin; clary sage sclareol.

Studiul bioinformatic realizat în cadrul celor trei portaluri, demonstrează că în ExPaSy se conțin 1827 de înregistrări referitoare la *S. sclarea*, în baza cuvintelor cheie, iar în EMBL – 30812. Cele mai multe informații (48116365 de înregistrări) se relevă în bazele de date ale portalul NCBI (Figura 3.4), care include 39 baze de date. Din aceste considerente pentru studiile ulterioare a fost selectat bazele de date ale portalului NCBI.

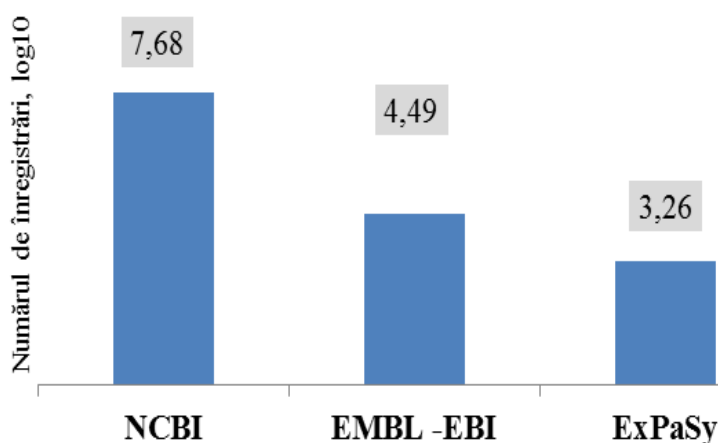


Fig. 3.4. Numărul total de înregistrări pentru portalurile analizate (log₁₀), 30.01.2013.

Pentru a caracteriza modul de evoluție a datelor a fost descris numărul de înregistrări în dinamică, interogarea după cuvintele cheie fiind efectuată la interval de jumătate de an (Tabelul 3.1). Cele mai multe înregistrări au fost relevate în următoarele baze de date (10) - *SNP, PubChem Compound, GEO Profiles, GSS, Gene, dbVar, BioSystems, NLM Catalog, Probe, dbGa*. Rezultatele au prezentat o fluctuație considerabilă în cadrul celor șase categorii NCBI.

Astfel, verificarea datelor la 30 ianuarie 2016 a permis constatarea celor 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% (Figura 3.5).

Tabelul 3.1.

Numărul de rezultate în bazele de date ale portalului NCBI

Nr.	BD	30.03.2013	30.09.2013	30.01.2014	Categorie
1.	<i>PubMed</i>	3321	4186	4313	LiteratureDb
2.	<i>PubMed Central</i>	2416	2781	3075	
3.	<i>Books</i>	42714	45557	46662	
4.	<i>NLM Catalog</i>	166270	176748	177676	
5.	<i>MeSH</i>	8	11	8	
6.	<i>Protein</i>	1604	2006	2405	ProteinsDb
7.	<i>Structure</i>	20010	20982	21892	
8.	<i>Protein Clusters</i>	9791	6025	6025	
9.	<i>CDD</i>	1468	0	0	
10.	<i>EST</i>	52	12011	12011	GenesDb
11.	<i>Gene</i>	596767	660624	1693939	
12.	<i>GEO Profiles</i>	3448779	3332220	3332220	
13.	<i>GEO DataSets</i>	46221	31	31	
14.	<i>HomoloGene</i>	1531	1531	1531	
15.	<i>UniGene</i>	11364	11332	13224	
16.	<i>PopSet</i>	110	116	120	ChemicalsDb
17.	<i>BioSystems</i>	202495	227528	243020	
18.	<i>PubChem BioAssay</i>	84204	390	432	
19.	<i>PubChem Compound</i>	16186547	16232473	16613313	
20.	<i>PubChem Substance</i>	104	102	111	GenomesDb
21.	<i>Nucleotide</i>	2924	3655	3780	
22.	<i>GSS</i>	2677063	2711333	2711708	
23.	<i>Genome</i>	4	5	83	
24.	<i>Taxonomy</i>	3	2	3	
25.	<i>SNP</i>	16375450	21041102	21061046	
26.	<i>DbVar</i>	889811	890275	900969	
27.	<i>SRA</i>	5	8	8	
28.	<i>Probe</i>	7198476	112283	110764	
29.	<i>BioProject</i>	12	19	19	
30.	<i>Clone</i>	686	686	747	
31.	<i>Epigenomics</i>	1658	1546	1546	HealthDb
32.	<i>BioSample</i>	10	19	19	
33.	<i>DbGaP</i>	109556	111019	113739	
34.	<i>OMIM</i>	32	30	32	

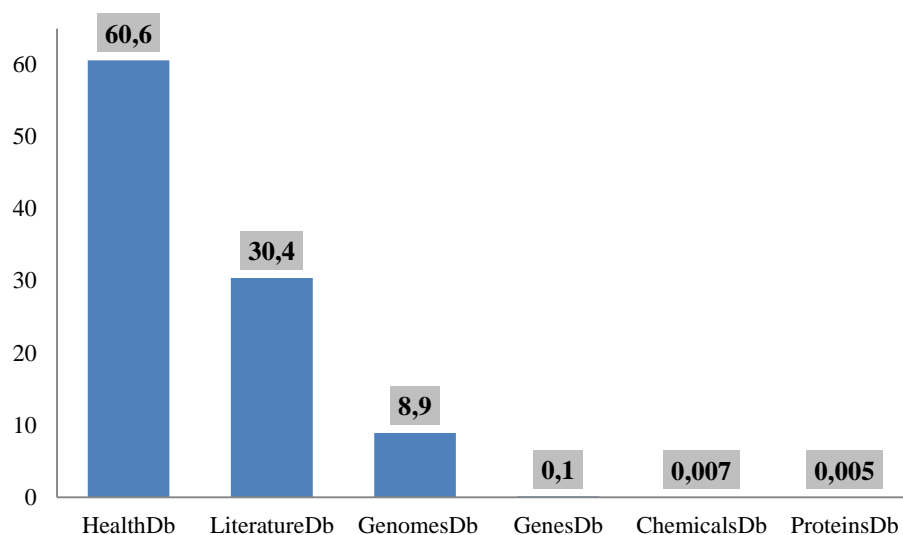


Fig. 3.5. Ponderea rezultatelor pentru categoriile NCBI (%), 30.01.2016.

Studiul în dinamică al informațiilor disponibile cu referire la *S. sclarea* pentru fiecare dintre cele șase categorii, demonstrează un interes științific în creștere pentru fiecare domeniu (Tabelul 3.2).

Tabelul 3.2.
Dinamica numărului de înregistrări pentru fiecare categorie, NCBI

Nr.	Categorie	30.03.2013	30.09.2013	30.01.2014	%
1.	<i>LiteratureDb</i>	214729	220634	215948	0,564
2.	<i>ProteinsDb</i>	32873	34484	33614	2,204
3.	<i>GenesDb</i>	4104824	4105131	4104897	0,002
4.	<i>ChemicalsDb</i>	16473349	16474044	16473677	0,002
5.	<i>GenomesDb</i>	27154358	27157255	27155232	0,003
6.	<i>HealthDb</i>	50403	50762	50760	0,703

Cea mai mare creștere a fost atestată în cazul categoriei ProteinsDb – 2,2%. A crescut și numărul de referințe din categoria LiteratureDb, care include resursele Books (cărți și rapoarte), MeSH (ontologii utilizate în indexarea), NLM Catalog (cărți, reviste), PubMed (rezumate și citări ale articolelor științifice), PubMed Central (articole științifice).

Analiza bioinformatică realizată în cadrul studiului a permis evidențierea faptului că majoritatea informațiilor pun în evidență publicații privind descrierea sistematică și ecologică la

nivel morfologic și fenotipic (37%), precum și rezultate biochimice (44%) privind utilizarea compușilor biologic activi în medicina și medicina tradițională. Numărul publicațiilor și datelor genetico-moleculare (19%) cu referire la structura genetică și identificarea genelor agronomic valoroase sunt destul de limitate.

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 reviuului sistematic al 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*.

3.4. Concluzii la capitolul 3.

1. Analiza resurselor bioinformaticice și a tipurilor de informații disponibile pentru studierea PMA, inclusiv *S. sclarea* a permis constatarea faptului că marea majoritate a informațiilor pun în evidență publicații privind utilizarea compușilor biologic activi în medicina și medicina tradițională. Numărul publicațiilor și datelor genetico-moleculare cu referire la structura genetică, identificarea genelor agronomic valoroase este destul de limitat.

2. Algoritmul instrumentului UDaCoT reprezintă un suport major pentru studiul diverselor obiecte de cercetare, astfel prin extragerea și analiza informațiilor din bazele de date biologice se facilitează procesul de elaborare a reviuului sistematic în domeniile de interes.

3. Baza de date Med Plant, oferă cercetătorilor din Republica Moldova posibilitatea de a obține informații ce țin speciile de PMA din țara noastră și reprezintă o sursă importantă de informare în domeniu.

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 balansate, realizează o interacțiune alelică și nealelică favorabilă atât pentru adaptarea și evoluția organismelor, cât și pentru apariția unor noi genotipuri cu caractere economice 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 geneză al acestuia.

4.1. Diversitatea genetică evaluată în baza primerilor RAPD

Procesul de selecție al genotipurilor de *S. sclarea* este determinat de complexitatea mecanismelor genetico-moleculare de dezvoltare reproductivă și de reglarea sintezei uleiurilor, precum și de influența factorilor de mediu asupra expresiei genelor și nivelului de realizare a potențialului genetic. Cercetările privind polimorfismul genetic pot facilita identificarea genotipurilor valoroase necesare pentru obținerea formelor performante [102, 164]. 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 [1, 43, 263].

Pentru ameliorarea și sporirea potențialului adaptiv al PMA un rol primordial revine recombinățiilor care stau la baza variabilității genetice și se manifestă la nivel molecular. Cu toate acestea sunt cunoscute puține date, cu referire la evaluarea diversității genetice a *Salvia sp.* [55, 57, 91, 238, 260, 276].

În cadrul studiului de față a fost realizată analiza variabilității asupra 28 genotipuri de *S. sclarea* din Republica Moldova, utilizând tehnica de analiză RAPD. Rezultatele au evidențiat eterogenitatea spectrelor amplificate în funcție de genotip și primerii utilizați fiind demonstrat un nivel înalt al polimorfismului materialului analizat.

Nivelul variabilității genotipurilor de *S. sclarea*, studiat în baza a 23 primeri RAPD, a fost confirmat prin prezența a 379 fragmente amplificate. Produsele PCR au fost reprezentate de fragmente cu lungimea de 150 - 3100 perechi de baze (pb). Din cauza unor rezultate minime,

trei dintre decameri (OPA11, OPI16 ȘI OPV09), au fost excluși din studiu, astfel fiind analizate rezultatele obținute cu 20 oligomeri.

OPH15 (AATGGCGCAG). Produsele amplificate cu OPH15 relevă 18 fragmente. Acestea au lungimea cuprinsă între 200-2050 pb, dintre care fragmentul de 600 pb a fost cel mai frecvent. Numărul maxim de ampliconi se constată la hibridul H2 și în cadrul formelor parentale P3 și P8.

OPA2 (TGCCGAGCTG). Studiul produselor de amplificare al ADN-ului la *S. sclarea* cu primerul OPA2 a pus în evidență 17 fragmente cu lungimea cuprinsă între 200-1550 pb. Cea mai mare frecvență a fost atestată pentru benzile de 500 și 750 pb (Figura 4.1).

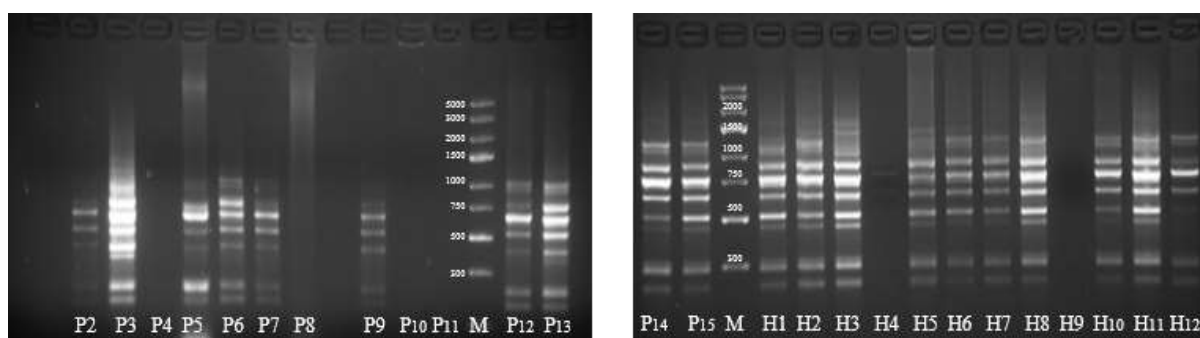


Fig. 4.1. Produsele de amplificare cu primerul OPA2.

UBC250 (CGACAGTCCC). 30 fragmente au fost evidențiate în urma amplificării cu primerul UBC250 cu lungimea cuprinsă între 280-2800 pb. Numărul maxim de ampliconi se constată la genotipul H3.

OPU11 (CAATCGCCGT). Investigarea datelor relevate în urma amplificării cu primerul OPU11 evidențiază 23 de fragmente (300-4500 pb). Cele mai multe rezultate de amplificare se atestă la hibridul H10 și la forma parentală P13.

UBC215 (TCTCCGCCTT). Un total de 18 ampliconi au fost puși în evidență cu oligomerul UBC215. Benzile analizate au lungimea cuprinsă între 300-2500 pb. Cea mai mare frecvență o prezintă fragmentul de 750 pb. Hibridii H8 și H9 au prezentat cel mai mare număr de fragmente.

P28 (AGGTCACTGA). Produsele amplificate evidențiate cu primerul P28 au permis însumarea a 16 fragmente cu lungimea cuprinsă între 280-1600 pb. Dintre ampliconii obținuți, cei mai frecvenți sunt 450 și 500 pb. Numărul maxim de fragmente se atestă la H11.

OPA9 (TGTACCCGTC). Analiza profilurilor evidențiate cu primerul OPA9 prezintă 20 de fragmente cu masa moleculară cuprinsă între 260-2500 pb. Cei mai mulți ampliconi se constată la hibridul H3 (Figura 4.2, A).

OPG05 (CTGAGACGGA). Primerul OPG05 a pus în evidență 17 fragmente cu lungimea cuprinsă între 350-1700 pb, dintre care fragmentul de 450 pb prezintă o frecvență înaltă. Hibridul H6 se remarcă cu cele mai multe rezultate (Figura 4.2, B).

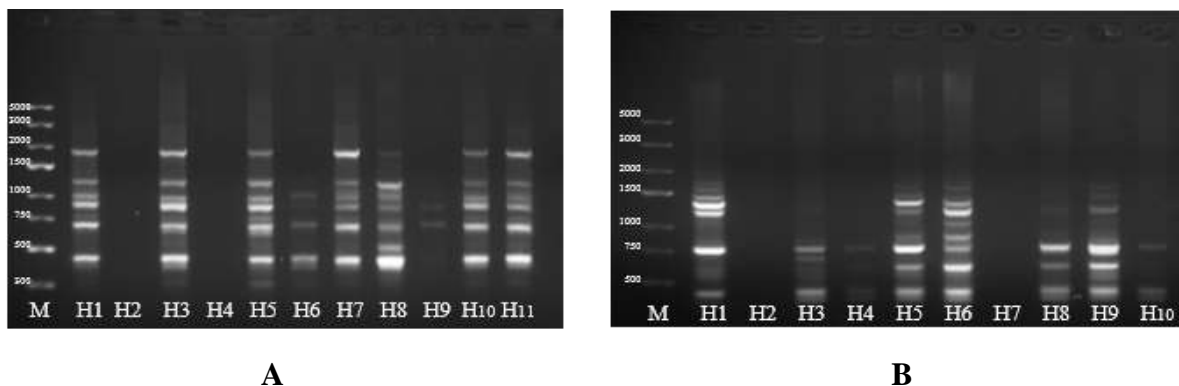


Fig. 4.2. Produsele de amplificare cu primerii OPA9 (A) și OPG05 (B).

OPE17 (CTACTGCCGT). Electroforegrama obținută în urma amplificării cu primerul OPE17 relevă 13 fragmente, cu lungimea cuprinsă între 500-3000 pb. Ampliconul de 1400 pb se identifică a fi cel mai frecvent. Se remarcă hibridul H8 cu cele mai multe rezultate de amplificare, precum și formele parentale P1 și P13.

OPG10 (AGGGCCGTCT). Studiul produselor de amplificare obținute cu decamerul OPG10 a pus în evidență 17 fragmente cu lungimea de 400-2000 pb (Figura 4.3).

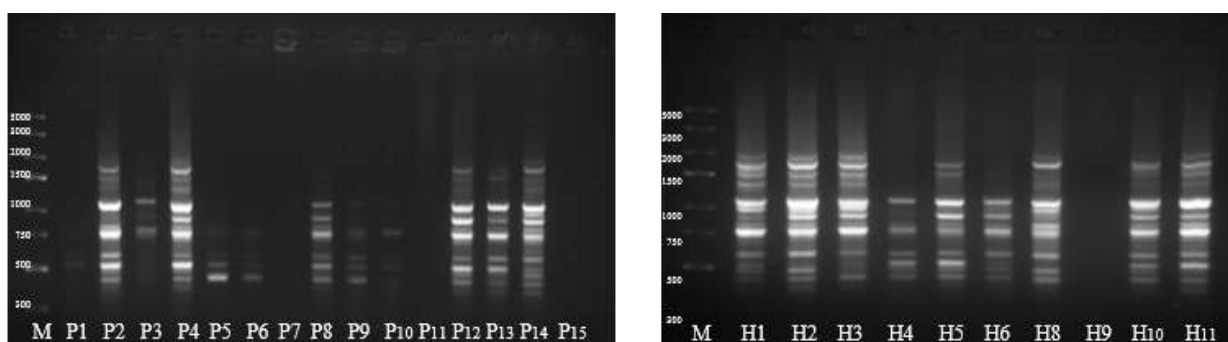


Fig. 4.3. Produsele de amplificare cu primerul OPG10.

Se constată că formele hibride incluse în studiu au prezentat mai multe produse de amplificare, comparativ cu forme parentale analizate. Electroforegrama produselor de amplificare a indicat un amplicon specific (1000 pb) doar pentru hibridii H1, H2, H3 și H8 (Figura 4.4).

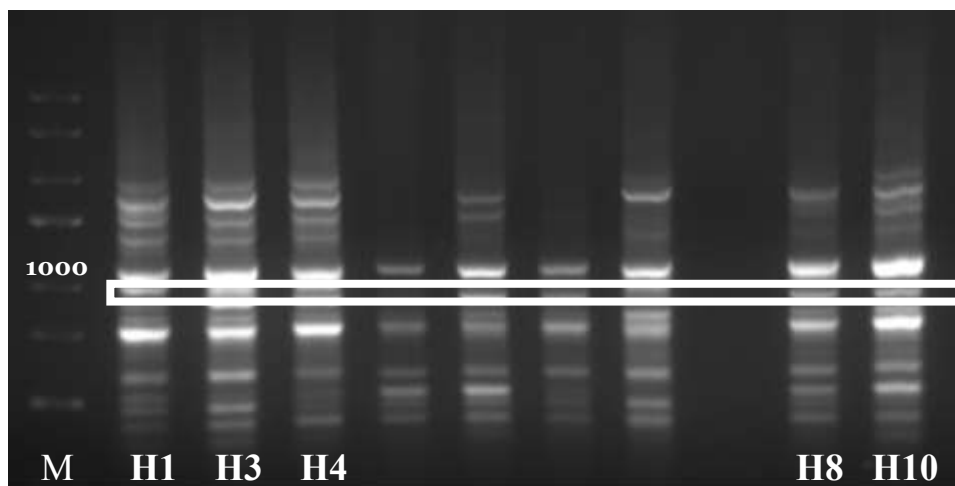


Fig. 4.4. Produsele de amplificare cu primerul OPA10.

OPK17 (CTACTGCCGT). Cercetarea rezultatelor obținute în baza primerului OPK17 a permis constatarea a 27 fragmente de amplificare. Fragmentele au lungimea cuprinsă între 150 și 1800 pb, cea mai mare frecvență o prezintă banda de 500 pb. Cel mai mare număr de ampliconi se constată la genotipurile hibride H9 și H11, precum și în cadrul formelor parentale la P3 și P15.

OPB10 (CTGCTGGGAC). Electroforegramele obținute în baza OPB10 atestă 17 fragmente cu lungimea cuprinsă între 290-2100 pb, dintre care cea mai mare frecvență o prezintă fragmentul de 750 pb. Se constată că hibridii au arătat mai multe rezultate de amplificare, comparativ cu formele parentale (Figura 4.5, A).

OPB01 (GTTTCGCTCC). Analiza produselor RAPD obținute cu primerul OPB01 a permis constatarea a 19 fragmente cu lungimea cuprinsă între 400-2500 pb. Cea mai mare frecvență o prezintă fragmentul de 400 pb. Cel mai mulți ampliconi se atestă la hibridii H1 și H2 (Figura 4.5, B).

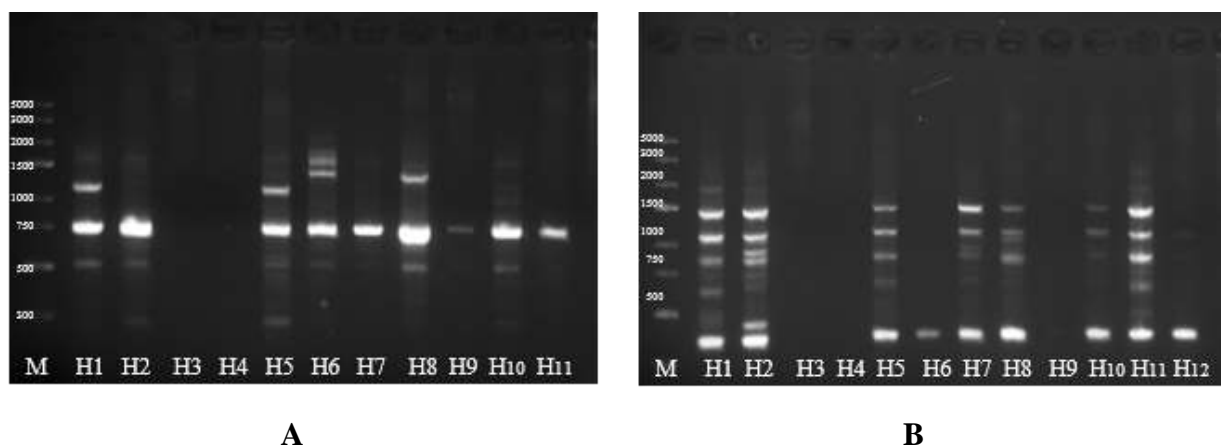


Fig. 4.5. Produsele de amplificare cu primerii OPB10 (A) și OPB01 (B).

Oligo A2 (AAGAGCCCGT). Amplificarea în baza primerului Oligo A2 a pus în evidență 17 fragmente de amplificare cu lungimea cuprinsă între de 260-3100 pb. Se constată apariția unei benzi specifice (500 pb) în cazul formei hibride H9. Hibridul H1 arată un număr înalt de produși de amplificare.

Oligo A1 (GGTGCGGGAA). Studiul rezultatelor obținute în baza Oligo A1 a pus în evidență un număr de 21 fragmente de amplificare, cu lungimea cuprinsă între 300- 2500 pb, dintre care ampliconul de 350 pb este cel mai frecvent. Numărul maxim de rezultate, se evidențiază.

OPG6 (GGTCCCTGAC). Electroforegrama obținută în urma amplificării cu primerul OPG6 a pus în evidență 13 fragmente. Ampliconii au lungimea cuprinsă între 300-1600 pb. Cel mai mare număr al rezultatelor de amplificare se atestă la genotipul H1 (Figura 4.6).

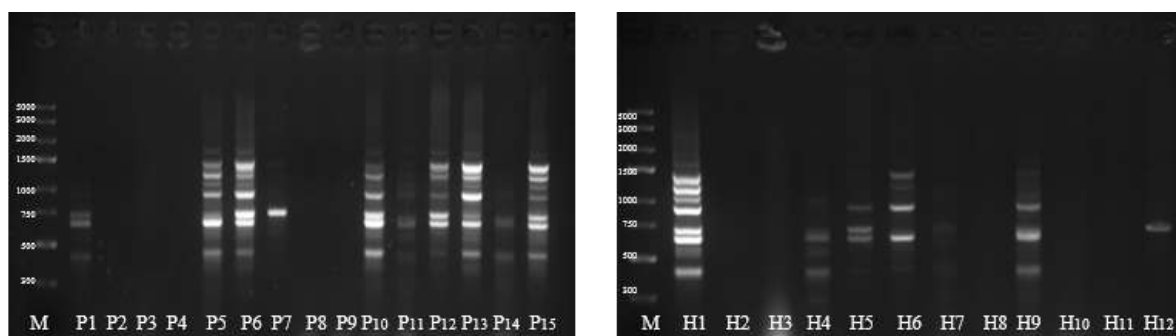


Fig. 4.6. Produsele de amplificare cu primerul OPG6.

OPJ01 (CCCGGCATAA). Analiza fragmentelor relevate în baza primerului OPJ01 a pus în evidență un total de 12 ampliconi cu lungimea cuprinsă între de 400-1500 pb. Hibrizii H3 și H6 au arătat cele mai multe produse de amplificare (Figura 4.7, B).

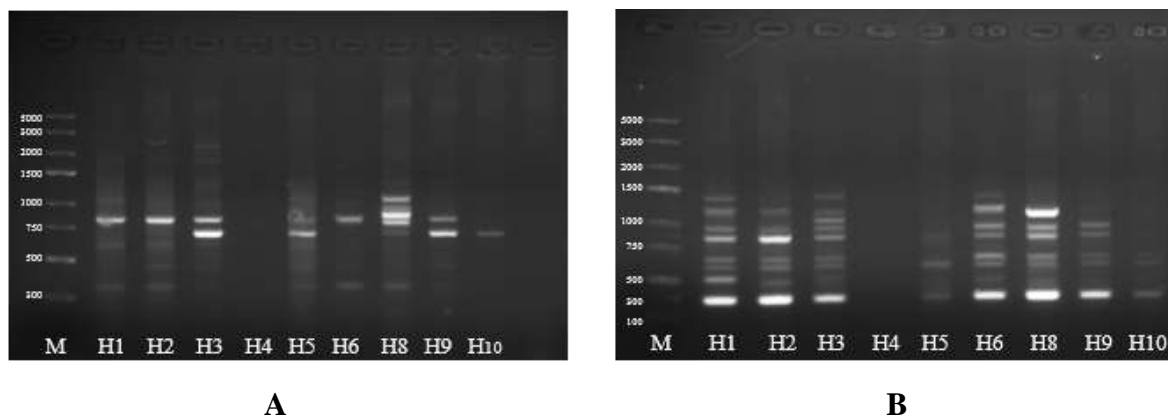


Fig. 4.7. Produsele de amplificare cu primerii OPB03 (A) și OPJ01 (B).

OPB03 (CATCCCCCTG). Produsele de amplificare obținute cu decamerul OPB03 relevă un număr de 23 fragmente (260-2400 pb). Cea mai mare frecvență o prezintă ampliconii de 800 și 1000 pb. În cadrul formelor parentale numărul maxim de produse de amplificare se atestă la H8 (Figura 4.7, A).

Oligo A3 (CCCGTCAGCA). Studiul produselor obținute cu primerul Oligo A3 a pus în evidență 18 ampliconi, care se includ în limita lungimii de 350-2100 pb. Numărul cel mai înalt de rezultate de amplificare se constată la genotipul H1. O particularitate deosebită a fost apariția a două benzi specifice prima de 800 pb în cazul hibridului H1 și a doua bandă de 400 pb la forma parentală P14 [17].

În cadrul studiului numărul benzilor polimorfice a variat, fiind pus în evidență un număr de la 11 până la 26 fragmente polimorfice per primer. Din totalul de fragmente amplificate 15% sunt monomorfe și 85% polimorfice. Numărul total de ampliconi per oligomer a fost estimat în intervalul de 12 (OPJ01) și 29 benzi (UBC250) (Tabelul 4.1).

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 monomorfe.

Generalizând datele obținute în urma amplificării cu cei 20 primeri RAPD se evidențiază hibridul H1 cu cel mai mare randament de amplificare (163 fragmente). La forma parentală P3, care în cazul studiului este utilizat ca forma maternă pentru hibridii H4, H5 și H6, s-a evidențiat un total de 147 fragmente. Genotipurile P4 și H13 au prezentat cel mai mic număr de rezultate de amplificare (Figura 4.8) [19].

La nivelul genotipurilor analizate, cele mai multe benzi specifice au fost înregistrate la forma parentală P5 (10), urmată de hibridul H8 (8).

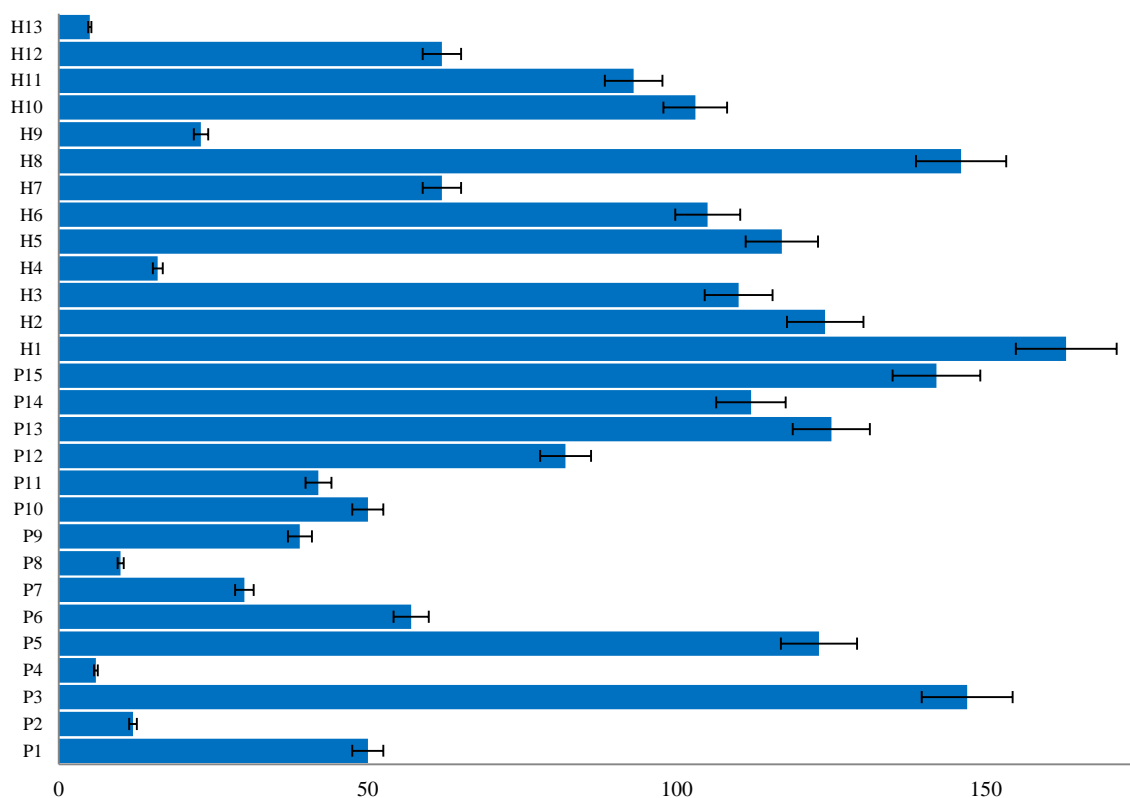


Fig. 4.8. Numărul de fragmente amplificate la genotipurile de *S. sclarea*.

Formele parentale P2, P7, P8, P9, P10, P11, P12 și hibridii H4, H9, H10, H12, H13 nu au prezentat nici o bandă specifică (Tabelul 4.2).

Tabelul 4.2.

Fragmentele specifice evidențiate la genotipurile de *S. sclarea*

Benzii specifice	Forme parentale		Hibridi	
	P1	P28 ³⁵⁰ ; OPG06 ⁵⁰⁰ ; OPG06 ³⁰⁰ ;	H1	A1 ²⁵⁰⁰ ; A1 ¹⁶⁵⁰ ; A2 ²⁸⁰⁰ ; A22000; A2 ⁷⁰⁰ ; A3 ⁸⁰⁰
	P3	OPA9 ⁹⁵⁰ ; OPB01 ²⁴⁰⁰ ; OPB011 ⁸⁰⁰ ; OPB10 ¹⁷⁵⁰ ; OPJ011 ⁵⁰⁰ ; OPU11 ⁷⁰⁰	H2	OPB01 ²⁵⁰⁰ ; OPG06 ¹⁷⁰⁰ ; OPG06 ⁹⁵⁰
	P4	OPB03 ³⁰⁰	H3	OPG5 ¹⁴⁵⁰ ; UBC250 ²⁸⁰⁰
	P5	A11 ³⁰⁰ ; A1 ⁶⁵⁰ ; P28 ¹⁶⁰⁰ ; P28 ⁶⁵⁰ ; UBC215 ²¹⁰⁰ ; UBC215 ²⁰⁰⁰ ; UBC215 ⁹⁵⁰ ; UBC215 ⁸⁵⁰ ; UBC250 ¹⁷⁰⁰ ; UBC250 ¹⁵⁰⁰	H5	OPB10 ⁵⁵⁰
	P6	OPA9 ⁵⁵⁰ ; OPG06 ¹⁸⁰⁰ ; OPG06 ¹⁰⁰⁰ ; OPU11 ¹⁴⁰⁰ ; OPU11 ¹²⁰⁰	H6	OPB10 ²¹⁰⁰ ; OPK17 ¹⁵⁰⁰
	P13	A2 ³¹⁰⁰ ; A2 ³⁰⁰⁰	H7	P28 ²⁸⁰ ; OPG6 ⁶⁰⁰ ; UBC215 ⁴⁰⁰
	P14	OPJ011 ¹⁰⁰	H8	A1 ⁵⁰⁰ ; OPB03 ⁸⁵⁰ ; OPB03 ²⁶⁰ ; OPB10 ⁴⁰⁰ ; OPE17 ²¹⁰⁰ ; OPG5 ¹⁰⁰⁰ ; OPG5 ³⁵⁰ ; OPU11 ²⁷⁰⁰
	P15	A1 ¹⁵⁵⁰ ; A1 ¹⁰⁰⁰	H11	P28 ⁷⁰⁰ ; OPG06 ²⁸⁰⁰

În concluzie, analiza variabilității genotipurilor de *S. sclarea* cultivate în Republica Moldova, realizată prin amplificarea primerii RAPD testați, a permis constatarea unei eterogenității a speciei studiate, fiind demonstrat un nivel înalt de polimorfism al materialului ameliorativ local. Rezultatele obținute privind diversitatea genetică pun în evidență hibridul H1 cu un număr maxim de fragmente amplificate, iar dintre formele parentale se remarcă P3. Cele mai multe benzi specifice au fost relevate la forma parentală P5, urmată de hibridul H8, cel mai informativ fiind primerul UBC250. Hibridul H1 relevă un număr maxim de fragmente amplificate, iar forma parentală P5, urmată de hibridul H8 - cele mai multe benzi specifice. Cel mai informativ a fost primerul UBC250, care poate fi utilizat în scopul amprentării sau evidențierii autenticității genotipurilor de *S. sclarea*.

4.2. Variabilitatea ampliconilor în cadrul grupurilor genetice analizate

În selectarea formelor parentale pentru obținerea hibridilor performanți un indice important sunt particularitățile de moștenire ale ampliconilor RAPD în prima generație [3, 64, 217]. 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 diferiți [105, 269].

Analiza modului de moștenire a ampliconilor în prima generație a fost evaluată demonstrează un spectru variat și complex de amplificare și pun în evidență șapte cazuri de manifestare a ampliconilor în gelul electroforetic.

➤ Hibrizii F₁

Analiza modului de moștenire în prima generație a fost descrisă pentru grupurile genetice a următorilor hibridi: H1, H4, H6, H7, H8, H9 și H10. Rezultatele au pus în evidență șapte tipuri de fragmente [18]: fragmente comune (a), fragmente comune pentru hibrid și unul dintre părinți (b și c), produse specifice hibridilor (d), produse specifice formelor materne (e), produse specifice formelor paterne (f), fragmente comune pentru genotipurile parentale dar absente în F₁ (g).

În cadrul studiului, s-au evidențiat primerii P28, A2, OPB10, OPG10 și OPK17, care au prezentat cele mai numeroase rezultate de amplificare, generând date pentru câte trei dintre grupurile genetice cercetate. Se remarcă trei primeri P28, OPB10 și OPK17, care au relevat rezultate pentru aceleași grupuri genetice și anume, grupurile genetice ale hibridilor H1, H7 și H10.

Grupurile genetice ale hibrizilor H6 și H8 au prezentat rezultate de amplificare care au fost urmărite în descendență în cazul oligomerilor A3, OPG10 și OPJ01.

➤ **Hibridul H1 cu formele parentale P1 și P14 - opt primeri (Tabelul 4.3).**

Tabelul 4.3.

Moștenirea ampliconilor în cadrul grupului genetic al hibridului H1

Primer		a	b	c	d	e	f	g
	♀	+	+	-	-	+	-	+
	♂	+	-	+	-	-	+	+
	F ₁	+	+	+	+	-	-	-
OPK17	18	0	1	1	8	4	4	0
OPH15	9	4	0	3	0	0	2	0
OPG05	8	4	2	0	0	0	2	0
OPG6	11	3	0	3	3	0	1	1
OPB10	8	1	1	1	4	1	0	0
28	4	0	1	2	0	1	0	0
OPA9	17	1	4	2	1	3	5	1
OPB01	10	1	0	1	4	1	1	2
Total	85	14	9	13	20	10	15	4

OPK17: 18 ampliconi cu lungimea cuprinsă între 150-1250 pb, inclusiv câte 5 benzi la formele parentale și 10 - la hibrid. Hibridul se caracterizează prin 8 ampliconi specifici (300, 450, 600, 800, 900, 1000, 1100 și 1250 pb) (d), forma ♀ – trei benzi 290, 700 și 950 (e), forma ♂ – cinci fragmente (280, 490, 550, 650 și 850 pb) (f). Ampliconul de 500 pb a fost moștenit de la forma ♀ (b), iar cel de 150 pb – de la forma ♂ (c). Fragmentul 400 pb a fost identificat la ambele forme parentale (g).

OPH15: 9 ampliconi, inclusiv 4 (♀) și, respectiv, 9 (♂) la formele parentale și 7 – la hibrid cu lungimea cuprinsă între 200-1250 pb. Fragmentele de 850, 1200 și 1250 pb au fost moștenite de la genotipul patern (c). Ampliconii 200, 500, 600 și 750 pb au fost comuni (a).

OPG6: 11 ampliconi cu lungimea cuprinsă între 300-1600 pb, inclusiv 2 (♀) și, respectiv, 9 (♂) la formele parentale și 2 - la hibrid. Fragmentele de 300, 750, 1000, 1250, 1400 și 1600 pb au fost specifice pentru forma ♀ (e), iar 700 pb – pentru hibrid (d). Ampliconul de 900 pb a fost

moștenit în F₁ de la genotipul ♂ (c). Fragmentele de 400 și 650 pb au fost comune pentru formele parentale (g).

OPB10: 8 fragmente amplificate cu lungimea cuprinsă între 290-1900 pb, inclusiv 3 (♀) și, respectiv, 2 (♂) la formele parentale și 7 – la hibrid. Ampliconii de 290, 350, 1550 și 1900 au fost specifici pentru F₁ (d), fragmentele de 500 și 950 pb - pentru forma ♀ (e), iar 450, 1200 și 1400 pb pentru ♂ (f). Ampliconul de 500 pb a fost moștenit de la forma ♀ (b), 1200 pb – de la genotipul ♂ (c), iar 750 pb a fost moștenit de la ambele formele parentale (a).

OPG05: 8 fragmente (450-1600 pb), cele trei genotipuri au prezentat câte 6 benzi fiecare. Cadrul de moștenire a ampliconilor evidențiază la hibrid prezența a 5 ampliconi (450, 650, 750, 1250 și 1500 pb) comuni (a). Fragmentul de 1600 pb a fost moștenit de la forma ♀ (b).

P28: 4 ampliconi, inclusiv câte 2 benzi la formele parentale și 3 – la forma hibridă, cu lungimea cuprinsă între 350-750 pb. Un amplicon de 750 a fost moștenit de la forma ♀ (b), doi (450 și 500 pb) – de la ♂ (c).

OPA9: 17 fragmente (260-1950), câte 8 la formele parentale și 8 – la hibrid. Doi ampliconi (750 și 1800) au fost specifici pentru F₁ (d), 8 (300, 400, 450, 700, 850, 1000, 1950 și 1250) – pentru forma ♀ (e), și 4 (260, 320, 350 și 800) – pentru genotipul ♂ (f). Ampliconii de 400, 450, 850, 1000 și 1250 a fost moșteniți de la forma ♀ (b), fragmentul de 650 de la ♂ (c). Banda de 600 pb a fost comună pentru formele parentale (g).

OPB01: 10 fragmente (400-2000 pb), inclusiv 4 (♀) și, respectiv, 5 (♂) la formele parentale și 6 – la forma hibridă. Au fost identificați cinci ampliconi specifici pentru genotipul hibrid (500, 550, 850, 1100 și 2000 pb) (d), doi – pentru forma ♀ (800 și 1500 pb) (e), unul – pentru genotipul ♂ (750 pb) (f). Un amplicon (400 pb) a fost comun pentru toate cele trei genotipuri analizate (a), altul (1400 pb) a fost moștenit de la genotipul ♀ (b). Ambele formele parentale posedă ampliconul de 1000 pb, care nu a fost moștenit de hibrid (g).

➤ **Hibridul H4 cu formele parentale P3 și P4** - un primer (Tabelul 4.4).

OPG10: 13 fragmente cu lungimea cuprinsă între 400-1800 pb, inclusiv 6 (♀) și, respectiv, 13 (♂) la formele parentale și 6 – la hibrid. Șase ampliconi au fost specifici formei ♂ (f). Șase fragmente au fost comune formelor parentale (g) (Figura 4.9, A).

Moștenirea ampliconilor în cadrul grupului genetic al hibridului H4

Primer		a	b	c	d	e	f	g
	♀	+	+	-	-	+	-	+
	♂	+	-	+	-	-	+	+
F₁	F₁	+	+	+	+	-	-	-
OPG10	13	2	3	1	0	4	1	2
Total	13	2	3	1	0	4	1	2

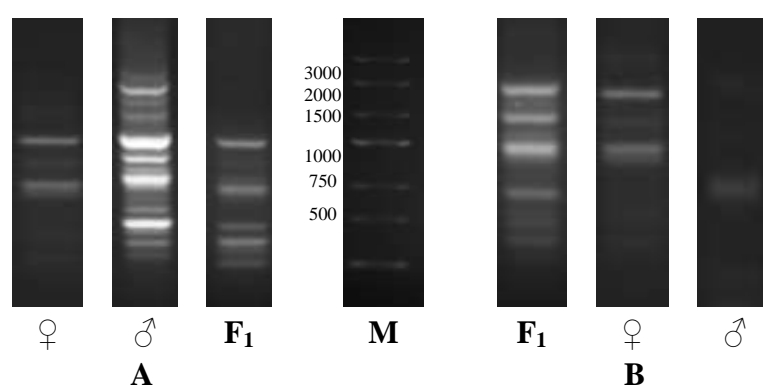


Fig. 4.9. Produsele de amplificare în cadrul grupurilor genetice H4 (A) și H6 (B) cu OPG10.

➤ **Hibridul H7 cu formele parentale P15 și P11 - opt primeri (Tabelul 4.6).**

UBC250: 18 produse de amplificare, inclusiv 6 (♀) și, respectiv, 13 (♂) la formele parentale și 9 – la forma hibridă (350-2000 pb). Un amplicon (1250 pb) a fost specific pentru F₁ (d), patru (300, 375, 1600 și 1900 pb) – pentru forma ♀ (e), cinci (780 350, 480, 650, 1750 și 2000 pb) – pentru forma ♂ (f). Trei fragmente (600, 700 și 1100 pb) au fost moștenite de la forma ♀ (b), doi ampliconi (450 și 950) – de la ♂ (c). Ampliconii de 900, 1200 și 1450 pb au fost comuni pentru formele parentale (g), iar fragmentele de 500, 750 și 800 pb au fost comune în cadrul grupului (a).

OPK17: 19 produse de amplificare (150-1800 pb), inclusiv 5 (♀) și, respectiv, 11 (♂) la formele parentale și 8 - la hibrid. Se atestă 5 fragmente specifice (500, 700, 1000, 1300 și 1800 pb) pentru F₁ (d), trei (180, 290 și 600 pb) – pentru forma ♀ (e) și 5 (150, 280, 400, 490 și 550 pb) - pentru genotipul ♂ (f). Ampliconii de 250, 450, 500 și 850 au fost moșteniți de la forma ♀ (b). Cinci benzi (650, 750, 950, 1100 și 1600 pb) au fost comune pentru formele parentale (g).

Tabelul 4.6.

Moștenirea ampliconilor în cadrul grupului genetic al hibridului H7

Primer		a	b	c	d	e	f	g
	♀	+	+	-	-	+	-	+
	♂	+	-	+	-	-	+	+
	F ₁	+	+	+	+	-	-	-
UBC250	18	3	0	2	4	1	6	2
OPK17	19	0	0	0	8	0	6	5
OPG05	12	3	0	1	4	2	1	1
OPB10	5	1	0	0	2	0	1	1
OPA2	15	3	0	4	1	5	1	1
A2	8	0	0	0	1	1	4	2
28	11	0	0	1	4	0	4	2
OPA9	13	3	0	0	4	0	0	6
Total	101	13	0	8	28	9	23	20

OPG05: 12 ampliconi cu lungimea între 400-1600 pb, inclusiv câte 6 – la formele parentale și 8- la hibrid. Patru fragmente (400, 600, 900 și 1500 pb) sunt specifice pentru forma hbridă (d), un amplicon (550 pb) – pentru forma ♀ (e), două (650 și 1600 pb) au fost comune formelor parentale. Ampliconii de 450, 750, 1250 și 1500 au fost comuni (a).

OPB10: 5 fragmente (280-1250 pb), inclusiv 2 (♀) și, respectiv, 3 (♂) la formele parentale și 4 – la hibrid. Ampliconul de 800 pb a fost moștenit de la forma ♂ (c). Fragmentele de 450, 500 și 750 au fost comune pentru formele parentale (g).

OPA2: 15 ampliconi (200-1300 pb), câte 9 benzi pentru fiecare genotip. Au fost identificate cinci fragmente specifice pentru genotipul ♀ (200, 250, 350, 400 și 650 pb) (e), 4 – pentru genotipul ♂ (260, 300, 450 și 700 pb) (f), unul pentru genotipul hibrid (1300 pb) (d). Trei ampliconi (500, 750 și 950 pb) au fost comuni (a). Ambele formele parentale posedă ampliconul de 1250 pb, care nu a fost moștenit în F₁ (g).

Oligo A₂: 8 fragmente (280-1250 pb), inclusiv 5 (♀) și, respectiv, 7 (♂) la formele parentale și 5 – la hibrid. Se atestă 3 fragmente (280, 490 și 550 pb) specifice pentru hibrid (d). Ampliconul de 800 pb a fost moștenit de la forma ♂ (c). Patru fragmente (450, 500, 750 și 1100) au fost comune pentru formele parentale (g).

P28: 11 fragmente (280-1250 pb), inclusiv 2 (♀) și, respectiv, 7 (♂) la formele parentale și 5 – la hibrid. Se atestă 4 fragmente (280, 490, 550 și 1200 pb) specifice pentru F₁ (d). Ampliconul de 800 pb a fost moștenit de la forma ♂ (c). Patru fragmente (450, 500, 750 și 1100) au fost comune pentru formele parentale (g).

OPA9: 13 fragmente cu lungimea cuprinsă între 260-2500 pb, inclusiv câte 9 la formele parentale și 7 – la hibrid. A fost atestată prezența a 3 fragmente specifice (450, 850 și 1800 pb) pentru F₁ (d), 7 (300, 400, 500, 700, 950, 1250 și 1950 pb) – pentru genotipul ♀ (e) și 5 (260, 320, 350, 650 și 2500 pb) – pentru genotipul ♂ (f). Un fragment (800 pb) a fost comun pentru formele parentale (g). Ampliconul de 600 pb a fost moștenit de hibrid de la forma ♂ (b), iar fragmentul de 1250 pb – de la genotipul ♀ (c).

➤ **Hibridul H6 cu formele parentale P3 și P10** - șase primeri (Tabelul 4.5).

Tabelul 4.5.

Moștenirea ampliconilor în cadrul grupului genetic al hibridului H6

Primer		a	b	c	d	e	f	g
	♀	+	+	-	-	+	-	+
	♂	+	-	+	-	-	+	+
	F₁	+	+	+	+	-	-	-
OPU11	13	0	1	1	9	2	0	0
UBC251	13	2	1	1	4	2	1	2
OPJ01	11	2	3	0	3	0	0	3
OPB03	18	0	4	0	7	0	3	4
OPG10	13	4	2	0	4	0	1	2
A3	13	0	1	0	5	1	5	1
Total	81	8	12	2	32	5	10	12

OPU11: 13 ampliconi cu lungimea cuprinsă între 300-2500 pb, inclusiv 10 (♀) și, respectiv, 3 (♂) la formele parentale și 2 – la hibrid. Fragmentele de 350, 550, 650, 700, 750, 1000, 1250, 2000, 2100 și 2900 pb au fost specifice – pentru forma ♀ (e), 300 și 500 pb - pentru forma ♂ (f). Ampliconul de 550 pb a fost moștenit de la forma ♀ (b), iar 600 pb - de la ♂ (c).

UBC215: 13 ampliconi (300-2500 pb), inclusiv 8 (♀) și, respectiv, 6 (♂) la formele parentale și 6 – la hibrid. Hibridul relevă manifestarea a 2 fragmente (1000 și 2500 pb) specifice pentru forma hibridă (d), patru (450, 650, 1400 și 1650 pb) – pentru forma ♀ (e) și două (300 și 780 pb) – pentru forma ♂ (f). Un amplicon de 700 pb a fost moștenit de la genotipul ♀ (b), unul

(500 pb) – de la ♂ (c). Ampliconul de 1100 pb a fost comun pentru formele parentale (g), iar fragmentele de 600 și 750 pb au fost comune pentru cele trei forme ale grupului descris (a).

OPJ01: 11 fragmente, inclusiv 8 (♀) și, respectiv, 2 (♂) la formele parentale și 8 – la forma hibridă cu lungimea cuprinsă între 400-1500 pb. Ampliconii de 600, 800 și 1400 pb au fost specifici pentru forma hibridă (d), iar 700, 1000 și 1500 pb – pentru forma ♀ (e). Fragmentele de 400, 500 și 1250 pb au fost moștenite de la genotipul ♀ (b), iar 650 și 850 pb au fost comune în cadrul grupului (a).

OPG10: 13 ampliconi cu lungimea cuprinsă între 400-1800 pb, inclusiv 6 (♀) și, respectiv, 3 (♂) la formele parentale și 6 – la hibrid. 3 ampliconi au fost specifici formei hibride (d). Fragmentele de 400, 500, 1000, 1400, 1500 și 1800 pb au fost moștenite de la genotipul ♀ (e), 750 de la genotipul ♂ (Figura 4.9, B).

OPB03: 18 fragmente cu lungimea cuprinsă între 300-1900 pb, inclusiv 14 (♀) și, respectiv, 3 (♂) la formele parentale și 8 – la hibrid. Se observă ampliconii de 350, 700, 1200 și 1900 pb specifici pentru forma hibridă (d), precum și 300, 600, 650, 1250, 1400, 1500 și 1800 pb – pentru forma ♀ (e). Trei fragmente 400, 500 și 750 pb au fost comune pentru ambele forme parentale (g). Ampliconii de 450, 800, 1000 și 1300 pb au fost moșteniți de la genotipul ♀ (b).

Oligo A3: 13 ampliconi, inclusiv 11 (♀) și, respectiv, 6 (♂) benzi la formele parentale și 2 – la hibrid cu lungimea de la 350 până la 2100 pb. A fost obținut un fragment specific de 1750 pb pentru F₁ (d).

➤ **Hibridul H8 cu formele parentale P15 și P14 - șase primeri (Tabelul 4.7).**

Tabelul 4.7.

Moștenirea ampliconilor în cadrul grupului genetic al hibridului H8

Primer		a	b	c	d	e	f	g
	♀	+	+	-	-	+	-	+
	♂	+	-	+	-	-	+	+
	F ₁	+	+	+	+	-	-	-
OPU11	16	1	4	0	7	2	0	2
A3	11	1	0	0	4	4	0	2
OPJ01	9	2	3	0	2	2	0	0
OPH15	12	3	1	0	2	2	1	3
A2	12	1	2	5	1	0	1	2
OPG10	15	3	0	0	7	3	0	2
Total	75	11	10	5	23	13	2	11

OPU11: 16 fragmente, inclusiv 9 (♀) și, respectiv, 3 (♂) la formele parentale și 13 – la hibrid cu lungimea între 300-2700 pb. Se atestă prezența a 7 fragmente (350, 550, 1000, 1150, 1300, 2500 și 2700) specifice pentru F₁ (d), șase (750, 900, 1250, 1500, 2000 și 2100) – pentru forma ♀ (e). Două benzi (330 și 500) au fost comune pentru formele parentale (g). Benzile de 750, 900, 1250 și 2000 pb au fost moștenite de la forma ♀ (b). Ampliconul de 600 pb a fost comun (a).

Oligo A3: 11 ampliconi cu lungimea cuprinsă între 450-2100 pb, inclusiv 7 (♀) și, respectiv, 3 (♂) la formele parentale și 5 – la hibrid. Fragmentele de 160, 650, 500 și 450 pb au fost specifice pentru forma ♀ (e). Produsele de 1050 și 700 pb au fost comuni pentru formele parentale (g).

OPJ01: 9 ampliconi cu lungimea 400-1250 pb, inclusiv 7 (♀) și, respectiv, 2 (♂) benzi la formele parentale și 7 – la forma hibridă. Două fragmente de 600 și 800 pb au fost specifice pentru hibrid (d), iar 700 și 1100 pb pentru forma ♀ (e).

OPH15: 12 fragmente cu lungimea 200-1300 pb, inclusiv 9 (♀) și respectiv 7 (♂) la formele parentale și 6 - la F₁. În cazul hibridului se atestă 2 fragmente specifice (290 și 1300 pb) (d), de asemenea 350 și 400 – au fost specifice pentru genotipul ♀ (e) și 700 pb – pentru genotipul ♂ (f). Ampliconii de 600, 750 și 850 au fost comuni celor trei genotipuri (a), 200, 500 și 1250 pb - pentru formele parentale (g). Ampliconul de 1200 pb a fost moștenit de la forma ♀ (b).

Oligo A2: 12 ampliconi cu lungimea cuprinsă între 290-1600 pb, inclusiv 3 (♀) și, respectiv, 11 (♂) la formele parentale și 7 – la hibrid. Un amplicon (1400 pb) a fost specific pentru hibrid (d), trei (290, 800 și 1600 pb) – pentru forma ♂ (f). Fragmentele de 400, 600, 1000 și 1450 pb au fost moștenite de la forma ♂ (c). Două fragmnete (450 și 100 pb) au fost comune pentru ambele formele parentale (g). Ampliconul de 900 pb este comun (a).

OPG10: 15 fragmente, inclusiv 8 (♀) și, respectiv, 5 (♂) la formele parentale și 10 – la hibrid (400-2000 pb). Ampliconii de 450, 600 și 750 pb au fost comuni (a), iar fragmentele de 400 și 550 pb au fost comune pentru formele parentale (g). Fragmentele de 900, 1500 și 1800 pb au fost specifice formei ♀ (e), 450, 700, 800, 1000, 1100, 1600 și 2000 pb – pentru F₁ (d).

➤ **Hibridul H9 cu formele parentale P15 și P12** – doi primeri (Tabelul 4.8).

Oligo A2: 12 ampliconi (290-1450 pb), inclusiv 3 (♀) și, respectiv, 10 (♂) la formele parentale și 6 - la forma hibridă. Doi ampliconi (400 și 500 pb) au fost specifici în F₁ (d).

OPG6: 10 ampliconi cu lungimea între 300-1600 pb. Formele parentale prezintă un profil foarte apropiat a fragmentelor de ADN – 7 fragmente comune, variind doar intensitatea acestora.

Moștenirea ampliconilor în cadrul grupului genetic al hibridului H9

Primer		A	b	c	d	e	f	g
	♀	+	+	-	-	+	-	+
	♂	+	-	+	-	-	+	+
F₁		+	+	+	+	-	-	-
A2	12	1	0	3	2	0	4	2
OPG6	10	6	0	0	1	0	1	2
Total	22	7	0	3	3	0	5	4

Pentru hibridul analizat s-au evidențiat 3 fragmente, moștenite de la ambele forme parentale (a) (Figura 4.10).

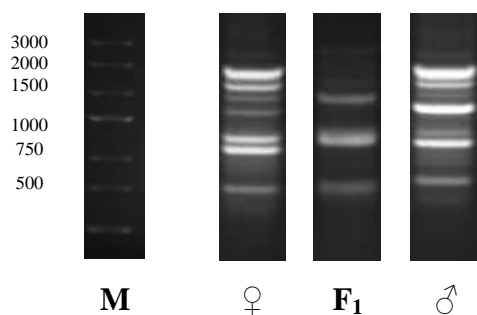


Fig. 4.10. Produsele de amplificare ale grupul genetic H9 cu primerul OPG6.

➤ **Hibridul H10 cu formele parentale P9 și P1 - patru primeri (Tabelul 4.9).**

OPK17: 10 ampliconi, inclusiv 1 (♀) și, respectiv, 5 (♂) benzi la formele parentale și 7 – la hibrid cu lungimea între 150-950 pb. Hibridul relevă prezența a 5 fragmente (150, 300, 450, 600 și 750) specifice (d), forma ♂ – trei (290, 400 și 700 pb) (f). Ampliconul de 350 pb a fost moștenit de la genotipul ♂ (c), în același timp 500 pb a fost comun celor trei fragmente (a).

OPB10: 4 ampliconi, inclusiv 2 (♀) și, respectiv, 3 (♂) la formele parentale și unul – la hibrid, cu lungimea cuprinsă între 500-1200 pb. A fost identificat un fragment de 750 pb specific pentru formele parentale (g), iar ampliconul de 1200 pb – pentru forma ♀ (e), precum și 500 și 950 pb - pentru forma ♂ (f).

OPB01: 6 fragmente, inclusiv unul (♀) și, respectiv, 4 (♂) la formele parentale și 4 – la hibrid, cu lungimea 400-1500 pb. Se atestă 2 produse (900 și 1200 pb) specifice genotipului hibrid (d) și 3 benzi (800, 1000 și 1500 pb) – pentru genotipul ♀ (f). Ampliconul 400 pb a fost comun pentru cele trei genotipuri (a). Fragmentul de 1500 pb a fost moștenit de la ♂ (c).

Tabelul 4.9.

Moștenirea ampliconilor în cadrul grupului genetic al H10

Primer		A	b	c	d	E	f	g
	♀	+	+	-	-	+	-	+
	♂	+	-	+	-	-	+	+
	F₁	+	+	+	+	-	-	-
OPK17	10	1	0	1	5	0	3	0
OPB10	4	1	0	0	0	1	2	0
OPB01	6	1	0	1	2	0	2	0
28	8	0	0	0	4	2	1	1
Total	28	3	0	2	11	3	8	1

P28: 8 ampliconi cu lungimea cuprinsă în intervalul 350-1200 pb, inclusiv 3 (♀) și respectiv 2 (♂) benzi la formele parentale și 4 – la hibrid. Hibridul indică 4 fragmente (490, 550, 800 și 1200) specifice pentru F₁ (d), forma ♀ - două fragmente (450 și 500 pb) (e), forma ♂ - un fragment (350 pb) (f).

Datele din literatura de specialitate relevă faptul că fragmentele RAPD prezintă un comportament de dominanță când sunt urmăriți în descendență [33]. Acest comportament rezultă din faptul că fragmentul amplificat este prezent în gel (ca o alelă dominantă A) sau absent (ca alelă recesivă a)

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

Un număr de 107 de 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 materne, iar în 53- produse caracteristice formelor paterne, rezultate care demonstrează prezența unor gene specifice genitorilor, care nu se moștenesc în F₁. Au fost prezente 64 fragmente amplificate în ambele forme parentale dar absente la hibridii din prima generație (F₁) [32, 34, 166].

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

4.3. Relațiile de înrudire dintre genotipurile cercetate

Estimarea diversității genetice a diferitelor populații, linii, varietăți etc. reprezintă un aspect important în studiile fundamentale, care încearcă să pună 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 în încrucișări pentru obținerea rezultatelor eficiente în cadrul programelor de ameliorare.

Selectarea formelor parentale este un prim pas important în orice program de ameliorare [93]. Astfel, cunoașterea relațiilor de înrudire a genotipurilor de *S. sclarea* din Republica Moldova reprezintă un instrument important în selectarea formelor parentale pentru obținerea hibridilor performanți. În această ordine de idei, diversitatea genetică evaluată în baza RAPD-PCR, realizată prin analiza clusteriană - UPGMA, prezintă o amprentă genetică nespecifică, care este fundamentală în descrierea relațiilor de înrudire dintre genotipurile cercetate și se bazează pe valorile distanței și similarității genetice.

Distanța genetică (DG) reprezintă modalitatea prin care se descrie divergența genetică a două varietăți, populații sau specii distincte prin numărarea substituției alelice per locus, care a avut loc în cadrul fiecărei populații/specii [124]. DG a formelor parentale este considerată un indicator important al performanței hibride [178]. Luând în considerație că manifestarea efectului de heterosis este determinată de diferențele genetice între formele parentale, este necesar ca înainte de a iniția un program de hibridare să fie creată o bază de date privind fondul de gene ale germoplasmei, diferențele ereditare între liniile cosangvinizate, corelațiile între diferențele genetice, performanțele combinațiilor hibride [24]. Numeroase studii au relatat o corelare pozitivă între distanța genetică și superioritatea hibridilor de prima generație [64, 88].

Distanța genetică între formele parentale de *S. sclarea* incluse în studiu a fost cuprinsă în limitele 0,39-1,0. DG minimă s-a constatat între P10, forma paternă a hibridului H6 și P11, forma paternă a hibridului H7 (Tabelul 4.10).

Similaritatea genetică (SG) caracterizează gradul de înrudire a genotipurilor [184]. Apropierea genetică între formele parentale, stabilită pe baza distanțelor genetice și a indicilor de similaritate (Tabelul 4.11) a fost folosită pentru construcția dendrogramelor de repartiție.

Tabelul 4.10.

Distanța genetică dintre formele parentale

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14	P15
P1		0,98	0,83	1,00	0,91	0,85	0,89	0,95	0,83	0,89	0,86	0,85	0,89	0,86	0,88
P2			0,93	0,94	0,92	0,83	0,69	1,00	0,76	0,95	0,92	0,91	0,93	0,95	0,96
P3				0,97	0,58	0,83	0,87	0,95	0,83	0,86	0,89	0,79	0,67	0,66	0,64
P4					0,97	0,95	0,91	1,00	0,90	0,94	0,93	1,00	0,97	0,97	0,96
P5						0,79	0,86	0,96	0,81	0,72	0,76	0,68	0,63	0,66	0,67
P6							0,62	1,00	0,67	0,82	0,82	0,78	0,82	0,80	0,86
P7								1,00	0,65	0,92	0,89	0,81	0,86	0,85	0,90
P8									1,00	0,95	0,92	0,97	0,97	0,96	0,97
P9										0,83	0,81	0,77	0,83	0,79	0,87
P10											0,39	0,63	0,70	0,77	0,78
P11												0,65	0,78	0,77	0,84
P12													0,54	0,59	0,70
P13														0,54	0,47
P14															0,54
P15															

Tabelul 4.11.

Similaritatea genetică a formelor parentale, %

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14	P15
P1		1,6	16,7	0,0	9,5	15,1	11,1	5,3	17,1	11,1	13,6	14,8	11,5	14,1	11,6
P2			6,8	5,9	8,0	16,9	31,2	0,0	24,4	5,1	8,0	9,3	7,0	5,1	4,1
P3				2,7	41,6	16,7	12,8	4,7	17,1	14,0	10,6	20,6	32,8	34,4	35,8
P4					3,2	5,0	9,1	0,0	9,8	5,7	6,7	0,0	3,1	3,5	4,2
P5						20,8	14,2	3,9	19,1	28,1	24,1	32,3	37,0	34,3	33,2
P6							38,1	0,0	33,3	17,6	17,9	21,9	18,2	19,9	13,7
P7								0,0	35,3	8,1	10,8	19,1	14,0	15,4	10,3
P8									0,0	5,3	8,3	3,4	3,1	4,3	2,7
P9										17,1	19,1	23,5	17,1	20,8	13,1
P10											61,4	37,5	29,6	22,7	22,3
P11												34,8	21,9	23,2	16,5
P12													45,8	40,6	30,2
P13														46,3	53,4
P14															46,0
P15															

Cel mai distanțat din punct de vedere genetic este genotipul P8, care în cadrul studiului este utilizat ca formă paternă pentru hibridul H9. Se constată că în majoritatea cazurilor P8 a prezentat un grad de înrudire îndepărtat față de celelalte forme, distanța genetică fiind cuprinsă între 0,92-1,00.

Astfel, clusterizarea a permis gruparea formelor în patru cluster de bază: I, II, III și IV, fiind relevată o diversitate înaltă cu un coeficient cofenetic de corelație (CCC) de 0,92. Se relevă că genotipul P4 a fost repartizat în afara grupurilor de bază formate (Figura 4.11).

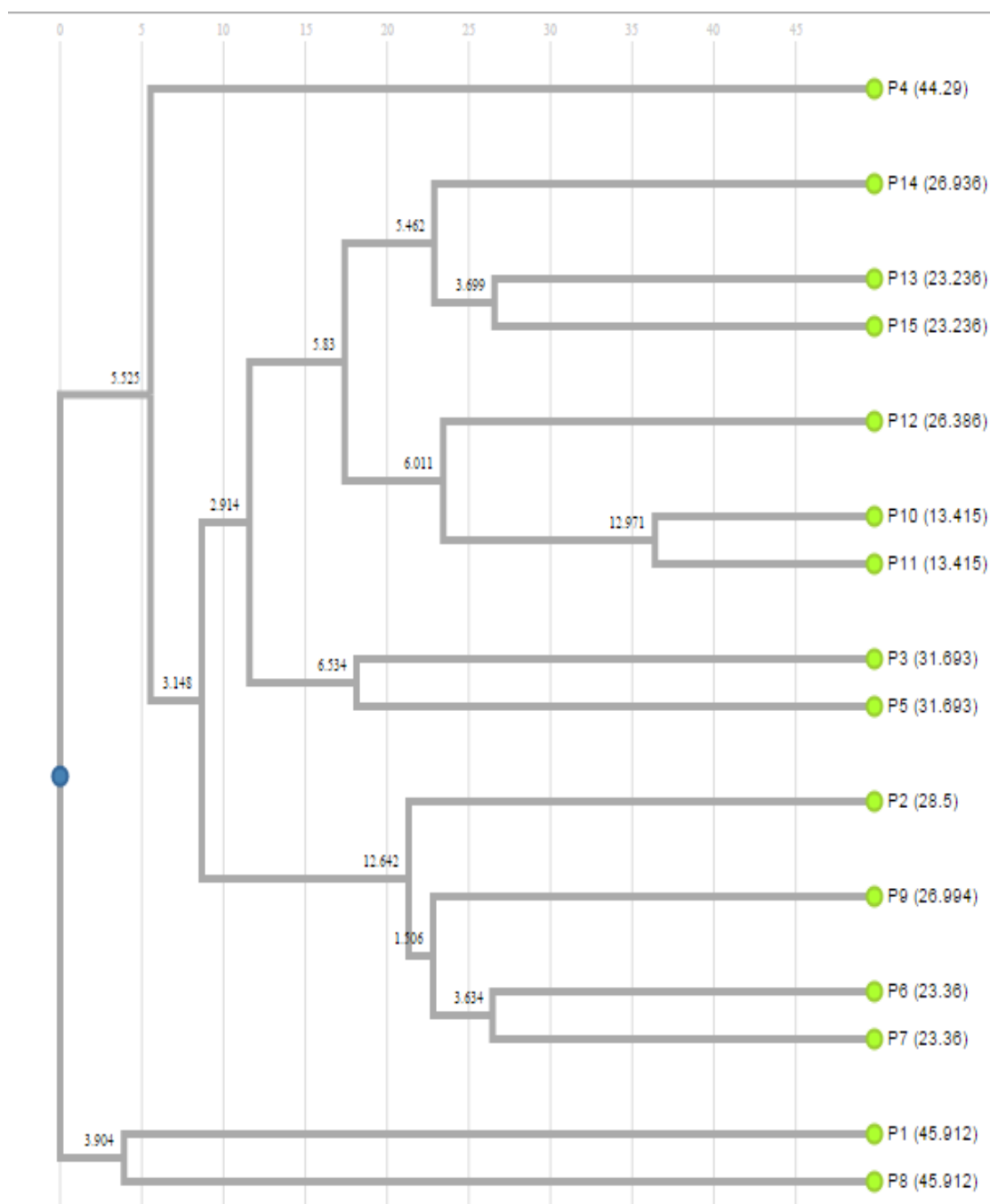


Fig. 4.11. Dendrograma de repartiție a formelor parentale de *S. sclarea*.

Analiza gradului de înrudire al hibrizilor de *S. sclarea* incluși în studiu a pus în evidență o distanță genetică a acestora cuprinsă în limitele 0,50-1,0 (Tabelul 4.12, Tabelul 4.13).

Tabelul 4.12
Distanța genetică dintre hibridi

	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13
H1		0,50	0,59	0,61	0,91	0,61	0,57	0,82	0,89	0,66	0,74	0,74	1,00
H2			0,50	0,61	0,95	0,69	0,73	0,84	1,00	0,63	0,72	0,77	1,00
H3				0,65	0,92	0,63	0,71	0,82	0,98	0,57	0,73	0,79	1,00
H4					0,94	0,56	0,59	0,72	0,92	0,49	0,69	0,68	1,00
H5						0,92	0,89	0,90	0,85	0,92	0,92	0,96	1,00
H6							0,53	0,69	0,89	0,55	0,64	0,64	1,00
H7								0,75	0,80	0,61	0,75	0,69	1,00
H8									0,92	0,70	0,63	0,76	1,00
H9										0,99	0,99	0,87	1,00
H10											0,55	0,65	1,00
H11												0,84	1,00
H12													1,00
H13													

Tabelul 4.13.
Similaritatea genetică dintre hibridi, %

	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13
H1		49,7	40,8	39,3	8,6	39,2	43,0	18,0	11,5	34,0	25,7	26,0	0,0
H2			50,3	39,3	5,3	31,5	26,8	15,7	0,0	37,2	28,0	22,7	0,0
H3				35,5	7,8	37,4	29,1	18,1	1,6	43,5	27,2	21,4	0,0
H4					6,0	43,6	40,7	28,0	7,7	50,6	30,9	32,1	0,0
H5						8,2	11,0	9,9	14,7	8,2	7,9	4,0	0,0
H6							47,3	30,9	11,2	45,0	35,7	35,9	0,0
H7								24,6	19,6	38,7	25,3	31,5	0,0
H8									7,6	29,9	37,2	24,0	0,0
H9										0,8	0,9	13,3	0,0
H10											45,2	35,2	0,0
H11												16,5	0,0
H12													0,0
H13													

Hibridii se grupează în patru grupuri de bază: V, VI, VII și VIII. Cei mai îndepărtați din punct de vedere genetic sunt hibridii H9 și H2, iar H13 a indicat distanța maximă față de toate celelalte genotipuri hibride. Se constată diferențe evidente între formele hibride, cea mai mare valoare a similarității fiind sesizată în cazul hibridilor H3 și H2 – 50,3%, această relație de înrudire se datorează faptului că genotipurile au fost create în baza acelorași linii materne - P1 (Figura 4.12).

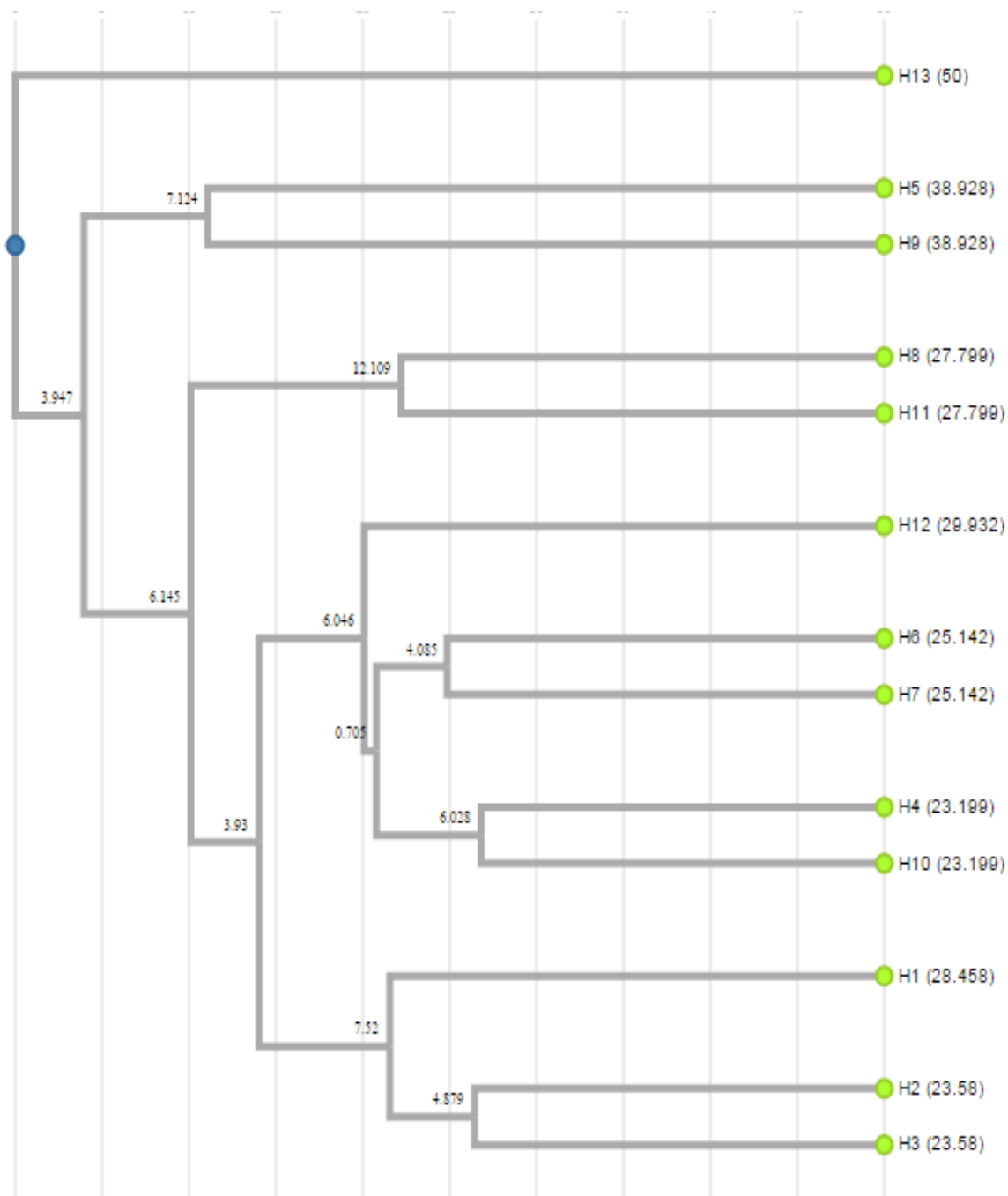


Fig. 4.12. Dendrograma de repartiție a hibridilor de *S. sclarea*.

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. Astfel, cea mai mare DG (1,0) se constată între forma maternă (P1) și cea paternă (P4) a hibridului H3, fiind mai distanțat de 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). O distanță genetică mare (0,97) se constată și între forma maternă (P3) și cea paternă (P4) a hibridului H4 (Tabelul 4.14).

Tabelul 4.14.

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

Denumirea hibridului												
H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13
<i>DG dintre formele parentale</i>												
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
<i>DG dintre hibrid și forma maternă</i>												
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
<i>DG dintre hibrid și forma paternă</i>												
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

DG dintre formele parentale este considerată un indicator important al performanței hibride, fiind relatată o corelare pozitivă între DG și superioritatea hibridilor 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. 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 4.14).

DG calculată în baza indicelui de similaritate în cadrul celor 28 genotipuri de *S. sclarea* a relevat valori de la 0,39 - pentru formele parentale P10 și P11, până la 1,0.

Dendrograma de repartiție evidențiază două cluster de bază: IX și X, fiind relevat un coeficient cofenetic de corelație (CCC) de 0,86. Se constată că formele parentale s-au grupat în primul cluster, iar hibridii în cel de-al doilea cluster.

Se atestă că H13 relevă distanța maximă față de toate celelalte genotipuri analizate ceea ce explică gruparea acestuia înafara clusterelor formate. Situația similiară se atestă și în cazul formelor H9, P1 și P8 (Figura 4.13).

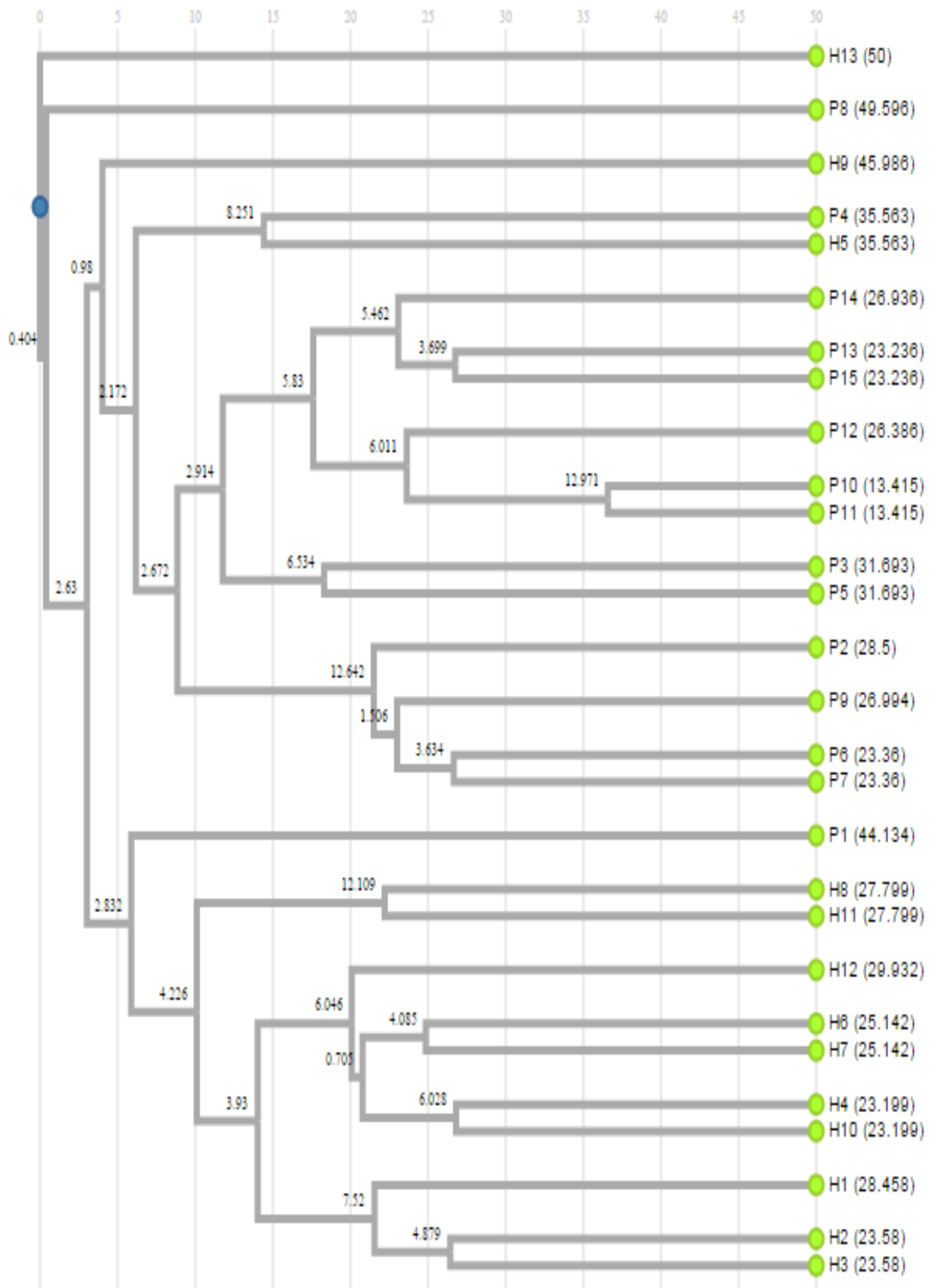


Fig. 4.13. Dendrograma de repartiție a genotipurilor de *S. sclarea*.

Generalizând rezultatele analizei, privind relațiile de înrudire în cadrul genotipurilor de *S. sclarea* se constată că cele mai distanțate din punct de vedere genetic sunt formele parentale ale hibridului H3 și anume formele parentale P1 (forma ♀) și P4 (forma ♂). În același timp o distanță mare față de celelalte genotipuri se sesizează pentru genotipurile P8 (forma ♂ a hibridului H5) și H13. Cele mai apropiate din punct de vedere genetic sunt formele parentale P10 (forma ♂ a hibridului H6) și P11 (forma ♂ a hibridului H7). Hibrizi cei mai apropiați la nivel genetic sunt H3 și H2, această relație se datorează faptului că genotipurile dețin aceeași formă maternă P1.

4.4. Concluzii la capitolul 4

1. Analiza RAPD-PCR realizată în premieră la genotipurile de *S. sclarea* din Republica Moldova a pus în evidență structura genetică complexă a materialului ameliorativ în perspectiva elaborării markerilor specifici.

2. Elaborarea dendrogramelor de repartiție 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. Cea mai mare DG (1,0) se constată între forma maternă (P1) și cea paternă (P4) a hibridului H3 ca un indicator important al performanței hibride și superioritatea hibridului.

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 și manifestarea fenomenului de dominanță completă. 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 F_1 indică fenomenul de recombinare genetică care asigură polimorfismul genetic și variabilitatea ereditară în cadrul genotipurilor analizate.

4. 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 în scopul studierii variabilității genetice a genotipurilor de *S. sclarea*.

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

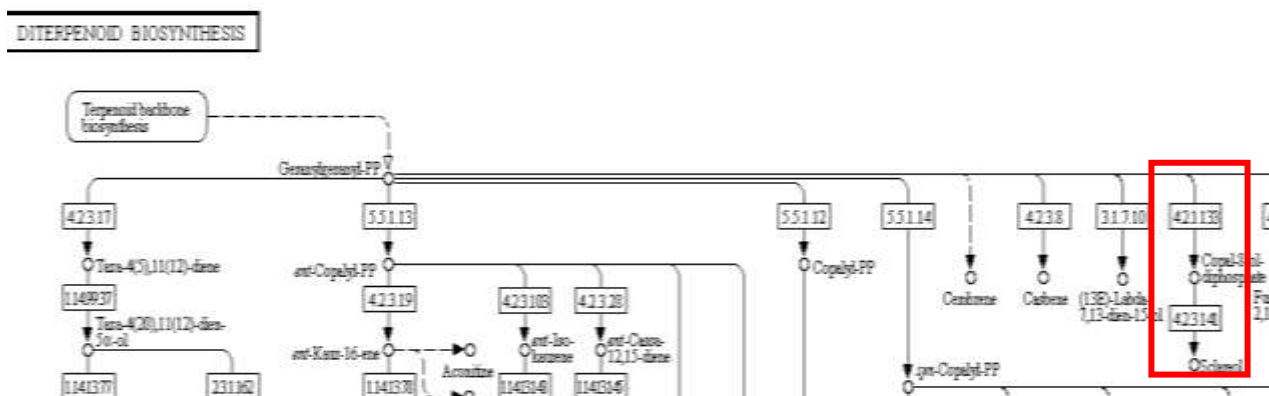
Expresia genică cuprinde ansamblul proceselor genetico-moleculare și biochimice prin care informația ereditară stocată într-o genă este utilizată în sinteza unor molecule funcționale.

Aceste procese se realizează în toate celulele pe baza unui flux informațional, unidirecțional și universal. Expresia genică este, diferită și depinde de diferiți factori biotici, abiotici etc. [37]. 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 mai eficientă și competitivă acestor substanțe *in vitro* sau prin biotehnologii moderne.

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

Sclareolul, compus natural important pentru industria parfumerică [83], are o structură extrem de complexă, care limitează posibilitățile de obținere pe cale industrială printr-un proces ieftin de sinteză artificială [60]. 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*.

La nivel molecular punctul start din mecanismul de sinteză a sclareolului este geranilgeranil pirofosfatul (*GGPP*) – substrat universal pentru grupul de compuși din clasa diterpenelor [267]. Biosinteza continuă în cascadă, cu implicarea consecutivă a două enzime (Figura 5.1).



http://www.kegg.jp/kegg-bin/show_pathway?ec00904+4.2.3.141

Fig. 5.1. Calea metabolică de sinteză a diterpenelor, baza de date KEGG.

Prima enzimă este lambda-13-en-8-ol difosfat sintaza, codificată de gena *LPPS* [60], care asigură formarea unei diterpene intermediare - lambda-13-en-8-ol. A doua enzimă este sclareol sintaza, codificată de gena *SsSS* [226] implicată în sinteza sclareolului [85] (Figura 5.2).

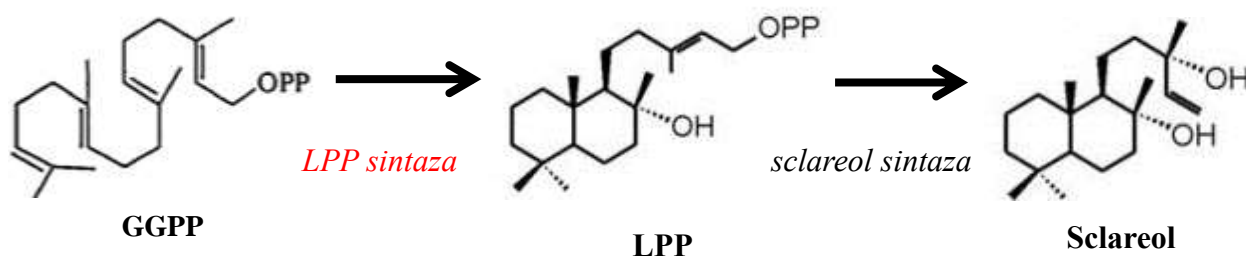


Fig. 5.2. Calea metabolică de sinteză a sclareolului.

Utilizând secvențele genelor care codifică enzimele studiate: *AET21246 Salvia sclarea sclareol synthase* (ebi.ac.uk/ena/data/view/AET21246) [60] și *AFU61897 Salvia sclarea lambda-13-en-8-ol diphosphate synthase* (ebi.ac.uk/ena/data/view/AFU61897) [226] au fost elaborați primeri specifici.

În reacția Real-Time PCR au fost puse în evidență rezultate pentru gena responsabilă de sinteza lambda-13-en-8-ol difosfat sintazei. Amplificarea cu secvențele de primeri specifici pentru gena *LPPS* a generat un singur amplicon cu dimensiunea de aproximativ 133 pb pentru toate genotipurile incluse în studiu (Figura 5.3) [89].

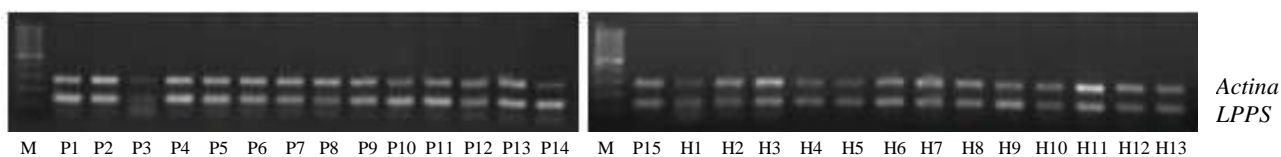


Fig. 5.3. Profilul de expresie obținut cu primeri specifici pentru *LPPS* și gena de referință *actina* (M - 100 bp Ladder; P 1 - 16 forme parentale; H 1 - 13 hibrizi).

Analiza nivelului de expresie al genei *LPPS* pentru cele 15 forme parentale și 13 hibrizi a permis constatarea unui conținut de transcripți ce a variat de la 0,024 unități convenționale (P8) până la 5,92 (H9), cu o medie de $2,33 \pm 0,18$ (Tabelul 5.1, Figura 5.4).

Cel mai mare conținut de transcripți al genei *LPPS* fost remarcat în cazul hibridului H9, urmat de H10 și H3.

Tabelul 5.1.
Nivelul de expresie al genei *LPPS* (u.c.) la genotipurile de *S. sclarea*

Nr.	Genotip	Gena LPPS				
		Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3	Rep. 4	$\bar{X} \pm s_{\bar{x}}$
1.	H1	2,51	2,72	2,51	2,26	2,50±0,09
2.	H2	3,51	3,67	3,24	3,57	3,50±0,09
3.	H3	5,59	4,87	4,99	5,75	5,30±0,22
4.	H4	1,38	0,59	0,75	1,29	1,00±0,12
5.	H5	1,25	1,15	1,07	1,34	1,20±0,06
6.	H6	3,30	3,01	3,00	2,70	3,00±0,12
7.	H7	0,25	0,34	0,34	0,28	0,30±0,02*
8.	H8	5,19	5,26	5,38	4,18	5,00±0,28
9.	H9	5,88	5,92	5,56	5,84	5,80±0,08
10.	H10	5,83	5,09	5,89	5,19	5,50±0,21
11.	H11	3,27	3,00	2,98	2,75	3,00±0,11
12.	H12	2,31	2,20	2,44	2,25	2,30±0,05
13.	H13	2,55	2,54	2,58	2,33	2,50±0,06
14.	P1	5,20	5,36	5,36	4,08	5,00±0,31
15.	P2	4,67	3,85	4,10	4,10	4,18±0,17
16.	P3	0,64	0,68	0,73	0,60	0,66±0,03
17.	P4	0,32	0,34	0,36	0,38	0,35±0,01**
18.	P5	0,62	1,21	1,12	1,05	1,00±0,13
19.	P6	1,51	1,74	1,74	1,03	1,50±0,17
20.	P7	0,60	0,64	0,68	0,68	0,65±0,02*
21.	P8	0,12	0,02	0,38	0,28	0,20±0,08
22.	P9	0,94	0,88	0,83	1,00	0,91±0,04
23.	P10	0,41	0,36	0,43	0,38	0,39±0,02*
24.	P11	0,94	1,07	1,00	1,00	1,00±0,03
25.	P12	0,60	0,64	0,68	0,56	0,62±0,03
26.	P13	0,53	0,56	0,53	0,64	0,56±0,03
27.	P14	5,31	4,98	4,67	5,66	5,15±0,21
28.	P15	2,16	2,03	2,30	2,46	2,24±0,09
S_{x̄}		S_{x̄} = 0,18				
Media ± S_{x̄}		2,333±0,18				
Minimum		0,02				
Maximum		5,92				
Varianța, s²		3,52				
V, %		80,42				

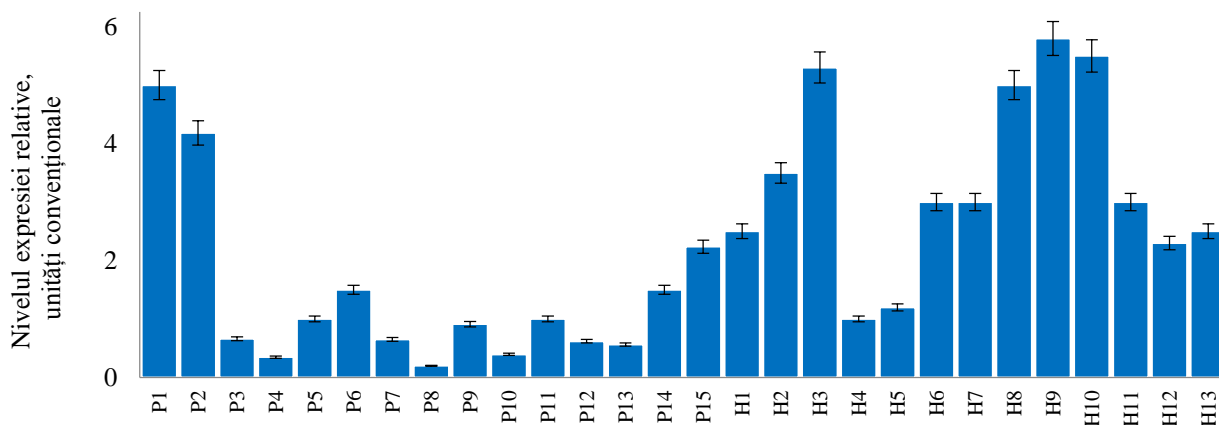


Fig. 5.4. Nivelul de expresie al genei *LPPS* în cadrul genotipurilor de *S. sclarea*.

Un nivel transcripțional mai scăzut se atestă în cazul formelor parentale, cu o medie de $1,63 \pm 0,22$, cu toate acestea formele P1 și P2 au evidențiat o cantitate sporită, comparativ cu celelalte genotipuri.

Variația valorilor înregistrate este de 3,5. În același timp, datele se grupează în cinci intervale, iar poligonul frecvențelor arată o distribuție asimetrică pe stânga (Figura 5.5).

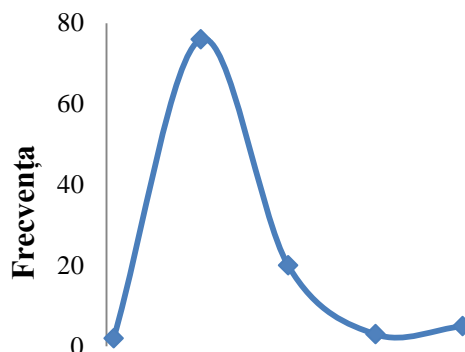


Fig. 5.5. Gruparea pe intervale și distribuția datelor de expresie al genei *LPPS*.

Gradul de omogenitate al datelor înregistrate privind expresia genei *LPPS* a arătat o valoare de 80,42% pentru toate genotipurile, respectiv, 98,28% pentru formele parentale și 56,07% pentru hibrizi. Astfel, rezultatele obținute demonstrează o eterogenitate înaltă a genotipurilor de *S. sclarea*.

În concluzie, în cadrul cercetărilor a fost determinat în premieră nivelul de expresie al genei *LPPS* responsabilă de sinteza lambda-13-en-8-ol difosfat sintazei pentru 28 de genotipuri

de *S. sclarea* din Republica Moldova. Cel mai mare nivel de transcripți se constată în cazul hibridilor H9, H10 și H3.

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

Acidul rozmarinic este un acid polifenolcarboxilic pe larg răspândit în regnul vegetal, care conferă aromă și manifestă un număr variat de activități biologice, inclusiv antibacteriană, antioxidantă, antiinflamatoare, antivirală etc. [145]. Procesul de biosinteză a acidului se realizează în baza a două căi metabolice (fenilpropanoidică și a derivaților tirozinei) (Figura 5.6) [167, 270].

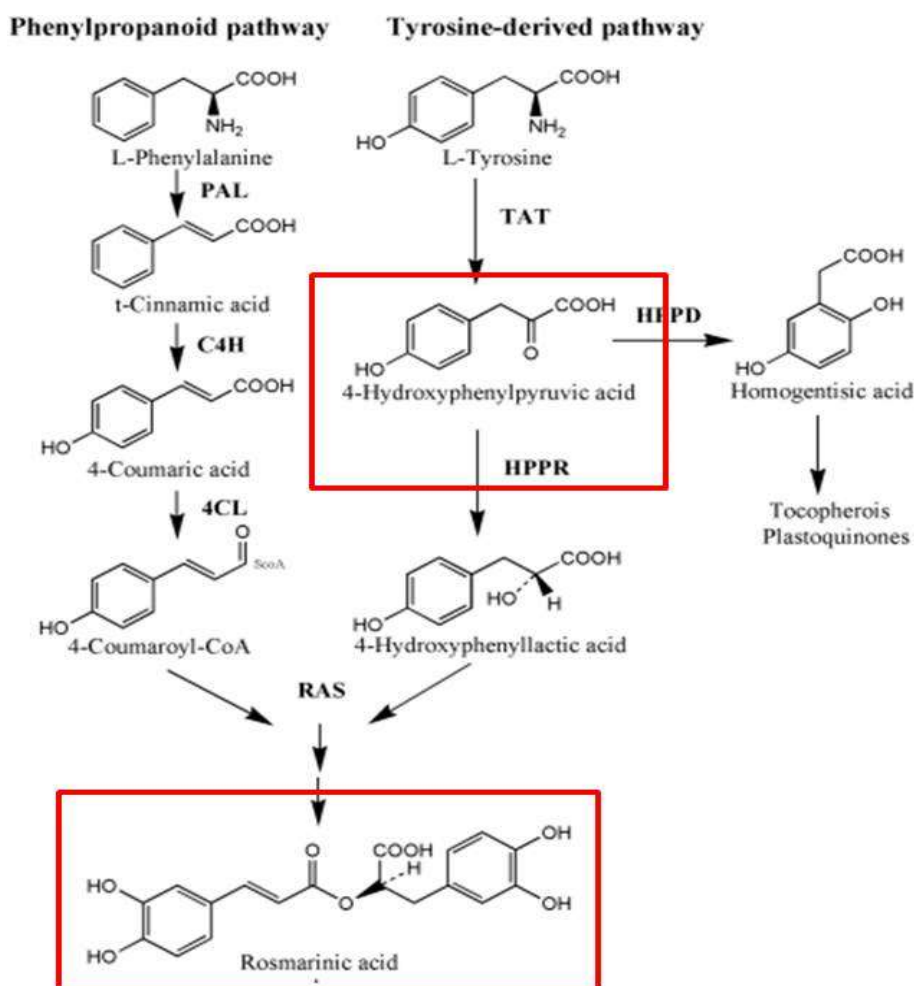


Fig. 5.6. Cea metabolică de sinteză a acidului rozmarinic [265].

Enzimologia și reglarea biosintezei acidului rozmarinic sunt intens studiate, un rol important în acumularea AR, revenind hidroxifenilpiruvat reductazei [56], codificată de gena *HPPR-Salvia miltiorrhiza hidroxifenilpiruvat reductaza mRNA, complete cds* [280].

Amplificarea Real-Time PCR cu primeri specifici pentru gena de interes – *HPIPR*, a generat un profil comun de 138 pb pentru toate cele 28 genotipuri de șerlai, similar celui identificat la *Salvia miltiorrhiza* [261, 270].

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 5.7, Tabelul 5.2) [171].

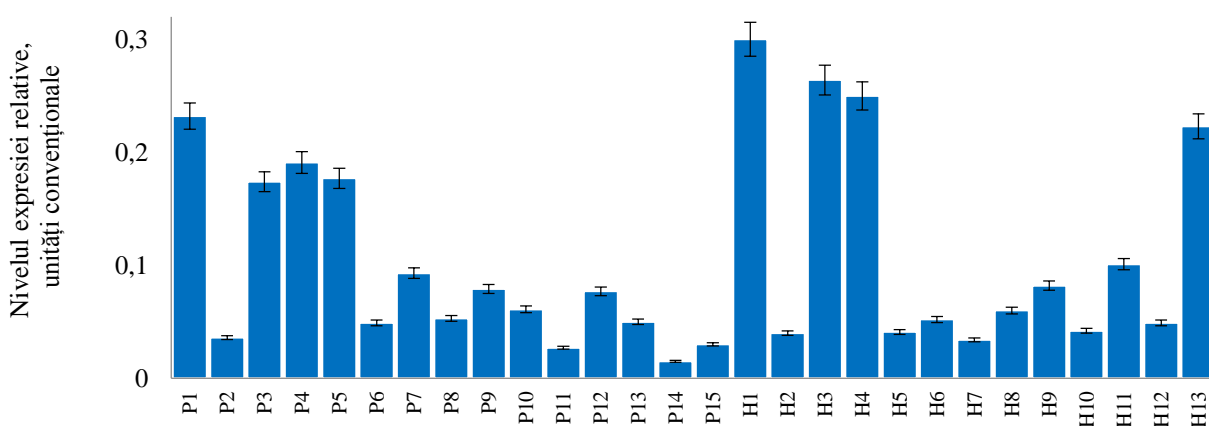


Fig. 5.7. Nivelul de expresie al genei *HPPR* în cadrul genotipurilor de *S. sclarea*.

Variația valorilor înregistrate este de 0,007, datele au fost grupate în nouă intervale, poligonul frecvențelor arată o distribuție asimetrică puternic pe stânga (Figura 5.8). Coeficientul de variație al valorilor a fost de 83,16%, respectiv, 76,32% pentru formele parentale și 85,74% pentru hibrizi.

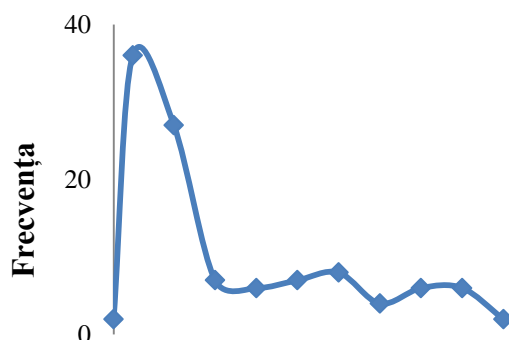


Fig. 5.8. Gruparea pe intervale și distribuția datelor de expresie al genei *HPPR*.

Tabelul 5.2.

Nivelul de expresie al genei *HPPR* (u.c.) la genotipurile de *S. sclarea*

Nr.	Genotip	Gena LPPS				
		Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3	Rep. 4	$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$
1.	H1	0,32	0,26	0,28	0,34	0,30±0,02
2.	H2	0,03	0,04	0,04	0,05	0,04±0,01
3.	H3	0,28	0,26	0,24	0,28	0,27±0,01
4.	H4	0,26	0,23	0,23	0,28	0,25±0,01
5.	H5	0,05	0,03	0,04	0,05	0,04±0,004
6.	H6	0,06	0,04	0,04	0,07	0,05±0,001*
7.	H7	0,03	0,02	0,03	0,03	0,03±0,002
8.	H8	0,04	0,03	0,04	0,05	0,04±0,003
9.	H9	0,13	0,09	0,15	0,16	0,13±0,02
10.	H10	0,04	0,04	0,04	0,06	0,04±0,01
11.	H11	0,06	0,06	0,08	0,08	0,07±0,01
12.	H12	0,04	0,05	0,06	0,07	0,05±0,01
13.	H13	0,20	0,21	0,20	0,28	0,22±0,02
14.	P1	0,19	0,26	0,28	0,20	0,23±0,02
15.	P2	0,03	0,04	0,05	0,03	0,04±0,004
16.	P3	0,17	0,20	0,20	0,13	0,17±0,02
17.	P4	0,20	0,24	0,16	0,17	0,19±0,02
18.	P5	0,16	0,15	0,18	0,23	0,18±0,02
19.	P6	0,05	0,04	0,05	0,06	0,05±0,003
20.	P7	0,09	0,07	0,10	0,11	0,09±0,01
21.	P8	0,06	0,04	0,05	0,07	0,05±0,01
22.	P9	0,08	0,09	0,09	0,05	0,08±0,01
23.	P10	0,08	0,05	0,07	0,05	0,06±0,01
24.	P11	0,02	0,02	0,03	0,03	0,03±0,002
25.	P12	0,11	0,11	0,12	0,11	0,11±0,003
26.	P13	0,06	0,04	0,05	0,06	0,05±0,01
27.	P14	0,02	0,02	0,02	0,01	0,02±0,001*
28.	P15	0,03	0,03	0,02	0,03	0,03±0,002
S_x		S_x = 0,009				
Media		0,104±0,008				
Minimum		0,01				
Maximum		0,34				
Varianța, s²		0,007				
V, %		83,16				

În concluzie, în cadrul cercetărilor a fost determinat în premieră pentru *S. sclarea* nivelul de expresie al genei *HPPR*, responsabilă de sinteza hidroxifenilpiruvat reductazei. Cel mai mare nivel de transcripți se constată în cazul hibrizilor H1, H3 și H4.

5.3. Aspecte privind expresia genelor în cadrul grupurilor genetice studiate

În rezultatul studiului, a fost constatat un nivel mediu relativ mai mic al expresiei ambelor gene studiate pentru formele parentale comparativ cu hibrizii:

LPPS: formele parentale - $1,63 \pm 0,02$ și hibrizii $3,15 \pm 0,25$,

HPPR: formele parentale - $0,09 \pm 0,01$ și hibrizii $0,12 \pm 0,01$.

Expresia genei *LPPS* implicată în calea metabolică a sclareolului. Studiul datelor de expresie a genei *LPPS* în cadrul celor 13 grupuri genetice, a permis constatarea în majoritatea cazurilor (11 din 13) a unei capacități transcripționale sporite (Figura 5.9, Tabelul 5.3).

Calcularea valorilor heterozisului în baza mediei formelor parentale (MPH) a evidențiat nouă hibrizi (H4, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12 și H13), cele mai mari valori fiind atestate de hibridul H6 (246), urmat de H9 (132).

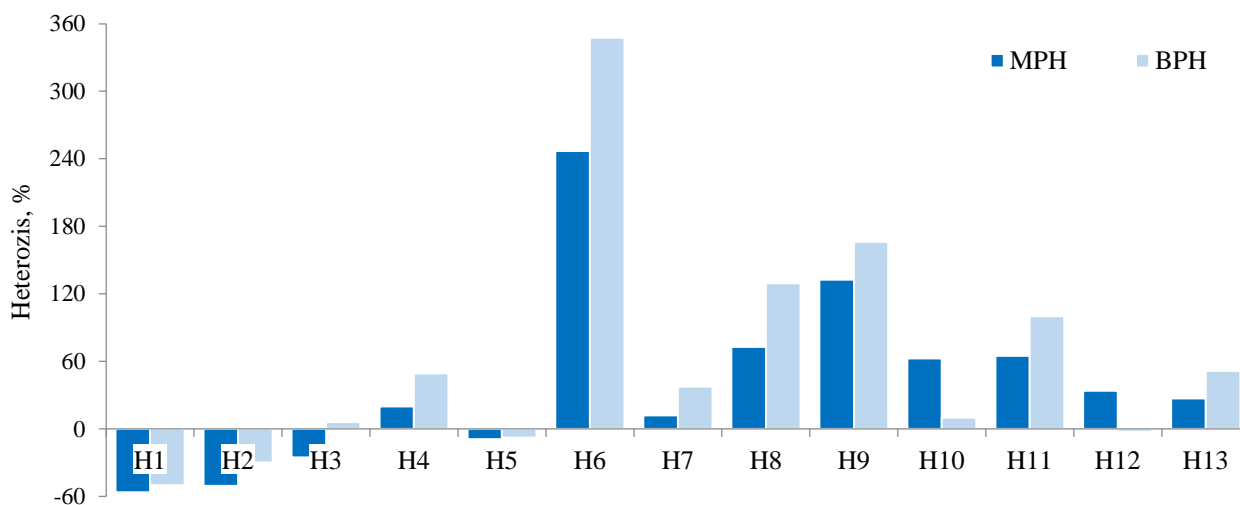


Fig. 5.9. Nivelul efectului heterozis pentru conținutul de transcripți ai genei *LPPS*.

Un nivel pozitiv al efectului de heterozis după indicatorul cel mai bun părinte (BPH) a fost constatat pentru nouă hibrizi (H3, H4, H6, H7, H8, H9, H10, H11 și H13) valorile cele mai mari, fiind constatate, în cazul aceluiași grupuri ca și după primul indicator descris - hibridul H6 (247), urmat de H9 (166).

Tabelul 5.3.
Nivelul de expresie al genei *LPPS* în cadrul grupurilor genetice de *S. sclarea*

GRUP GENETIC	♀	♂	F₁ - F₂
1. [<i>S. s. Turkmen/N S₇ x (K-36 x 0-41) F₂ x 0-19)F₁ x 0-22) B₄ x L-15)F₈]</i> F₁	5,00	1,50	2,50
2. [<i>S. s. Turkmen/N S₇ x (S-1122 528 S₃ x K-50) F₁ x 0-48)F₆]</i> F₁	5,00	4,18	3,50
3. [<i>S. s. Turkmen/N S₇ x (Rubin x S1122 9S₃)F₁ x (0-56 x V-24) F₁)F₇]</i> F₁	5,00	0,35	5,30
4. [(<i>V-24-86 809 S₃ x 0-33 S₆) F₇ x (Rubin x S1122 9S₃)F₁ x (0-56 x V-24)F₁)F₇]</i> F₁	0,66	0,35	1,00
5. [(<i>V-24-86 809 S₃ x 0-33 S₆) F₇ x (S1122 528 S₃ x S. s. Tian-Shan/sud) F₅ x S. s. Tian-Shan/sud) B₅]</i> F₁	0,66	0,20	1,20
6. [(<i>V-24-86 809 S₃ x 0-33 S₆) F₇ x Cr. p. 160 S₁₁]</i> F₁	0,66	0,40	3,00
7. [<i>M-69 655 S₉ x (S-1122 528 S₃ x (Rubin x S-786)F₁ x (0-33 S₃ x L-15) F₇) F₇]</i> F₁	2,24	1,00	3,00
8. [<i>M-69 655 S₉ x (K-36 x 0-41)F₂₀₋₁₉)F₁ x L-15) B₅]</i> F₁	2,24	2,00	5,00
9. [<i>M-69 655 S₉ x (M-69 429-82 S₃ x 0-40 S₅) F₇]</i> F₁	2,24	0,62	5,80
10. [<i>Cr. p. 11 S₁₁ x (S. s. Turkmen/N S₇)</i> F₁	0,91	5,00	5,50
11. [(<i>K-36 x 0-41) F₂ x 0-19)F₁ x 0-22) B₄ x L-15)] F₇ x (M-44S₄ x L-15) F₁ x L-15)] B₆]</i> F₂	1,50	0,65	3,00
12. [(<i>K-50)F₅ x S 1122(102+113)F₂ x K-43) F₄ x (0-57 S₅x0-21S₄) F₈]</i> F₂	0,56	1,50	2,30
13. [(<i>M-55+130 S₄ x (K-44 x L-15) F₂ x 0-47) F₆ x (M-44 S₄ x L-15) F₁ x L-15) B₆]</i> F₂	1,00	0,65	2,50
Media	1,63±0,22		3,15±0,25
Minimum	0,02		0,25
Maximum	5,66		5,92
Varianța, s²	2,84		3,11
V, %	98,28		56,07

Un efect negativ al efectului de heterozis (conform celor doi indicatori analizați) se atestă pentru hibridii H1 (-56) și H2 (-50), care dețin forma maternă comună – P3, formă parentală care a prezentat un nivel înalt al conținutului de transcripți. Rezultatele obținute în cadrul celor 13 grupuri genetice analizate, a permis constatarea, în majoritatea cazurilor, a unei capacități transcripționale sporite la hibridi (H4, H6, H7, H8, H9, H10, H11 și H13), comparativ cu formele parentale ale acestora.

Expresia genei *HPPR* implicată în biosinteza acidului rozmarinic. În rezultatul estimării nivelului de transcripți ai genei *HPPR* a fost evidențiat un efect pozitiv al heterozisului în cazul a cinci hibrizi (H1, H8, H9, H10 și H11), conform indicatorului media părinților. Cele mai mari valori au fost marcate de hibridul H9, urmat de H10. Un efect pozitiv al heterozisului conform indicatorului cel mai bun părinte, a fost înregistrat în cazul a șapte hibrizi (H1, H3, H4, H8, H9, H10 și H12). Cele mai mari valori au fost constatate în cazul hibridului H8 (33), urmat de H4 (31) și H1 (29) (Figura 5.10, Tabelul 5.4).

Astfel, în cadrul studiului a fost determinat, pentru prima dată, nivelul de expresie al genei *HPPR* responsabile de sinteza hidroxifenilpiruvat reductazei la specia *S. sclarea*, cele mai mari valori a activității transcripționale relevându-se la H9, H10 și H1. Estimarea expresiei evidențiază șase hibrizi (H1, H3, H4, H8, H9 și H10) cu o capacitate transcripțională sporită, comparativ cu formele parentale ale acestora.

Datele de expresie atestă că, în cadrul grupului genetic H2, forma maternă (P1) exprimă un nivel mai înalt de transcripți față de forma paternă și hibrid, în ambele cazuri. Aceeași situație este relevantă și în cazul grupurilor H1 (P1) – pentru LPPS, precum și H5 și H6 (P3) – pentru *HPPR*. Grupul H10, prezintă un nivel mai înalt de transcripți la P1, în cazul genei *HPPR*.

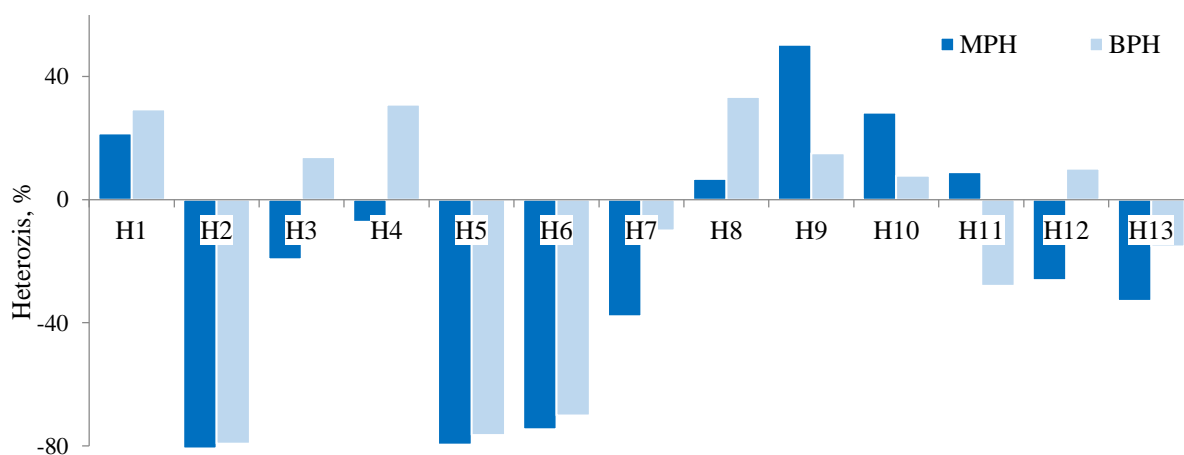


Fig. 5.10. Nivelul efectului heterozis pentru conținutul de transcripți ai genei *HPPR*.

Tabelul 5.4.
Nivelul de expresie al genei *HPPR* în cadrul grupurilor genetice de *S. sclarea*

<i>Grup genetic</i>	♀	♂	F₁ - F₂
1. [<i>S. s. Turkmen/N S₇ x (K-36 x 0-41) F₂ x 0-19)F₁ x 0-22) B₄ x L-15)F₈] F₁</i>	0,23	0,02	0,30
2. [<i>S. s. Turkmen/N S₇ x (S-1122 528 S₃ x K-50) F₁ x 0-48)F₆] F₁</i>	0,23	0,04	0,04
3. [<i>S. s. Turkmen/N S₇ x (Rubin x S1122 9S₃)F₁ x (0-56 x V-24) F₁)F₇] F₁</i>	0,23	0,19	0,26
4. [(V-24-86 809 S ₃ x 0-33 S ₆) F ₇ x (Rubin x S1122 9S ₃)F ₁ x (0-56 x V-24)F ₁)F ₇] F ₁	0,17	0,19	0,25
5. [(V-24-86 809 S ₃ x 0-33 S ₆) F ₇ x (S1122 528 S ₃ x <i>S. s. Tian-Shan/sud</i>) F ₅ x <i>S. s. Tian-Shan/sud</i>) B ₅] F ₁	0,17	0,05	0,04
6. [(V-24-86 809 S ₃ x 0-33 S ₆) F ₇ x <i>Cr. p. 160 S₁₁</i>] F ₁	0,17	0,06	0,05
7. [<i>M-69 655 S₉ x (S-1122 528 S₃ x (Rubin x S-786)F₁ x (0-33 S₃ x L-15) F₇) F₇] F₁</i>	0,03	0,03	0,03
8. [<i>M-69 655 S₉ x (K-36 x 0-41)F₂₀₋₁₉)F₁ x L-15) B₅] F₁</i>	0,03	0,02	0,04
9. [<i>M-69 655 S₉ x (M-69 429-82 S₃ x 0-40 S₅) F₇] F₁</i>	0,03	0,11	0,13
10. [<i>Cr. p. 11 S₁₁ x (S. s. Turkmen/N S₇) F₁</i>	0,08	0,23	0,25
11. [(K-36 x 0-41) F ₂ x 0-19)F ₁ x 0-22) B ₄ x L-15)] F ₇ x (M-44S ₄ x L-15) F ₁ x L-15)] B ₆] F ₂	0,02	0,09	0,07
12. [(K-50)F ₅ x S 1122(102+113)F ₂ x K-43) F ₄ x (0-57 S ₅ x0-21S ₄) F ₈] F ₂	0,05	0,05	0,06
13. [(M-55+130 S ₄ x (K-44 x L-15) F ₂ x 0-47) F ₆ x (M-44 S ₄ x L-15) F ₁ x L-15) B ₆] F ₂	0,18	0,09	0,15
Media	0,09±0,009		0,12±0,01
Minimum	0,02		0,01
Maximum	0,28		0,34
Varianța, s²	0,005		0,010
V, %	76,32		85,74

5.4 Concluzii la capitolul 5

1. În cercetările efectuate a fost determinat nivelul de expresie al genei *LPPS* responsabilă de sinteza lambda-13-en-8-ol difosfat sintazei, implicată în sinteza sclareolului, precum și nivelul de expresie al genei *HPPR* responsabilă de sinteza hidroxifenilpiruvat reductazei din calea metabolică a acidului rozmarinic.

2. Rezultatele obținute evidențiază hibridul H3 cu valori înalte ale activității transcripționale ale genelor studiate, precum și H9 și H10 (*LPPS*), respectiv H3 și H4 (*HPPR*).

3. Gradul de omogenitate al rezultatelor au indicat o valoare de 80,42%, respectiv, 98,28 % pentru formele parentale și 56,07% pentru hibridii luați în cercetare în cazul genei *LPPS*. Pentru gena *HPPR* aceasta a constituit 83,16%, respectiv 76,32% la formele parentale și 85,74% la hibridi . Datele obținute au pus în evidență o eterogenitate înaltă a genotipurilor de *S. sclarea*.

4. Analiza nivelului expresiei genelor studiate a permis relevarea unui conținut mai mare a nivelului de transcripți la cei 13 hibridii, comparativ cu cele 15 forme parentale de *S. sclarea* incluse în studiu.

5. Se constată o capacitate transcripțională sporită în cazul a cinci (H3, H4, H8, H9 și H10) dintre cei 13 hibridi cercetați, comparativ cu formele parentale ale acestora.

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

Valoarea și proprietățile fitoterapeutice ale PMA depind de conținutul compușilor bioactivi, care variază în funcție de genotip, de arealul de creștere, de 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 – 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).

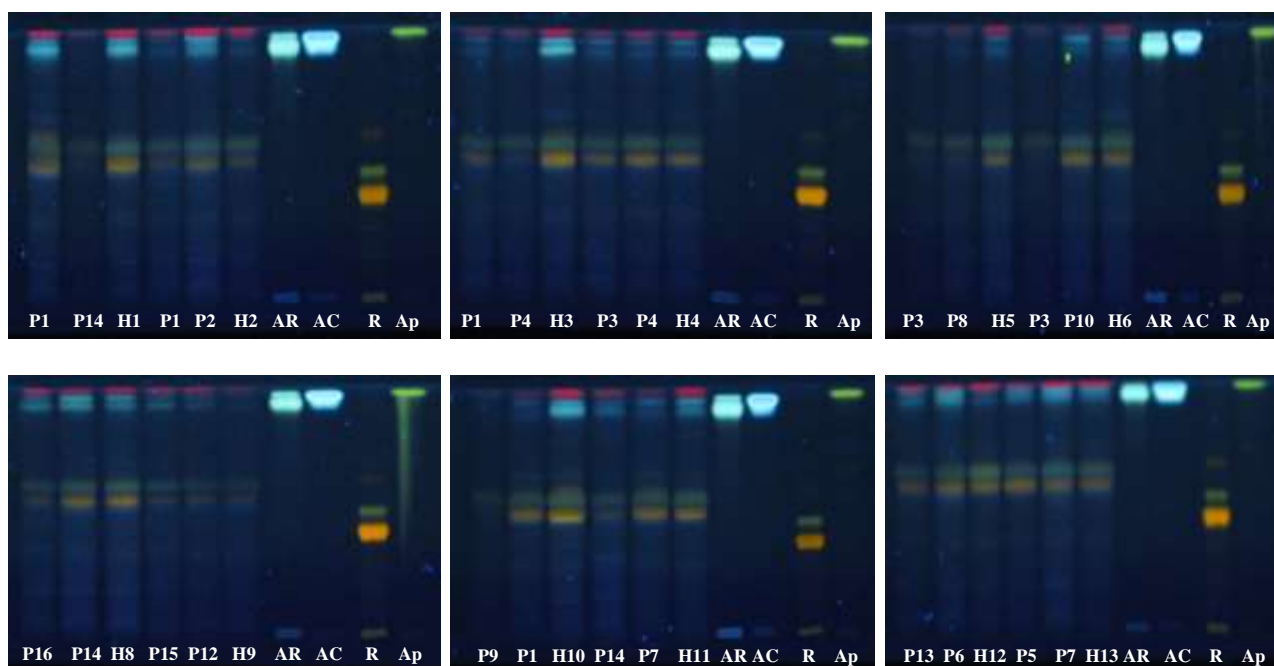


Fig. 6.1. Cromatograma derivaților polifenolici la genotipurile de *S. sclarea*.
(probe *S. sclarea*: P1-P15 forme parentale, H1-H13 hibrizi;
etaloane: acid rozmarinic - AR, acid cafeic - AC, rutozidă -R, apigenină -Ap).

Examinarea profilurilor compușilor polifenolcarboxilici, care s-au vizualizat în cromatogramele în formă de spoturi (benzi) de culoare azurie până la albastră, a relevat prezența acestora la toate genotipurile analizate (Figura 6.1).

În baza cromatogramelor obținute, pentru o descriere mai detaliată a genotipurilor investigate și confirmarea rezultatelor calitative, au fost elaborate densitogramele corespunzătoare acestora (Figura 6.2.).



Fig. 6.2. Densitograma (*ImageJ*) și profilul CSS a acidului cafeic (A), acidului rozmarinic (B), rutozidei (C) și apigeninei (D).

Acidul rozmarinic este un compus polifenolic cu o activitate antioxidantă puternică, ce se găsește în speciile genului *Salvia*, compusul fiind analizat prin aplicarea unui șir de metode, care cel mai frecvent se bazează pe separarea cromatografică și detectarea ulterioară a componentelor. Cromatografia în strat subțire (CSS) a fost aplicată în mai multe studii pentru determinarea prezenței acidului în extractele vegetale. În literatura de specialitate se atestă că APC, în special acidul rozmarinic, dar și acidul cafeic au fost identificați, prin CSS la un șir de PMA precum specii din genul *Satureja* (*S. sahendica*, *S. khuzestanica*, *S. mutica*, *S. rechingeri*, *S. edmondi*, *S. bakhtiarica*, *S. spiugera*, *S. laxiflora*) [92], specii din genul *Micromeria* (*M. croatica*, *M. juliana* and *M. thymifolia*) [257] *Orthosiphon stamineus* [42] etc., astfel metodă fiind utilizată pe larg pentru studierea compușilor polifenolici.

Analiza genotipurilor de *S. sclarea* din Republica Moldova a permis constatarea unei intensități maxime a benzilor corespunzătoare a acidului cafeic și acidului rozmarinic la hibridii H3, H8 și H10, precum și la formele parentale P6, P7 și P8 (Tabelul 6.1). Acest efect este corelat cu o cantitate sporită a compușilor respectivi.

Tabelul 6.1.

Intensitatea benzilor cromatografice a APC la genotipurile de *S. sclarea*

	<i>Forme parentale</i>															<i>Hibridi</i>												
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P12	P13	P14	P15	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H8	H9	H10	H11	H12	H13		
A																												
B																												

A - acid rozmarinic; B - acid cafeic

	intensitate mare		intensitate medie			intensitate mică
--	------------------	--	-------------------	--	--	------------------

Hibridul H9 a prezentat un profil foarte apropiat (după intensitatea benzilor relevante) față de profilurile formelor parentale. O intensitate minimă a fost atestată la forma parentală P1.

Capacitatea biosintetică sporită a hibridilor, comprativ cu formele parentale se manifestă în cazul hibridilor H3, H4, H5, H8 și H9 (pentru toți compușii analizați) (Tabelul 6.2).

Studiul fitochimic asupra compușilor flavonici a permis constatarea rutozidei și apigeninei în toate extractele de *S. sclarea* (Figura 6.1 și Figura 6.2).

Intensitatea benzilor cromatografice a APC în cadrul grupurilor genetice

	Hibrizi de <i>S. sclarea</i>											
	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H8	H9	H10	H11	H12	H13
A												
B												

A - acid rozmarinic; B - acid cafeic;

hibridi cu capacitate biosintetică înaltă

Rutozida reprezintă un compus secundar important cu proprietăți antioxidante puternice [66], care a fost descoperit la *Ruta graveolens*. A fost identificată, prin metoda cromatografică în strat subțire, la un șir de PMA precum *Cassia alata*, *Andrographis paniculata* [213], *Jasminum sambac*, *Annona squamosa*, *Stahie recta*, *Calendulae officinalis*, *Melia azedarach* [240].

În cadrul studiului de față, genotipurilor de *S. sclarea* din Republica Moldova, similar cu rezultatele pentru acizii polifenolcarboxilici, au evidențiat un conținut maxim de flavonoide rutozidă la hibridul H3 și forma parentală P7, în timp ce cea mai mică colorație a benzilor a fost atestată la forma parentală P1,

Prezența apigeninei a fost confirmată, prin CSS la un șir de PMA precum *Triumfetta procumbens* [140], *Sida spinosa* [224] *Petroselinum sativum* [39]. Compusul a mai fost studiat la *Petroselinum crispum*, *Apium graveolens*, condimentele de *Rosmarinus officinalis*, *Origanum vulgare*, *Ocimum basilicum*, *Satureja hortensis*, *Coriandrum sativum*, ceaiul de *Matricaria chamomilla*, *Eugenia caryophyllata*, *Mentha piperita*, *Cynara scolymus* [180].

Analiza spoturilor de apigenină, în cadrul genotipurilor de *S. sclarea* din Republica Moldova, a atestat o intensitate înaltă pentru doi dintre hibrizi (H8 și H13) și două forme parentale (P6 și P7). O intensitate mare, corelată cu o cantitate sporită de rutozidă, a fost atestată în cazul a șapte dintre hibrizi (H1, H2, H3, H5, H8, H10 și H12) și trei forme parentale (P2, P7 și P9) (Tabelul 6.3).

Rezultatele relevate pentru conținutul de flavonoide au permis evidențierea faptului că rutozida înregistrează o intensitate mai înaltă a spoturilor cromatografice, comparativ cu apigenina, ceea ce demonstrează un conținut mai mare. La nivelul gruurilor genetice studiate, hibridii H1, H3, H5, H8 și H12 au relevat fracții de o intensitate mai înaltă comparativ cu formele parentale, pentru rutozidă. În cazul apigeninei doi hibrizi (H3 și H8) au prezentat o intensitate mai înaltă comparativ cu formele parentale.

Tabelul 6.3.

Intensitatea benzilor cromatografice a flavonoidelor la genotipurile de *S. sclarea*

	Forme parentale															Hibrizi												
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P12	P13	P14	P15	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H8	H9	H10	H11	H12	H13		
A																												
B																												

A - rutozida; B - apigenina

	intensitate mare	intensitate medie	intensitate mică
--	------------------	-------------------	------------------

O capacitate biosintetică sporită a compușilor analizați, comparativ cu formele parentale a fost remarcată în cadrul hibrizilor H1, H3, H4, H5, H10 și H12 (Tabelul 6.4).

Tabelul 6.4.

Intensitatea benzilor cromatografice a flavonoidelor în cadrul grupurilor de *S. sclarea*

	Hibrizi de <i>S. sclarea</i>												
	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H8	H9	H10	H11	H12	H13	
A													
B													

A - rutozida; B - apigenina

	hibridi cu capacitate biosintetică înaltă
--	---

Generalizarea datelor obținute, în baza analizelor cromatografice a permis evidențierea hibridului H8 și a formei paterne P7, cu o intensitate maximă a spoturilor polifenolilor incluși în studiu. Un nivel minim pentru compușii analizați a fost atestată la forma parentală P1. În același timp, genotipurile H3, H8, H10 și P6 au arătat o intensitate mai mare a benzilor pentru APC; genotipurile H1, H2, H3, H5, H10, H12, P2 și P9 – pentru rutozidă; hibridul H13 și forma parentală P6 – pentru apigenină. O capacitate biosintetică sporită a hibrizilor, comparativ cu formele parentale se manifestă la H3, H4 și H5 (pentru toți compușii analizați).

6.2. Analiza cantitativă a conținutului de compuși secundari

Valoarea fitoterapeutică, medicinală și industrială a speciilor de PMA depinde de conținutul compușilor bioactivi, reflectând astfel importanța studiilor fitochimice cantitative asupra metaboliților secundari. Literatura de specialitate evidențiază cercetări privind conținutul de compuși polifenolici la 20 specii din genul *Salvia* din Polonia [138], precum și a conținutului de acid rozmarinic la speciile din familia *Lamiaceae*, inclusiv cele din genul *Salvia* din Iran [96] și plantele din flora spontană din Slovenia și Croația [63]. Variația conținutului de compuși fenolici este cauzată de mai mulți factori, printre care se numără zona de cultivare, condițiile de cultivare etc. [168].

Conținutul total de compuși polifenolici, echivalent acid galic, evaluat în studiul de față a variat de la 0,11 (P14) până la 0,32 g acid galic/100 g masă proaspătă. Rezultatele obținute sunt comparabile cu rezultatele altor studii efectuate asupra speciilor din genul *Salvia*, care au demonstrat 0,041-134 g echivalent acid galic la 100 g masă proaspătă [149, 201]. Tosun și colab. (2009) au investigat conținutul total de compuși polifenolici la opt specii din genul *Salvia*, dintre care cel mai mare conținut a fost identificat în extractele de *Salvia verticillata* (0,17 g echivalent acid galic la 100 g masă proaspătă), urmat de *Salvia virgata* (0,10 g echivalent acid galic 100 g masă proaspătă), *Salvia candidissima* (0,10 g echivalent acid galic la 100 g masă proaspătă.) și *Salvia sclarea* ($0,02 \pm 1,1$ g echivalent acid galic la 100 g masă proaspătă) [250].

În studiul de față, hibridii cercetați au prezentat o valoare medie de $0,21 \pm 0,02$ g. O cantitate mai scăzută se atestă în cazul formelor parentale – $0,19 \pm 0,01$ g la 100 g masă proaspătă. Nivelul maxim a fost constatat la hibridul H3, urmat de hibridii H8 (0,29 g), H10 (0,28 g) și H4 (0,26 g). Un conținut minim al compusului a fost relevat la forma parentală P14. Valoarea medie a fost de $0,201 \pm 0,011$ g la 100 g masă proaspătă (Tabelul 6.5).

O capacitate biosintetică sporită a hibridilor, comparativ cu formele parentale, față de media formelor parentale (MPH) a fost atestată la H1, H2, H3, H4, H8, H9, H10 și H12. În aceste cazuri, cu excepția hibridului H9, se evidențiază un efect pozitiv de heterozis și față de cel mai bun părinte (BPH). Statistic cele mai mari valori au fost atestate, după indicatorii media părinților și, respectiv, cel mai bun părinte, în cadrul grupurilor genetice ale hibridilor H8 (125/100%) și H3 (118/98%) (Tabelul 6.6 și Figura 6.3).

Coeficientul de variație a fost de 29,2%, respectiv, 22,5% pentru formele parentale și 30,8% pentru hibridii pentru conținutul total de polifenoli.

Tabelul 6.5.

Conținutul de polifenoli în cadrul grupurilor de *S. sclarea* cercetate

Genotip	Polifenoli totali	Acizi polifenolcarboxilici	Flavonoide
	echiv. acid galic	echiv. ac. rozmarinic	echiv. rutozida
	g /100 g masă proaspătă		
P1	0,13	0,12	0,10
P2	0,20	0,17	0,15
P3	0,20	0,18	0,11
P4	0,16	0,11	0,15
P5	0,22	0,19	0,20
P6	0,19	0,15	0,12
P7	0,21	0,16	0,15
P8	0,25	0,22	0,14
P9	0,25	0,23	0,21
P10	0,17	0,16	0,10
P11	0,23	0,17	0,21
P12	0,17	0,11	0,13
P13	0,15	0,13	0,11
P14	0,11	0,09	0,06
P15	0,15	0,11	0,07
H1	0,19	0,13	0,13
H2	0,20	0,16	0,17
H3	0,32	0,29	0,32
H4	0,26	0,21	0,22
H5	0,21	0,16	0,14
H6	0,14	0,08	0,12
H7	0,13	0,07	0,13
H8	0,29	0,27	0,22
H9	0,16	0,13	0,13
H10	0,28	0,25	0,22
H11	0,13	0,07	0,08
H12	0,23	0,20	0,19
H13	0,18	0,13	0,13
S_x	0,13	0,01	0,01
Media	0,20±0,01	0,16±0,01	0,15±0,01
Minimum	0,01	0,07	0,05
Maximum	0,32	0,29	0,32
Varianța, δ²	0,003	0,003	0,003
V, %	29,22	36,62	37,99

Tabelul 6.6.

Conținutul total de polifenoli în cadrul grupurilor genetice, g / 100g masă proaspătă

<i>Grup genetic</i>	♀	♂	F_1
1.	0,13	0,11	0,19
2.	0,13	0,20	0,20
3.	0,13	0,16	0,32
4.	0,20	0,16	0,26
5.	0,20	0,25	0,21
6.	0,20	0,17	0,14
7.	0,15	0,23	0,13
8.	0,15	0,11	0,29
9.	0,17	0,15	0,16
10.	0,25	0,13	0,28
11.	0,11	0,21	0,13
12.	0,15	0,19	0,23
13.	0,22	0,21	0,18
Media	0,19±0,01		0,21±0,02
Minimum	0,11		0,13
Maximum	0,25		0,32
Varianța, δ^2	0,002		0,004
V, %	22,46		30,81

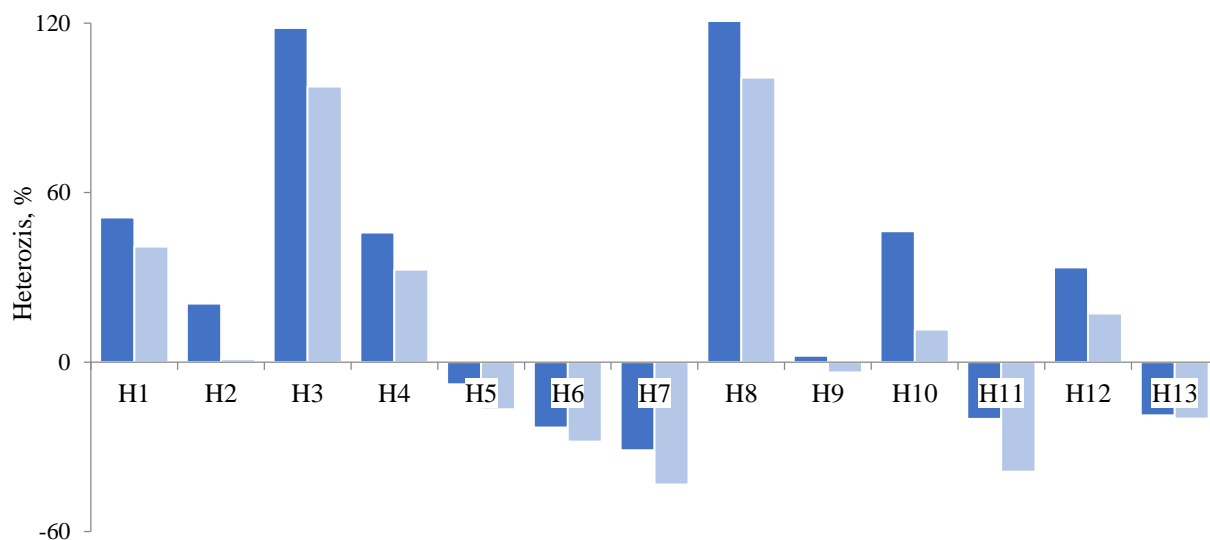


Fig. 6.3. Nivelul efectului heterozis pentru conținutul total de polifenoli.

Poligonul frecvențelor a arătat o distribuție simetrică pentru genotipurile cercetate (Figura 6.4).

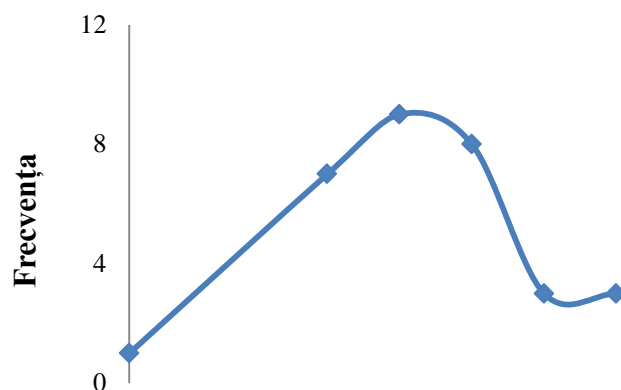


Fig. 6.4. Gruparea pe intervale și distribuția datelor pentru conținutul total de polifenoli.

Conținutul de acizi polifenolcarboxilici, exprimat în echivalenți de acid rozmarinic, s-a încadrat în intervalul 0,07-0,29 g /100 g masă proaspătă (Tabelul 6.5.). Cercetările au arătat că cei 13 hibrizi au înregistrat o medie de $0,16 \pm 0,01$, formele parentale – $0,15 \pm 0,01$. După Bandoniene și colab., conținutul de AR la *S. sclarea* se încadrează în limitele 0,01-0,05 g în 100 g [48]. Rezultatele demonstrează un conținut ce variază între 0,001-0,93 g la 100 g masa proaspătă [48]. În acest context, investigarea compusului la genotipurile de *S. sclarea* din colecția IGFPP prezintă o importanță majoră.

Un conținut maxim de acid rozmarinic, la fel ca și în cazul polifenolilor totali, a fost remarcat la hibridul H3 (0,29 g), urmat de hibridii H8 (0,27) și H10 (0,25). Cantitatea cea mai mică a compusului a fost relevată la hibridul H11 (0,07 g), de asemenea o cantitate mică a fost identificată la hibridii H7 (0,07 g) și H6 (0,08 g).

Conform conținutului de acid rozmarinic genotipurile studiate au fost clasificate 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, precum și hibridii H1, H2, H5, H9, H12 și H13;
- cu conținut mic – forma parentală P14 și hibridii H6, H7 și H11.

În cadrul grupurilor H1, H3, H4, H8, H9, H10 și H12 au fost evidențiat un efect pozitiv de heterozis – față de cel mai bun părinte. Cel mai mare nivel a fost atestat în cadrul grupurilor: H8 (158%) și H3 (152 %). Efectul pozitiv al efectului heterozis, după media formelor parentale, a fost relevat numai în cadrul grupurilor genetice: H3 (83%) și H8 (69%), similar cu rezultatele descrise pentru conținutul total de polifenoli (Tabelul 6.7 și Figura 6.5).

Tabelul 6.7.

Conținutul de acid rozmarinic în cadrul grupurilor de *S. sclarea* cercetate

<i>Grup genetic</i>	♀	♂	<i>F₁</i>
1.	0,12	0,09	0,13
2.	0,12	0,17	0,16
3.	0,12	0,11	0,29
4.	0,18	0,11	0,21
5.	0,18	0,22	0,16
6.	0,18	0,16	0,08
7.	0,11	0,17	0,07
8.	0,11	0,09	0,27
9.	0,11	0,11	0,13
10.	0,23	0,12	0,25
11.	0,09	0,16	0,07
12.	0,13	0,15	0,20
13.	0,19	0,16	0,13
Media	0,15±0,01		0,17±,021
Minimum	0,07		0,07
Maximum	0,23		0,29
Varianța, δ^2	0,002		0,005
V, %	27,05		44,88

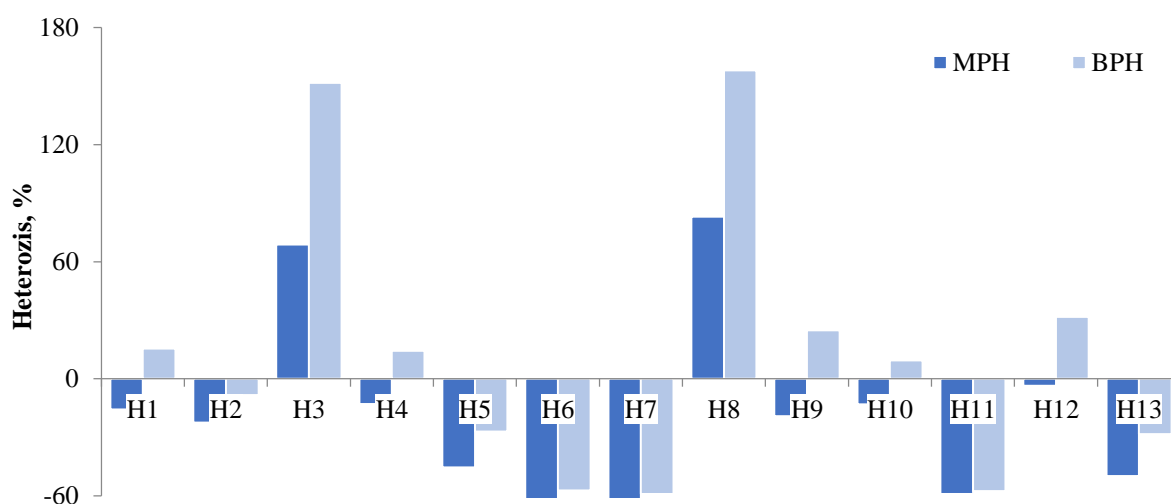


Fig. 6.5. Nivelul efectului heterozis pentru conținutul total de APC.

Șapte dintre hibrizi (H1, H3, H4, H8, H9, H10 și H12) au prezentat o capacitate biosintetică sporită, comparativ cu formele parentale.

Coeficientul de variație al conținutului de acid rozmarinic constituie 36,6%, respectiv, 27,1 % pentru formele parentale și 44,9% pentru hibrizi. Poligonul frecvențelor au arătat o distribuție simetrică pentru genotipurile cercetate (Figura 6.6).

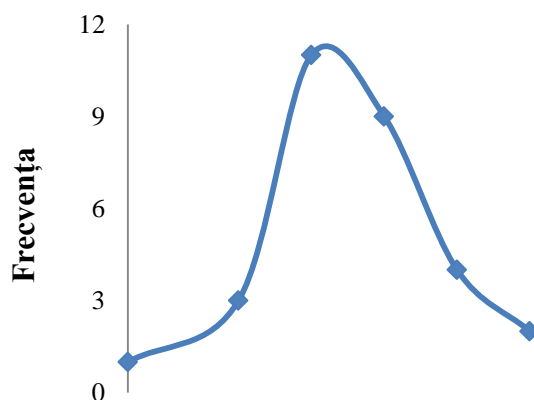


Fig. 6.6. Gruparea pe intervale și distribuția datelor pentru conținutul total de APC.

Conținutul de flavonoide exprimat în echivalenți de rutozidă [187] a prezentat valori situate între 0,05 și 0,32 g /100 g masă proaspătă, cu o medie de $0,15 \pm 0,01$ (Tabelul 6.5).

În cadrul studiului, cea mai mare cantitate de rutozidă, analog al polifenolilor totali și acizilor polifenolcarboxilici, a fost înregistrată la hibridul H3 (0,32 g). Acesta este urmat de hibridii H8 (0,22 g), H10 și H4 cu un conținut de 0,22 g rutozidă la 100 g masă proaspătă. Formele parentale P14 și P15 au prezentat o cantitate minimă – 0,05 g rutozidă/ 100 masă proaspătă. Hibrizi au înregistrat o medie de $0,16 \pm 0,02$, formele parentale – $0,13 \pm 0,01$ g la 100 g masă proaspătă. Pentru conținutul de rutozidă coeficientul de variație a fost de 38,0%, respectiv, 34,6% pentru formele parentale și 38,1% pentru hibrizi, poligonul frecvențelor prezentând o distribuție simetrică pentru genotipurile cercetate.

Majoritatea hibrizilor (cu excepția H1, H11 și H13) au evidențiat o capacitate biosintetică sporită față de formele parentale, cele mai mari valori fiind atestate în cazul H8 (246/199%) și H3 (156/113%) după indicatorii media părinților și, respectiv, cel mai bun părinte, similar cu datele pentru polifenolii totali și acizii polifenolcarboxilici. Evaluarea cantitativă a compușilor polifenolici a permis constatarea unei capacități biosintetice sporite față de formele parentale, pentru toți indicatorii, în cazul a trei hibrizi: H3, H8 și H10 (Tabelul 6.8 și Figura 6.7).

Tabelul 6.8.

Conținutul de flavonoide în cadrul grupelor de *S. sclarea* L.

<i>Grup genetic</i>	♀	♂	F_1
1.	0,10	0,06	0,13
2.	0,10	0,15	0,17
3.	0,10	0,15	0,32
4.	0,11	0,15	0,22
5.	0,11	0,14	0,14
6.	0,11	0,10	0,12
7.	0,07	0,21	0,13
8.	0,07	0,06	0,22
9.	0,07	0,13	0,13
10.	0,21	0,10	0,22
11.	0,06	0,15	0,08
12.	0,11	0,12	0,19
13.	0,20	0,15	0,13
Media	0,34±0,01		0,17±0,02
Minimum	0,06		0,08
Maximum	0,21		0,32
Varianța, δ^2	0,002		0,004
V, %	34,58		38,05

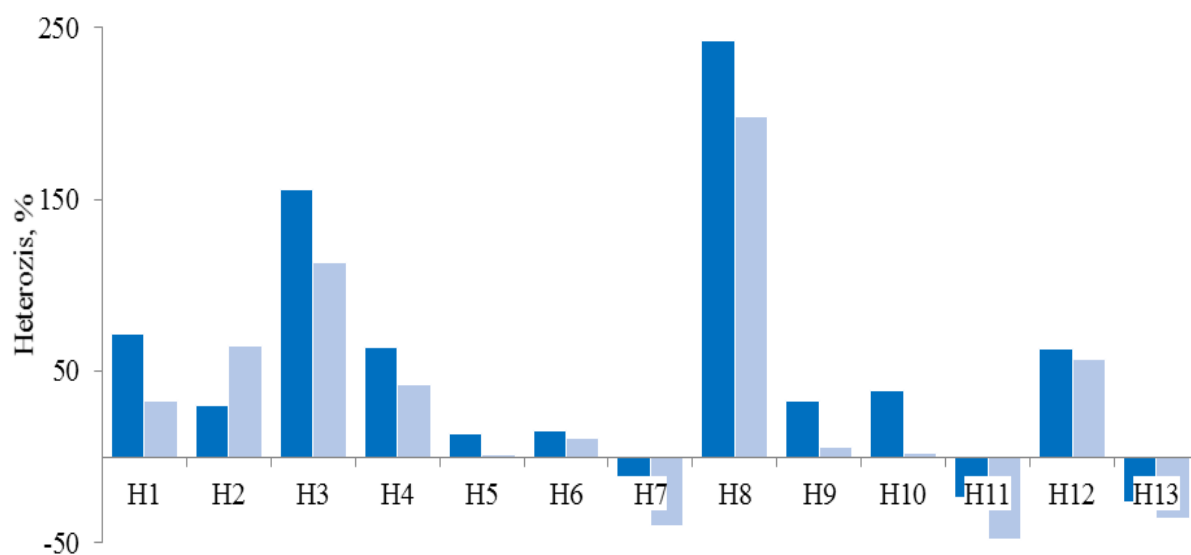


Fig. 6.7. Nivelul efectului heterozis pentru conținutul total flavonoide.

Curba de frecvență a indicat o distribuție simetrică pentru genotipurile cercetate (Figura 6.8).

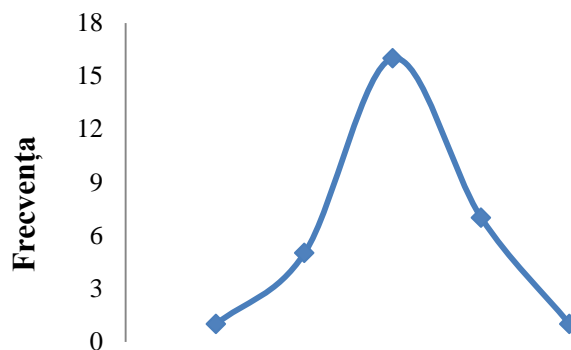


Fig. 6.8. Gruparea pe intervale și distribuția datelor conținutului de rutozidă.

Generalizând, rezultatele fitochimice cantitative au prezentat valori maxime, pentru toți compușii studiați, în cazul hibridului H3, cantitățile minime atestându-se la P14 (Tabelul 6.9).

Tabelul 6.9.

Conținutul de polifenoli în cadrul genotipurilor cercetate

	Forme parentale															Hibrizi												
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14	P15	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13
A																												
B																												
C																												

A - polifenoli totali; B - acid rozmarinic; C – rutozidă

conținut înalt	conținut mediu	conținut scăzut
0,2 - 0,3 g / 100 g masă roaspătă	0,1 - 0,2 g / 100 g masă proaspătă	0 - 0,1 g / 100 g masă proaspătă

Rezultatele analizei spectrofotometrice au fost relevate valori maxime, pentru toți compușii studiați, în cazul hibridului H3, cantitățile minime atestându-se la P14. Analiza comparativă a demonstrat o corelare mai înaltă a acizilor polifenolcarboxilici, echivalent acid rozmarinic, față de conținutul total de polifenoli, cu valori a coeficientului de corelație (R^2) de 0,93 (Figura 6.9, A), gradul de corelație dintre conținutul polifenolilor totali și compușii flavonoidici (R^2) fiind de 0,79 (Figura 6.9, B). Rezultatele au permis evidențierea faptului că acidul rozmarinic este unul dintre compușii majori din fracția de polifenoli totali.

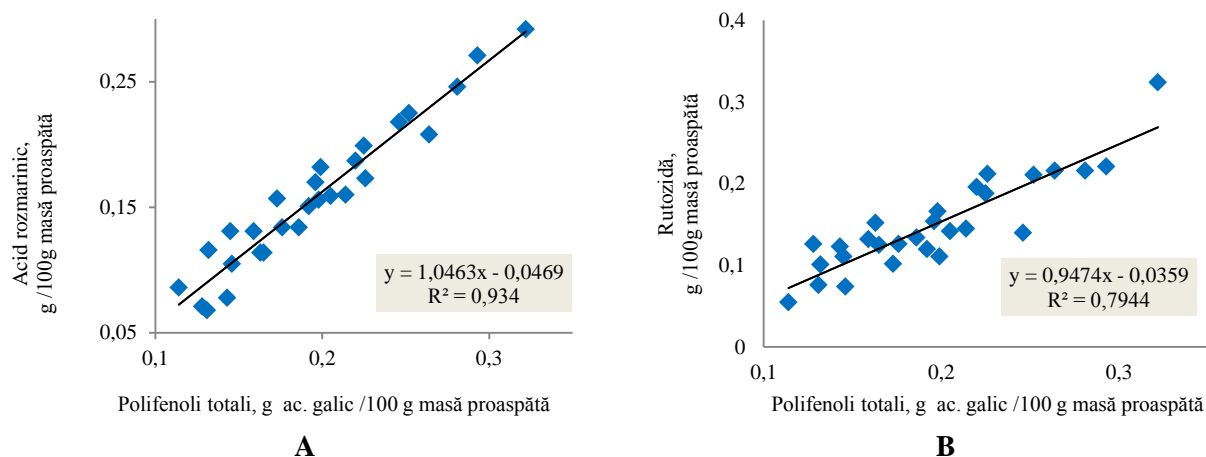


Fig. 6.9. Corelarea dintre conținutul total de polifenoli față de conținutul de acid rozmarinic (A) și conținutul de rutozidă (B).

Majoritatea hibrizilor (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 hibrizilor 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 hibrizi: H3, H8 și H10 (Tabelul 6.10).

Tabelul 6.10.

Conținutul de polifenoli în cadrul grupurilor genetice cercetate

	Hibrizi de <i>S. sclarea</i>												
	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13
A													
B													
C													

A - polifenoli totali; B - acid rozmarinic; C - rutozidă

hibrizi cu capacitate biosintetică înaltă

Conținutul de sclareol. Cercetările recente demonstrează că cultivarea relativ ușoară a șerlaiului și randamentul înalt de sclareol este un factor care a condus la extinderea suprafețelor cultivate și inițierea de studii la nivel biochimic și genetic. Astfel, a fost realizat un studiu asupra

hibrizilor de *S. sclarea*, prin cuantificarea sclareolului în uleiul esențial în baza analizei HPLC. Cel mai mare conținut de sclareol (10%) a fost evidențiat la hibridul H9, urmat de H3, H6 și H11. În timp ce hibridul H13 a prezentat cea mai mică cantitate – 1,9%. De asemenea printr-un conținut scăzut al compusului se caracterizează și hibridii H2 și H7 (Figura 6.10).

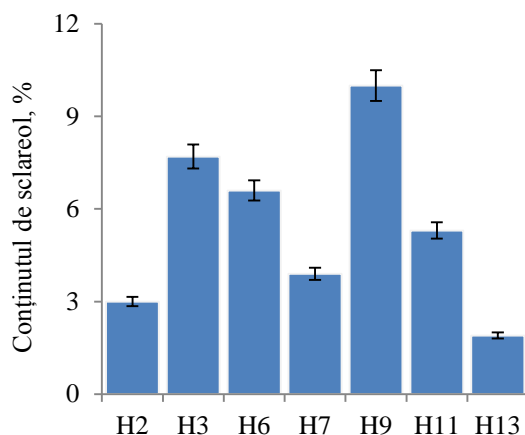


Fig. 6.10. Conținutul de sclareol la hibridii de *S. sclarea*

Rezultatele obținute au permis constatarea unui conținut maxim la hibridul H9 (datele fiind corelate cu rezultatele moleculare înregistrat pentru nivelul de expresie al genei *LPPS*, implicată în calea metabolică de sinteză a sclareolului).

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 constatarea a trei hibridi (H3, H4 și H8) dintre cei 13 studiați de *S. sclarea*, care au prezentat valori înalte ale efectului heterozis pentru toți parametrii (Tabelul 6.11).

Corelarea nivelului de expresie al genei *LPPS* și conținutului de sclareol la hibridii de *S. sclarea*. 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.

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

Parametrii		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

Cel mai înalt conținut de sclareol a fost constatat la hibridul H9, rezultatele fiind în corelație cu datele privind nivelul maxim de transcripți ai genei *LPPS* (Figura 6.11, A).

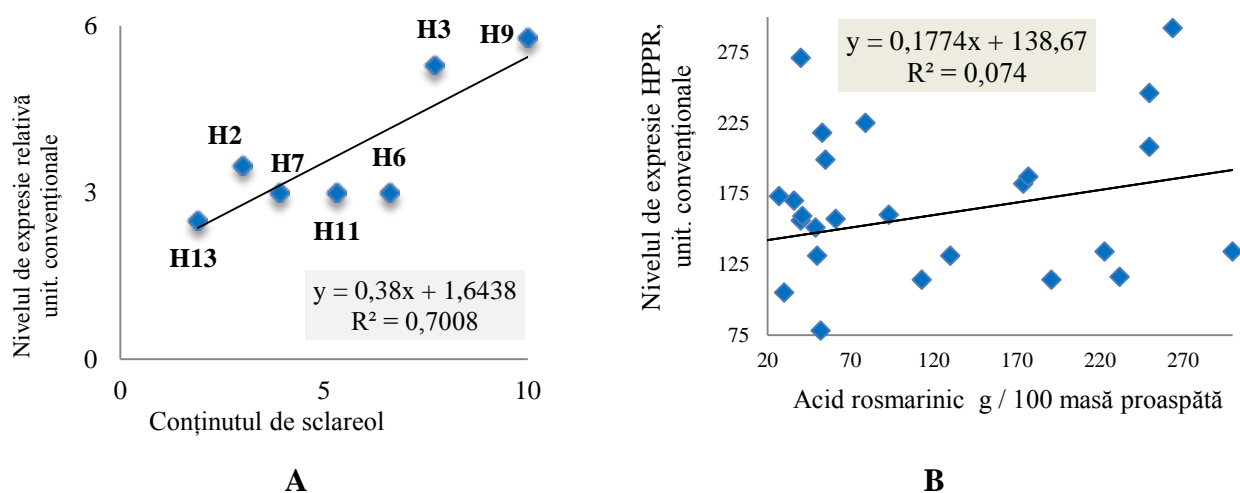


Fig. 6.11 Corelația expresiei genei *LPPS* cu conținutul de sclareol (A) și genei *HPPR* cu conținutul de acid rozmarinic.

Cantitatea minimă de sclareol a fost remarcată la H13, care corelează cu un nivel scăzut al expresiei genei *LPPS* (Figura 6.12).

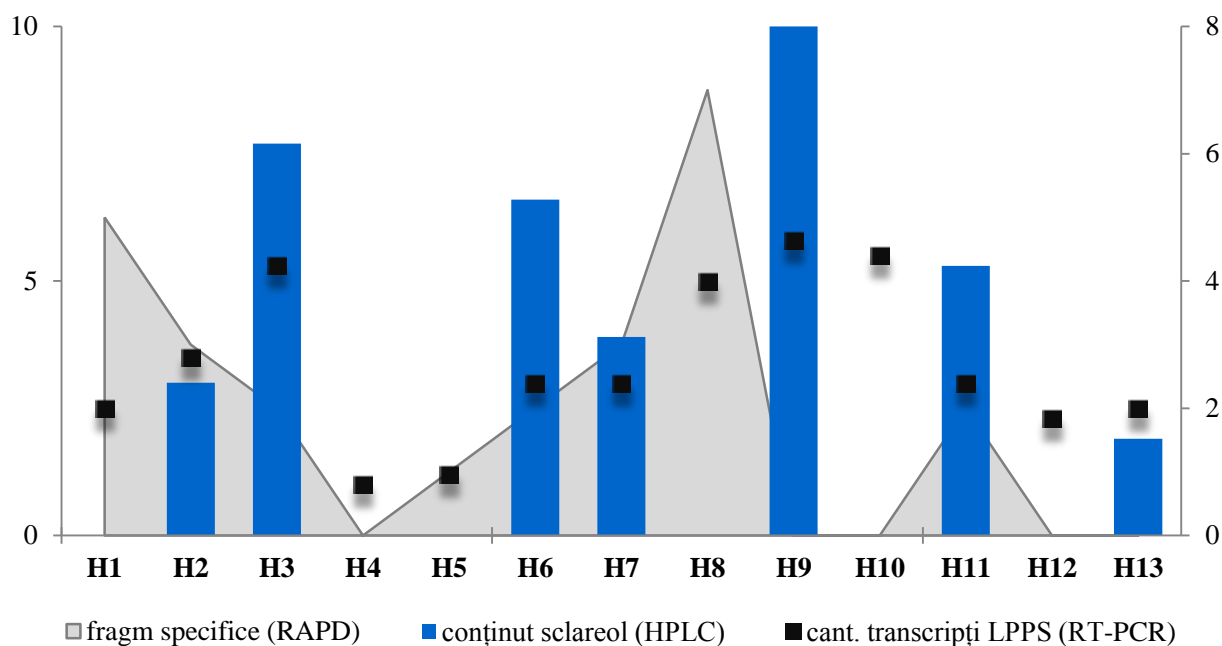


Fig. 6.12 Asocierea conținutului de sclareol, expresia genei *LPPS* și polimorfismul genetic.

Generalizând, se constată faptul că pentru hibridii de *S. sclarea* conținutul de sclareol poate fi prezis prin cercetări la nivel molecular, privind activitatea transcripțională a genei *LPPS*, facilitând programele de ameliorare a speciei.

Corelarea nivelului de expresie al genei *HPPR* și conținutului de acid rozmarinic la genotipurile de *S. sclarea*. Deși conținutul de acid rozmarinic corelează slab cu nivelul de expresie al genei *HPPR* implicată în calea metabolică de sinteză a acestuia ($R^2 = 0,07$) (Figura 6.11, B), totuși hibridul H3 se relevă prin concentrații maxime de AR și un conținut sporit de transcripți ai genei *HPPR* (Figura 6.6).

Hibridul H8, care a fost caracterizat printr-o cantitate înaltă de acid rozmarinic, demonstrează și 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}).

Coeficientul de variație al rezultatelor înregistrate pentru conținutul total de polifenoli este de 29,2% (22,5% – forme parentale și 30,8% – hibridi), pentru conținutul de acid rozmarinic – 36,6% (27,1% – forme parentale și 44,9% hibridi), pentru rutozidă – 38,0%, (34,6% – forme parentale și 38,1% - hibridi), pentru *LPPS* – 80,4% (98,3% – forme parentale și 56,01% – hibridi), pentru *HPPR* 83,2% (76,3% – forme parentale și 85,7% – hibridi) (Tabelul 6.12). Astfel, datele obținute demonstrează o eterogenitate înaltă a genotipurilor de *S. sclarea*.

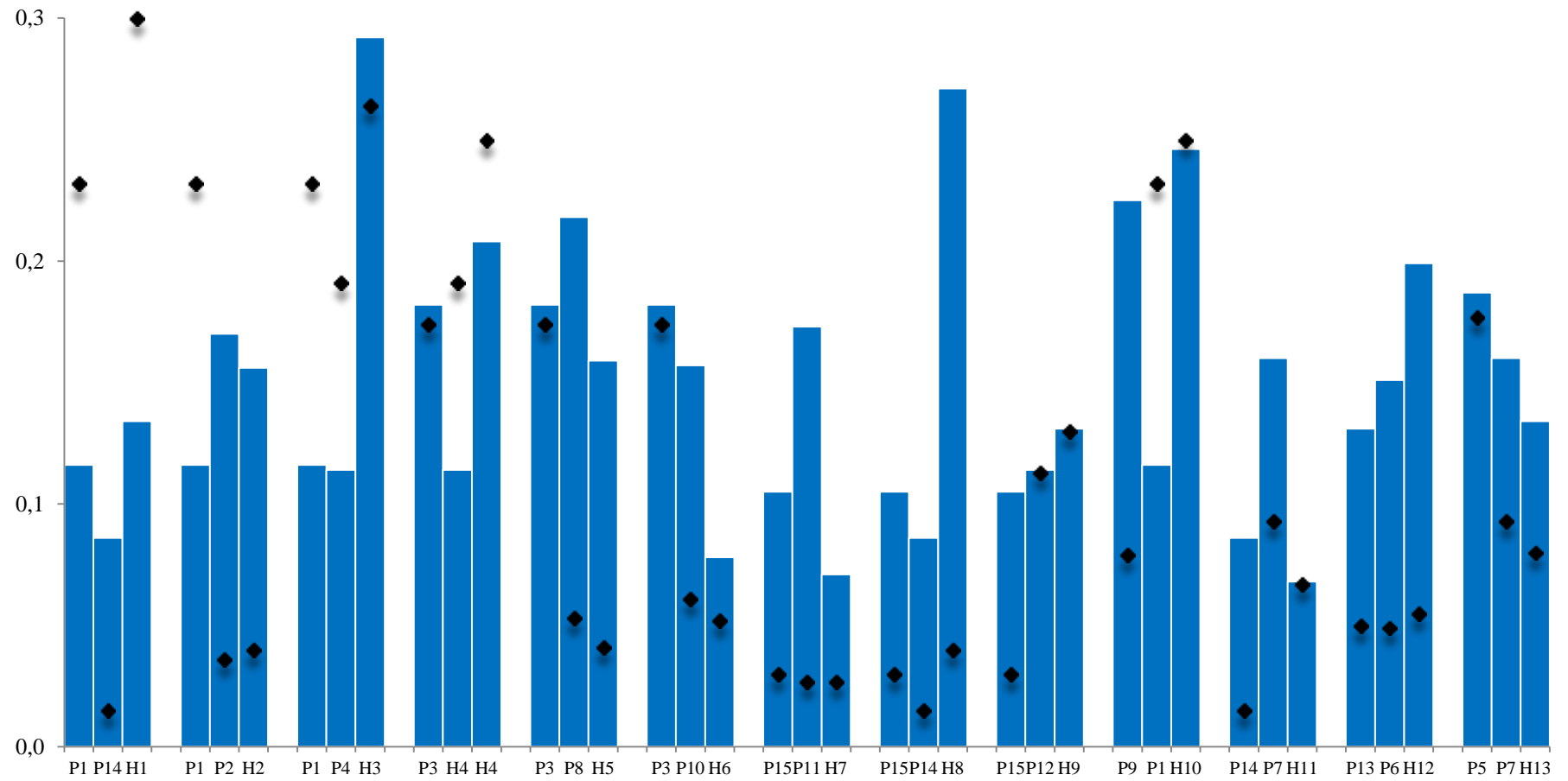


Fig. 6.13. Corelația conținutului de acid rozmarinic și activitatea transcripțională a genei *HPPR*.

Indicii de variabilitate a caracterelor genetico-moleculare și biochimice

<i>Parametru</i>		Expresia genei LPPS	Expresia genei HPPR	Conținutul total de polifenoli	Conținutul de acid rozmarinic	Conținutul de rutozidă
		<i>unități convenționale</i>		<i>g/100g masă proaspătă</i>		
Media	<i>genotipuri</i>	2,33±0,18	0,10±0,01	0,20±0,10	0,16±0,01	0,15±0,01
	<i>forme parentale</i>	1,63±0,22	0,09±0,01	0,19±0,01	0,15±0,01	0,13±0,01
	<i>hibrizi</i>	3,15±0,25	0,12±0,01	0,21±0,02	0,16±0,02	0,17±0,02
Minimum	<i>genotipuri</i>	0,02	0,01	0,11	0,07	0,06
	<i>forme parentale</i>	0,02	0,02	0,11	0,09	0,06
	<i>hibrizi</i>	0,25	0,01	0,13	0,07	0,08
Maximum	<i>genotipuri</i>	5,92	0,34	0,32	0,29	0,32
	<i>forme parentale</i>	5,66	0,28	0,25	0,23	0,21
	<i>hibrizi</i>	5,92	0,34	0,32	0,29	0,32
Varianța, s²	<i>genotipuri</i>	3,52	0,01	0,00	0,00	0,00
	<i>forme parentale</i>	2,84	0,01	0,00	0,00	0,00
	<i>hibrizi</i>	3,11	0,01	0,00	0,01	0,00
V, %	<i>genotipuri</i>	80,42	83,16	29,22	36,62	37,99
	<i>forme parentale</i>	98,28	76,32	22,46	27,05	34,58
	<i>hibrizi</i>	56,07	85,74	30,81	44,88	38,05

Generalizarea rezultatelor, obținute în cadrul grupurilor genetice de *S. sclarea*, se constată o variabilitate înalte a materialului biologic, atât în urma analizelor genetico-moleculare, cât și fitochimice. Datele obținute evidențiază hibrizii H3 și H8, care au înregistrat, pentru toți indicatorii analizați (calitativ și cantitativ), un nivel înalt pozitiv al efectului heterozis. Rezultatele obținute reflectă posibilități de selectare orientată a acestor hibrizi.

6.3. Concluzii la capitolul 6

1. Analiza fitochimică a compușilor polifenolici din extractele vegetale de *S. sclarea*, a permis identificarea și cuantificarea polifenolilor totali (acid galic), acizilor polifenolcarboxilici (acid rozmarinic și acid cafeic) și a flavonoidelor (rutozida și apigrenina).

2. Datele cromatografice obținute evidențiază hibridul H8 și forma paternă P7, cu o intensitate maximă a spoturilor polifenolilor studiați. În același timp, genotipurile H3, H8, H10 și

P6 au arată o intensitate sporită a benzilor corespunzătoare acizilor polifenolcarboxilici; genotipurile H1, H2, H3, H5, H10, H12, P2 și P9 – rutozidei; hibridul H13 și forma parentală P6 – apigeninei. Un nivel minim pentru compușii analizați se atestă la forma parentală P1.

3. Cel mai mare conținut al tuturor compușilor analizați a prezentat hibridul H3, urmat de H8, H10 și H4. Forma parentală P14 a prezentat o valoare minimă pentru conținutul total al compușilor polifenolici, exprimat în echivalenți de acid galic și pentru conținutul de flavonoide, exprimat în echivalent de rutozidă. Forma parentală P5 a indicat un conținut minim pentru acidul galic; H11, H7 și H6 - pentru acidul rozmarinic; formele parentale P14 și P15 - pentru rutozidă.

4. Rezultatele obținute au pus în evidență la cei 13 hibrizii care au prezentat valori ale conținutului de polifenoli mai înalte comparativ cu cele 15 forme parentale. Evaluarea cantitativă a compușilor polifenolici a permis atestarea unei capacități biosintetice sporite pentru doi hibrizi (H3, H8) *S. scalarea* față de formele parentale, pentru toți indicatorii, aceștia sunt urmați de hibrizii H4, H9, H10 și H12 cu valori mai moderate.

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 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 fiind înregistrat în cazul primerului UBC₂₅₀ (29) [17, 18, 19].
2. Elaborarea dendrogramelor de repartiție 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, indicând 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 comparativ 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 datele 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* [171];
 - hibridul H8 cu o cantitate mare de acid rozmarinic manifestă și cel mai polimorf spectru al ampliconilor - opt fragmente specifice RAPD (A₁⁵⁰⁰; OPB₀₃⁸⁵⁰; OPB₀₃²⁶⁰; OPB₁₀⁴⁰⁰; OPE₁₇²¹⁰⁰; OPG₅¹⁰⁰⁰; OPG₅³⁵⁰; OPU₁₁²⁷⁰⁰);
 - 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) [89].
9. Instrumentul UDaCoT reprezintă suport pentru extragerea și analiza informațiilor din bazele de date, facilitând procesul de elaborare a reviuului sistematic al literaturii [20]. 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 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 (OPA₂, OPA₉, OPG₁₀, OPH₁₅, UBC₂₅₀ și OPK₁₇) în scopul studierii variabilității genetice a genotipurilor de *S. sclarea*.
3. Se recomandă instrumentului UDaCoT pentru analiza informațiilor cu privire la PMA, precum și alte organisme de interes, în procesul de realizare a reviziei sistematice.
4. Se recomandă utilizarea bazei de date Med Plant pentru a obține informații ce țin speciile de PMA din Republica Moldova, ca o sursă importantă de informare în domeniu.
5. Se recomandă fragmentul OPG₁₀¹⁰⁰⁰ 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.

BIBLIOGRAFIE

1. Andronic L., Jacotă A. Evidența schimburilor între cromatidele surori la orz (*Hordeum vulgare* L.) în cazul infecției virale. In: Buletinul AȘM, Științele Vieții, 2009, vol. 2, nr. 308, p. 57-64.
2. Bojor O., Popescu O. Fitoterapia tradițională și modernă ediția a III-a. București: Ed Fiat Lux, 2004. 466 p.
3. Duca M., Căpățană A., Barbacar N. Moștenirea ampliconilor ADN la diverse genotipuri de floarea-soarelui. In: Buletinul AȘM. Științele vieții, 2006, vol. 2, p. 58-65.
4. Goncariuc M. Cercetări de genetică și ameliorare la *Salvia sclarea* L. In: Akademos, 2013, vol. 3, nr. 30, p. 77-84.
5. Goncariuc M. Culturi eterooleaginoase și medicinale. In: Ameliorarea specială a plantelor agricole, Chișinău: Tipograf. Centrală, 2004, p. 523-572.
6. Goncariuc M. Efectul heterozisului la hibridii backcross de *Salvia sclarea* L. In: Materialele XXII Simpozionu Național de Genetică vegetală și animală, București, 2002, p. 27-28.
7. Goncariuc M. Efectul heterozisului la hibridii backcross de *Salvia sclarea* L. In: Cercetări de Genetică Vegetală și Animală; Edit: S.C. Agris-Redacția Revistelor Agricole S.A., București, 2004, vol. VIII, p. 117-122.
8. Goncariuc M. Efectul heterozisului la hibridii treiliniari și dubli de *Salvia sclarea* L. In: Buletinul ASM, vol. 4, nr. 295, 2004, p. 97-102.
9. Goncariuc M. Genetica și ameliorarea speciilor *Glaucium flavum* Cr., *Coriandrum sativum* L. și *S. sclarea* L. în Republica Moldova. In: Buletinul AȘM. Științele vieții, 2010, vol. 2, nr. 311, p. 109-116.
10. Goncariuc M. Linii consangvinizate de *S. sclarea* cu caractere noi. Inginerie genetică și biotehnologii moderne. Chișinău: Centrul ed. UASM, 2002, p. 334-339.
11. Goncariuc M. Particularitățile expresiei heterozisului la hibridii trei liniari și dubli de *Salvia sclarea* L. In: Cercetări de Genetică Vegetală și Animală. România, 2000, vol. VI, p. 84-97.
12. Goncariuc M. *Salvia* L. Chișinău: Centrul Edit. UASM, 2002, 218 p.
13. Goncariuc M. Utilizarea încrucișărilor în trepte și backcross în crearea hibridilor precoci de *S.sclarea* cu productivitate sporită. In: Cercetări de Genetică Vegetală București, 2006, vol. IX, p. 99-103.
14. Goncariuc M., Balmuș Z., Cernolev E. Utilizarea hibridărilor complexe în elaborarea soiurilor performante de *Salvia sclarea* L. cu perioada de vegetație diferită. In: Materialele Conferinței Științifice Genetica și Fiziologia Rezistenței Plantelor. Chișinău, 2011, p. 96.
15. Levițchi A. (*UnASM Data Collecting Tool*): Principii de căutare și utilizare a informațiilor din bazele de date bioinformaticice. UnAȘM, CBM, Lab. de Bioinformatică; Chișinău: S.n. T-PAR SRL, 2012. 148 p.
16. **Martea R.** Elaborarea primerilor specifici pentru studierea genelor implicate în sinteza compușilor din uleiul esențial de *S. sclarea* L. In: Materialele Conferinței științifice internațională „Genetica, fiziologia și ameliorarea plantelor”, ediția a 5-a, Chișinău, 2014, p. 121-125.
17. **Martea R.** Evaluarea diversității genetice la *Salvia sclarea* L. în baza markerilor moleculari. Simpozionului Științific Internațional „Agricultura Modernă – Realizări și Perspective” 9 - 11 octombrie, 2013, vol. 39, p. 93-97.
18. **Martea R.** Polimorfismul genetic în cadrul unor genotipuri de *S. sclarea* L. In: Buletinul AȘM. Științe ale Vieții, 2014, vol. 3, nr. 324, p. 109-116.
19. **Martea R.,** Doroș I., Manole A. Variabilitatea genetică intraspecifică la *Salvia sclarea* L. Studia Universitatis. Seria Stiințe ale Naturii, 2013, 6 (66), p. 66-71.

20. **Martea R.**, Levițchi A. *UDaCoT - Instrument de colectare a datelor biologice*. In: Scientific abstracts of the International Conference of Young Researchers, X-th edition, November 23, 2012, Chisinau, p. 42.
21. Mârza M., Șabanova G., Ungurenu I. Contribuții la cunoașterea florei Republicii Moldova. In: *Analele Științifice ale Univ. de Stat din Moldova. Ser. Științe chimico-biologice*, 2000, p. 17-23.
22. Musteață G. *Cultivarea plantelor aromatice*. Chișinău: Cartea Moldovenească, 1980. 240 p.
23. Nistoreanu A. *Plante medicinale din flora Republicii Moldova (Atlas)*. Chisinau, 2006. 234 p.
24. Palii A. *Ameliorarea plantelor*, Chișinău: S.n., (Tipogr. Foxtrot). 2014. 216 p.
25. Pavel A., Vasile C., Buiu C. *Biomatematica și bioinformatica. Concepte și aplicații*, București:Editura Universitară. 2011, 222 p.
26. Păun E. *Salvia sclarea* L. *Tratat de plante medicinale și aromatice cultivate.*, vol. II, Ed. Academia R.S. România, București, 1988, p. 231-243.
27. Rotari A, Rotari E. Particularitățile manifestării heterozisului la diferite niveluri de organizație biologică a genomului hibrizilor simpli de porumb. În: *Lucrări științifice (UASM)*, 2011, vol. 29, p. 60-66.
28. Teleuță A., Munteanu A., Postolache Gh., et. al. Al patrulea raport național cu privire la diversitatea biologică. Chișinău. 2010.
29. Анисимова И.Н. Идентификация генетического и селекционного материала подсолнечника по белкам семян. В: *Аграрная Россия*, 2002, no 3, с. 52-59.
30. Гостев А.А. Мужская стерильность у шалфея мускатного. В: *Труды ВНИИЭМК, Симферополь*, 1971, p. 23-28.
31. Доспехов Б.А. *Методика полевого опыта*. Москва, Агропромиздат, 1985. 351 с.
32. Конарев В. Г. Белки растений как генетические маркеры. М. 1983. 320 с.
33. Кондратенко Е.И., Нетипанова Н.В., Скворцова И.А. и др. *Цитогенетические и молекулярно-биологические методы анализа растений: учебно-методическое пособие*. Астрахань. В: *Астраханский университет*, 2015. 67 с.
34. Созинов А.А. *Полиморфизм белков и его значение в генетике и селекции*. М. В: *Наука*, 1985. 270 с.
35. Agustí N., De Vicente M.C., Gabarra R. Development of sequence amplified characterized region (SCAR) markers of *Helicoverpa armigera*: a new polymerase chain reaction-based technique for predator gut analysis. In: *Mol. Ecol.*, 1999, nr. 8, p.1467-1474.
36. Akkaya M.S., Bhagwat A.A., Cregan P.B. Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. In: *Genetics*. 1992, vol. 132 nr. 4, p. 1131-1139.
37. Alberts B., Johnson A., Lewis J. *Molecular Biology of the Cell*, 5th Edition 5th Edition, Walter, 2007.
38. Aleksić J.M., Stojanović D., Banović B., Jančić R. A simple and efficient DNA isolation method for *Salvia officinalis*. *Biochem Genet*, 2012, vol. 50, nr. 11-12, p. 881-892.
39. Alol L. H. Al-Mzaien K. A. Hussein S. M. The promising anticancer efficacy of parsley seeds flavonoid (Apigenin) in Induced mammary adenocarcinoma (AMN3) Mice. In: *J Physiol Biomed Sci.*, 2012, vol. 25, nr. 1, p. 5-12.
40. Álvarez I., Wendel J.F. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. In: *Mol Phylogenet Evol*, 2003, nr 29, p. 417-434.
41. Alziar G. *Catalogue synonymique des Salvia L. du monde (Lamiaceae)* Biocosvme Mesogéen, 1988-1993, vol. 5, nr. 3-4, p. 87-136.
42. Amzad Hossain M., Ismail Z. High performance thin layer chromatographic determination of caffeic acid and rosmarinic acid from the leaves of *Orthosiphon stamineus* Indo. In: *J. Chem.*, 2009, vol. 9, nr. 1, p. 137-141.

43. 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.
44. Asadi S., Ahmadiani A., Esmaeili M.A., et al. In vitro antioxidant activities and an investigation of neuroprotection by six *Salvia* species from Iran: a comparative study. In: Food Chem Toxicol, 2010, vol. 48, nr. 5, p. 1341-1349.
45. Azwanida N.N. A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. In: Med Aromat Plants, 2015, vol. 4. nr. 3, p.1-6.
46. Balandrin M.F., Klocke J.A. Medicinal, aromatic, and industrial materials from plants. In Biotechnology in Agriculture and forestry, Medicinal and Aromatic Plants I, Ed. by Y. P. S. Bajaj, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, 1988, p. 191-199.
47. Baldwin B.G., Sanderson M.J., Wojciechowski M.F., et al. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. Ann Mo Bot Gard, 1995, nr. 82, p. 247-277.
48. 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.
49. Bardakci F. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. In: Turk J Biol, 2001, vol. 25, p. 185-196.
50. Barnes M.R., Gray I.C., eds., Bioinformatics for Geneticists, first edition. Wiley. 2003, 408 p. ISBN 0-470-84394-2.
51. Bartish I.V., Rumpunen K., Nybom H. Combined analyses of RAPDs, cpDNA and morphology demonstrate spontaneous hybridization in the plant genus *Chaenomeles*. In: Heredity, 2000, nr. 85, p. 383-392.
52. Başer K.H.C., Ağalar H.G., Celep F. The comparison of volatile components of *Salvia ceratophylla* L. collected from different regions in Turkey. In: Turk J Pharm Sci, 2015, vol. 12, nr. 1, p. 53-58.
53. Biswas K., Kapoor A., Biswas R. Authentication of herbal medicinal plant - *Boerhavia diffusa* L. Using PCR-RFLP. In: Current Trends in Biotechnology and Pharmacy, 2013, vol. 7, nr. 3, p. 725-731.
54. Botstein D., White R.L., Skolnick M. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. In: Am J Hum Genet, 1980, vol. 32, p. 314-331.
55. Bruna S., Giovannini A., De Benedetti L. et al. Molecular analysis of *Salvia* Spp. through RAPD markers. In: Acta Horticulturae, 2006, vol. 723, p. 157-160.
56. Çadirci E., Süleyman H., Gürbüz, P., et al. Antiinflammatory effects of different extracts from three *Salvia* species. In: Turk. J. Biol. 2012, vol. 36, p. 59-64.
57. Cahill J.P. Genetic diversity among varieties of Chia (*Salvia hispanica* L.). In: Genetic Resources and Crop Evolution, 2004, vol. 51, p. 773-781.
58. Caissard J.C., Olivier T., Delbecq C, et. al. Extracellular localization of the diterpene sclareol in clary sage (*Salvia sclarea* L., Lamiaceae). In: PLoS One, 2012, vol. 7, nr. 10, p. 1-8.
59. Campbell A.K. Save those molecules: molecular biodiversity and life. In: J. of Applied Ecology, 2003, vol. 40, nr. 2, p. 193-203.
60. 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.
61. Cantalapiedra A., Gismera M.J., Sevilla M.T. et al. Sensitive and selective determination of phenolic compounds from aromatic plants using an electrochemical detection coupled with HPLC method. In: Phytochemical Analysis, 2014, vol. 25, nr. 3, p. 247-254.

62. Canter P.H., Howard T., Edzard E. Bringing medicinal plants into cultivation: opportunities and challenges for biotechnology. In: Trends in Biotechnology, 2005, vol. 23, nr. 4, p. 180-185.
63. Cantino P.D., Harley R.M., Wagstaff S.J. Genera of Labiatae: status and classification. In: Raymond M. Harley and Tom Reynolds (editors). Advances in Labiate Science. Richmond, Royal Botanic Gardens, Kew. 1992, p. 511-522.
64. Capatana A., Port A., Barbacar N. The estimation of heterosis effect based on molecular analysis (RAPD) in sunflower/Genetic polymorphism in homo- and heterozygote genotypes of sunflower. Romanian J. Genet., 2005, vol 1, p. 22-31.
65. Carrubba A., LA Torre R., Piccaglia R. et al. Characterization of an Italian biotype of clary sage (*Salvia sclarea* L.) grown in a semiarid Mediterranean environment. In: Flav Fragr J, 2002, vol. 17, p. 191-194.
66. Casabianca H., Graff J.B. Chiral analysis of linalool and linalyl acetate in various plants. In: Rivisita Ital EPPOS, 1996, nr. 7 (spec. num.), p. 227-243.
67. Chan H.H., Hwang T.L., Su C.R., et al. Anti-inflammatory, anticholinesterase and antioxidative constituents from the roots and the leaves of *Salvia nipponica* Miq. var. *formosana*. In: Phytomedicine, 2011, vol. 18, p. 148-150.
68. Chen X., Zhou H., Liu Y.B., et al. Database of traditional Chinese medicine and its application to studies of mechanism and to prescription validation. In: Br J Pharmacol, 2006, vol. 149, p. 1092-2003.
69. Chiriac G.I., Andronic L.I., Bujoreanu V.V., Marii L.I. Features of crossing-over in virus-infected tomato. In: Central European J. of Biology, 2006, vol. 1, nr. 3, p. 386-398.
70. Chua L.S. A review on plant-based rutin extraction methods and its pharmacological activities. In: J Ethnopharmacol, 2013, vol. 150, nr. 3, p. 805-817.
71. Cilliers J.J.L., Singleton V.L. Caffeic acid autoxidation and the effects of thiols. In: J. Agric. Food Chem., 1990, vol. 38, nr. 9, p. 1789-1796.
72. Clebsch B., Barner C.D. *The New Book of Salvias*. Timber Press. 2003. p. 115-117. ISBN 978-0-88192-560-9.
73. Coisin M., Necula R., Grigoraş V., Gille E. et al. Phytochemical evaluation of some *Salvia* species from *Romanian flora*, *Analele Ştiinţifice ale Universităţii „Al. I. Cuza” Iaşi*, s. II a. *Biologie vegetală*, 2012, vol. 58, nr. 1, p. 35-44.
74. Collard B.C.Y., Mackill D.J. Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. In: Phil. Trans. R. Soc. 2008, vol. 363, p. 557-572.
75. Collins F., Green E., Guttmacher A., et al. A vision for the future of genomics research, In: Nature, 2003, vol. 422, p. 835-847.
76. Cullis, C.A. *Plant Genomics and Proteomics*, Wiley-Liss. 2002. 232 p. ISBN 978-0-471-37314-8.
77. Dangi R.S., Lagu M.D., Choudhary L.B. et al. Assessment of genetic diversity in *Trigonella foenum-graecum* and *Trigonella caerulea* using ISSR and RAPD markers. In: BMC Plant Biol, 2004, vol. 4, p. 4-13.
78. Dekkers J.C.M., Hospital F. The use of molecular genetics in the improvement of agri cultural populations. In: Nature Review Genetics, 2002, nr. 3, p. 22-32.
79. Delmas C.E., Lhuillier E., Pornon A., Escaravage N. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Rhododendron ferrugineum* (Ericaceae) using pyrosequencing technology. In: Am J Bot, 2011, vol. 98, p. 120-122.
80. Demain A.L., Fang A. The natural functions of secondary metabolites. In: Adv Biochem Eng Biotechnol., 2000, vol. 69, p. 1-39.
81. Deng YP et al. Application of bioinformatics and systems biology in medicinal plant studies. In: Chinese Herbal Medicines, Reviews, 2010, vol. 2, nr. 3, p. 170-179.

82. Dikova B. Establishment of some viruses-polyphages on economically important essential oil-bearing and medicinal plants in Bulgaria. In: *Biotechnol.& Biotechnol. Eq.*, 2009, nr. 23 (2SE), p. 80-85.
83. Dimas K., Hatziantoniou S., Tseleni S., et al. Sclareol induces apoptosis in human HCT116 colon cancer cells in vitro and suppression of HCT116 tumor growth in immunodeficient mice. In: *Apoptosis*, 2007, vol. 12, nr. 4, p. 685-694.
84. Dimas K., Kfokkinopoulos D., Demetzos C., et al. The effect of sclareol on growth and cell cycle progression of human leukemic cell lines, In: *Leukemia Research*, 1999, vol. 23, nr. 3, p. 217-234.
85. Dimas K., Papadaki M., Tsimplouli C. et al. Labd-14-ene-8,13-diol (sclareol) induces cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer cells and enhances the activity of anticancer drugs. *Biomed Pharmacother*, 2006, nr. 60, vol. 3, p. 127-33.
86. Dorman H.J.D., Deans S.G. Antimicrobial agents from plants, antibacterial activity of plant volatile oils. In: *J. Appl. Microbiol.*, 2000, vol. 88, p. 308-316.
87. Doyle J. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. In: *Phytochem Bull*, 1987, vol. 19, p. 11-15.
88. Duca M., Port A., Levițchi A. Characteristics of RAPD markers in breeding of *Cucumis sativus* L. In: *Roumanian Biotechnological Letters*, 2008, vol. 13, nr. 4, p. 3843-3850.
89. 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, ISSN 1875-064X.
90. 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.
91. Dzamic A., Sokovic M., Ristic M., et al. Chemical composition and antifungal activity of *Salvia sclarea* (Lamiaceae) essential oil. In: *Arch Biol Sci Belgrade J.*, 2008, vol. 60, nr. 2, p. 233-237.
92. Ebrahimi S.N., Kiyanpour V., J Hadian et. al. Determination of rosmarinic acid content in some Iranian *Satureja* species by HPTLC. In: *Planta Med* 2008, vol. 74, nr. 9, p. 101.
93. 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 Medicinai*s, 2006, vol. 8(esp), p. 13-17.
94. Elfahmia W.H.J., Kayserc O. Jamu: Indonesian traditional herbal medicine towards rational phytopharmacological use. In: *J. of Herbal Medicine*, 2014, vol. 4, nr. 2, p. 51-73.
95. Elmarie van der Watt L. Pretorius J.C. Purification and identification of active antibacterial components in *Carpobrotusedulis* L. In: *J. of Ethnopharmacology*, 2001, vol. 76, nr. 1, p. 87-91.
96. Elnir O., Ravid U., Putievsky E. et al. The chemical composition of two clary sage chemotypes and their hybrids. In: *Flavour and Fragrance J.*, 1991, vol. 6, nr. 2, p. 153-55.
97. Erdemoğlu N., Turan N.N., Çakıcı I., et al. Antioxidant activities of some Lamiaceae plant extracts. In: *Phytother Res*, 2006, vol. 20, nr. 1, p. 9-13.
98. *European Pharmacopoeia* 5th Ed. Main Volume 5.0, 2005 with Supplements 5.1 and 5.2 (Euroean Pharmacopoeia) Council of Europe. 2004. pp. 1311.
99. Farkas P., Holla M., Tekel J. et al. Composition of the essential oils from the flowers and leaves of *Salvia sclarea* L. (Lamiaceae) cultivated in Slovak Republic. In: *J Essent Oil Res*, 2005, vol. 17, p. 141-144.
100. Feng T., Liu S., He X.J. Molecular authentication of the traditional Chinese medicinal plant *Angelica sinensis* based on internal transcribed spacer of nrDNA. *Electron. In: J. Biotechnol.*, 2010, vol. 13, p. 1-10.

101. Filippou F., Trantas E., Douglas C. et al. Biotechnology of flavonoids and other phenylpropanoid-derived natural products. Part I: Chemical diversity, impacts on plant biology and human health. In: *Biotechnology J.*, 2007, vol. 2, nr. 10, p. 1214-34.
102. Francia E., Tacconi G., Crosatti C., et al. Marker assisted selection in crop plants. *Plant Cell Tissue Org*, 2005, vol. 82, p. 317-342.
103. Frankham R., Ballou J.D., Dudash M.R. Implications of different species concepts for conserving biodiversity. In: *Biological Conservation*, 2012, vol. 153, nr. 2012, p. 25-31.
104. Fu D., Xiao M., Hayward A., et al. Utilization of crop heterosis: a review. In: *Euphytica*, 2014, vol. 2, nr. 197, p. 161-173.
105. Fu J., Yang L., Khan M.A., Mei Z. Genetic characterization and authentication of *Lonicera japonica* Thunb. by using improved RAPD analysis. In: *Molecular Biology Reports*, 2013, vol. 40, nr. 10, p. 5993-5999.
106. Gaikwad J., Khanna V., Vemulpad S., et al. CMKb: a web-based prototype for integrating Australian Aboriginal customary medicinal plant knowledge. In: *BMC Bioinformatics*, 2008, vol. 9 (Suppl 12), S25p, 1-8.
107. Gasteiger E., Gattiker A., Hoogland C. et al. ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. In: *Nucleic Acids Research*, 2003, vol. 31, nr. 13, p. 3784-3788.
108. Gaston K.J., Spicer J.I. *Biodiversity: an introduction*, Blackwell Publishing. 2nd Ed. 2004. 208 p. ISBN 1-4051-1857-1.
109. Gershenzon J., Dudareva N. The function of terpene natural products in the natural world. In: *Nat Chem Biol*, 2007, nr. 3, p. 408-414.
110. Ghosh S., Majumder P.B., Mandi S.S. Species-specific AFLP markers for identification of *Zingiber officinale*, *Z. montanum* and *Z. zerumbet* (Zingiberaceae). In: *Genetics and Molecular Research*, 2011, vol. 10, nr. 1, p. 218-229.
111. Gilbert D. Bioinformatics software resources. In: *Brief Bioinform.*, 2004, vol. 5, nr. 3, p. 300-304.
112. Godwin I.D., Aitken E.A.B., Smith L.W. Application of inter-simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics. In: *Electrophoresis*, 1997, vol. 18, p. 1524-1528.
113. Goncariuc M. Gene sources of *Salvia sclarea* from the geographical remote regions valuable for breeding. In: Abstract book of the International Conference „Plant genetic stocks-the basis of agriculture of today”, Bulgaria, Садово, IPGR, 2007, vol. 1, p. 145-148.
114. Goncariuc M. Genetics and breeding of *Salvia sclarea* L. species. In: *J. Hop and medicinal plants*, Academic Pres, Cluj-Napoca, Romania, XVI, 2008, nr.1-2, vol. 31-32, p. 132-139.
115. Goncariuc M. *Salvia sclarea* L. varieties and hybrid population source of natural aromatic and antimicrobial high quality compounds. In: Abstract of Symposium Health, Environment and Natural Substances. Metz. France, 2000, p. 66.
116. Goncariuc M., Balmuş Z. Combining ability of inbred lines of *Salvia sclarea* L. in S10-S12 generation. In: Proceeding of the symposium „Medicinal Plants-Present and Perspectives”, Alma Mater press. România, 2003, p. 46-49.
117. Goncariuc M., Balmuş Z. *Salvia sclarea* L. precocious hybrids with high content of essential oil. In: Proceeding of the symposium „Medicinal Plants-Present&Perspectives”, Alma Mater press. România, 2003, p. 50-53.
118. Goncariuc M., Balmuş Z. Studies of Genetics and breeding of aromatic and medicinal plants carried out in the Republic of Moldova. In: Abstract book of the International scientific conference „Plant genetic stocks - the basis of agriculture of today”, Bulgaria, Садово, IPGR, 2007, vol.1, p. 140-144.
119. Goncariuc M., Balmuş Z., Cotelea L. *S. sclarea* precocious stepwise and backcross hybrids. In: *J. Romanian Biological Sciences*, 2007, nr.1-2, p. 54-55.

120. Goncariuc M., Balmuş Z., Kulcithki V. The hybrid populations of *Salvia sclarea* L. with high content of linalil acetate and sclareol in essential oils. In: Abstract book of the International Colloquium on Medicinal plants Environment /Development. Rabat, Morocco, 2002, p. 12-14.
121. Goncariuc M., Gille E., Cotelea L., et al. Heterosis effect in *Salvia sclarea* L. (clary sage) perspective hybrids. In: Proceedings 6th Conference on Aromatic and Medicinal Plants of CMAPSEEC, Antalya, Turkey, 2010, p. 363-372.
122. Goncariuc M., Roşca N. The flowering rate in crop is an appreciation criterion of hybrid population of *Salvia sclarea* L. In: J. Plant Physiology and Biochemistry, Budapest, 2000, vol. 38, supplement, p. 78-81.
123. Goncariuc, M., Balmuş Z. Genetics-amelioration studies for aromatic and medicinal plants in Moldova Republic. In: Proceedings 4th Conference on Medicinal and Aromatic Plants of South-Est. European Countries. Alma Mater Publ. House. România, 2006, p. 112-116.
124. 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.
125. Gowda B., Chandrika K., Prasanna. K. T. AFLP authentication of *Embelia ribes* Burm. F and *Embelia tsjeriam* Cottam A. DC. In: International J. of Science and Nature, 2010, vol. 1, nr. 1, p. 58-60.
126. 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.
127. Günnewich N., Higashi Y., Feng X., et al. A diterpene synthase from the clary sage *Salvia sclarea* catalyzes the cyclization of geranylgeranyl diphosphate to (8R)-hydroxy-copalyl diphosphate. In: Phytochemistry, 2013, vol. 91, p. 93-99.
128. Gupta S., Afaq F., Mukhtar H. Selective growth-inhibitory, cell-cycle deregulatory and apoptotic, response of apigenin in normal versus human prostate carcinoma cells. In: Biochem Biophys Res Commun, 2001, vol. 287, p. 914-920.
129. Ha W.Y., Shaw P.C., Liu J., et al. Authentication of *Panax ginseng* and *Panax quinquefolius* using amplified fragment length polymorphism (AFLP) and directed amplification of minisatellite region DNA (DAMD). In: J Agric Food Chem, 2002, vol. 50, nr. 7, p. 1871-1875.
130. Halberstein R.A. Medicinal plants: historical and cross-cultural usage patterns. In: AEP 2005, vol. 15, p. 686-699.
131. Handa S.S., Khanuja S.P.S., Longo G., Rakesh D.D. Extraction technologies for medicinal and aromatic plants, International Centre for Science and High Technology, Trieste, 2008, ICS UNIDO, 260 p.
132. Hao D.C., Vautrin S., Song C., et al. The first insight into the *Salvia* (*Lamiaceae*) genome via BAC library construction and high-throughput sequencing of target BAC clones. In: Pak J Bot., 2015, vol. 47, nr 4, p. 1347-1357.
133. Hao D.C., Xiao P.G. Genomics and evolution in traditional medicinal plants: Road to a healthier life. Evol Bioinform Online, 2015, vol. 11, p. 197-212.
134. Hart B.L. The evolution of herbal medicine: behavioral perspectives. In: Anim Behav 2005, vol. 70, p. 975-989.
135. Hernandez-Perez M, Rabanal R.M., de la Torre M.C., et al. Analgesic, anti-inflammatory, antipyretic and haematological effect of aethiopinone, an o-naphthoquinone diterpenoid from *Salvia aethiopsis* roots and two hemisynthetic derivatives. In: Planta Med 1995, vol. 61, p. 505-509
136. 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, e1002021.

137. Hori H, Osawa S. Origin and evolution of organisms as deduced from 5S ribosomal RNA sequences. In: Mol Biol Evol, 1987, vol 4, p. 445-72.
138. Hristova Y., Gochev V., Wanner J. Chemical composition and antifungal activity of essential oil of *Salvia sclarea* L. from Bulgaria against clinical isolates of *Candida* species. In: J. BioSci. Biotech., 2013, vol. 2, nr. 1, p. 39-44.
139. Ilieva S. New *Salvia sclarea* L. cultivars developed by hybridization. Acta Horticulturae, 1980, vol. 96, p. 197-203.
140. Iwashina T., Kokubugata G. Flavone and flavonol glycosides from the leaves of *Triumfetta procumbens* in Ryukyu Islands. In: Bull. Natl. Mus. Nat. Sci., Ser. B, 2012, vol. 38, nr. 2, p. 63-67.
141. Ji Z.L., Zhou H., Wang J.F., et al. Traditional Chinese medicine information database. In: J Ethnopharmacol, 2006, vol. 149, nr. 8, p. 1092-1103.
142. Kafatos, F. Straight talk with..Fotis Kafatos. In: Nature Medicine, 2008, vol. 14, nr. 9, p. 902-903.
143. Kahraman A., Celep F., Dogan M. Comparative morphology, anatomy and palynology of two *Salvia* L. species (Labiatae) and their taxonomic implications. In: Bangl J Plant Taxon, 2009, vol. 16, p. 73-82.
144. Kim B.B., Jeong J.H., Jung S.J., et al. Authentication of Korean Panax ginseng from Chinese Panax ginseng and Panax quinquefolius by AFLP analysis. In: J. Plant Biotechnol, 2005, vol. 7, p. 81-86.
145. Kim G.D., Park Y.S., Jin Y.H. et al. Production and applications of rosmarinic acid and structurally related compounds. In: Appl Microbiol Biotechnol, 2015, vol. 99, nr. 5, p. 2083-2092.
146. Kintzios S.E. (ed.). Sage: The Genus Sage, Harwood Academic Publishers, Amsterdam. 2000.
147. 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.
148. Kong B.H., Zhang H.Y., Xiong Y.L. Antioxidant activity of spice extracts in a liposome system and in cooked pork patties and the possible mode of action. In: Meat Sci, 2010, vol. 85, p. 772-778.
149. 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.
150. Kress W.J., Wurdack K.J., Zimmer E.A., et al. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. In: Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, vol. 102, p. 8369-74.
151. Kuźma L., Kalemba D., Różalski M., et al. Chemical composition and biological activities of essential oil from *Salvia sclarea* plants regenerated in vitro. In: Molecules, 2009, vol. 14, p. 1438-1447.
152. Lamkey K.R., Lee M. Plant Breeding The Arnel R. Hallauer International Symposium. Wiley-Blackwell. 2006. 379 p. ISBN: 978-0-8138-2824-4.
153. Lange D. The Role of East and Southeast Europe in the Medicinal and Aromatic Plant Trade. In: Kathe, W., S. Honnef & A. Heym: Medicinal and Aromatic Plants in Albania, Bosnia Herzegovina, Bulgaria, Croatia and Romania, 2003, p. 64-77, Bundesamt für Naturschutz, Bonn (BfN-Skripten 91).
154. Laville R. et al. Amphilectane diterpenes from *Salvia sclarea*: biosynthetic considerations. In: J Nat Prod., 2012, vol. 75, nr. 2, p. 121-126.
155. Lawless J. The Encyclopaedia of Essential Oils. Thorsons, Hammersmith, London, 2002.
156. Leimar O. The evolution of phenotypic polymorphism: randomized strategies versus evolutionary branching. In: Am Nat., 2005, vol. 165, nr. 6, p. 669-681.

157. Lesk A.M. Introduction to Bioinformatics. In: Biotechnology J., Special Issue: Biotech in South Africa, 2008, vol 3, nr. 11, p. 1452-1453.
158. Li G., Park Y.J. SCAR markers for discriminating species of two genera of medicinal plants, *Liriope* and *Ophiopogon*. In: Genet Mol Res., 2012, vol. 11, nr. 3, p. 2987-2996.
159. Liu X., Zhu F., Ma X., et al. The Therapeutic Target Database: an internet resource for the primary targets of approved, clinical trial and experimental drugs. In: Exp Opin TherapeuticTargets 2011, vol. 15, p. 903-912.
160. Liu Y., Zeng S., Sun W. et al. Comparative analysis of carotenoid accumulation in two goji (*Lycium barbarum* L. and *L. ruthenicum* Murr.) fruits. In: BMC Plant Biology, 2014, vol. 14. nr 269, p. 1-14.
161. 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.
162. Lorenzo D., Paz D., Davies P., et al. Characterization and enantiomeric distribution of some terpenes in the essential oil of a Uruguayan biotype of *Salvia sclarea* L. In: Flav Fragr J, 2004, vol. 19, p. 303-307.
163. Loub W.D., Farnsworth N.R., Soejarto D.D., et al. NAPRALERT: computer handling of natural product research data. In: JChemInformComputSci, 1985, vol. 25, p. 99-103.
164. Lu Y. Functional significance of genetic polymorphisms. Frontiers of Biology in China, 2010, vol. 4, nr. 3, p. 266-270.
165. Lu Y., Foo Y. Polyphenolics of *Salvia* - a review. Phytochemistry, 2002, vol. 59, nr. 2, p. 117-140.
166. Lupaşcu G. The role of interactions in the formation of valuable quantitative trait phenotypes in farm plants. Buletinul ASM, Ştiinţele vieţii, 2010, vol. 2, nr. 311, p. 122-125.
167. Ma X.H., Ma Y., Tang J.F. The Biosynthetic Pathways of Tanshinones and Phenolic Acids in *Salvia miltiorrhiza*. Molecules, 2015, vol. 20, nr. 9, p. 16235-16254.
168. Makkar H.P.S. Quantification of tannins in tree foliage: A laboratory manual for FAO/IAEA coordinated research project on the Use of nuclear and related techniques to develop simple tannin assay for predicting and improving the safety and efficiency of feeding ruminants on the tanniniferous tree foliage. Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture, Vienna, 1999, p. 1-29.
169. Marston A. Thin-layer chromatography with biological detection in phytochemistry. In: J. of Chromatography, 2011, vol. 1218, nr. 19, p. 2676-2683.
170. **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, Braşov, România, 2013, p. 29. ISSN 1844-6604.
171. **Martea R.** Şestacova T. and Clapco S. HPPR gene expression in *Salvia sclarea* L. from Republic of Moldova. Studia Universitatis Babeş-Bolyai Biologia, 2015, LX, Sp. Iss., p. 45-47.
172. **Martea R.**, Leviţchi A., Duca M. Development of semantic ontology for integration of biological data, III International Vavilov Conference “N.I. Vavilov’s Ideas in the Modern World” Abstrakt book, Sankt-Petersburg, Russia, November 5-9, 2012, p. 238.
173. Martin E., Cetin O, Kahraman A., et al. A cytomorphological study in some taxa of the genus *Salvia* L. (Lamiaceae). In: Caryologia, 2011, vol. 64, nr.3, p. 272-287.
174. Masi L.D., Siviero P., Esposito C., et al Assessment of agronomic, chemical and genetic variability in common basil (*Ocimum basilicum* L.). European Food Research and Technology, 2006, vol. 223, p. 273-281.
175. Masoudi-Nejad A., Goto S., Jauregui R., et al. EGENES: transcriptome-based plant database of genes with metabolic pathway information and expressed sequence tag indices in KEGG. In: Plant Physiol, 2007, vol. 144, p. 857-866.

176. Mehrnia M., Shahin Z., Ashrafoldin S.S. Intra- and inter- specific relationships within the *Astragalus microcephalus* complex (Fabaceae) using RAPD. In: Biochemical Systematics and Ecology. 2005, vol. 33, p. 149-158.
177. Mekhraz R., Peshevski N., Apostolova B., Konovska B. Production and study of a line with high content of essential oil in *Salvia sclarea*. Rasteniev dni Nauki, 1988, vol. 25, p. 36-39
178. Melchinger A.E. Genetic diversity and heterosis. The Genetics and Exploitation of Heterosis in Crops. Crop Science Society of America, Eds J.G. Coors & S. Pandey, 1999, p. 99-118.
179. Meuwissen T. Genomic selection: marker assisted selection on a genome wide scale. In: J. Anim. Breed. Genet., 2007, vol. 124, p. 321-322.
180. Meyer H., Bolarinwa A., Wolfram G., et al. Bioavailability of apigenin from apiin-rich parsley in humans. In: Annals of Nutrition and Metabolism, 2006, vol. 50, nr. 3, p. 167-72.
181. Michalczyk I.M., Sebastiani F., Buonamici A., et al. Characterization of highly polymorphic nuclear microsatellite loci in *Juniperus communis* L. In: Molecular Ecology Notes, 2006, vol. 6, nr. 2, p. 346-348.
182. Misra A., Shasany A.K., Shukla A.K., et al. AFLP markers for identification of *Swertia* species (Gentianaceae). In: Genet. Mol Res., 2010, vol. 9, p. 1535-1544.
183. Mohan L., Kans H. Male sterility in higher plants. Monographs on theoretical and applied genetics, 1990, vol. 10, p. 1005.
184. Mondini L., Noorani A., Pagnotta M.A. Assessing plant genetic diversity by molecular tools. In: Diversity, 2009, vol. 1, nr. 1, p. 19-35.
185. Montelone B.A. *Mutation, Mutagens, and DNA Repair*. 1998.
186. Moody G. Digital Code of Life: How Bioinformatics is Revolutionizing Science, Medicine, and Business, Hardcover-Handbook/Reference Book. 2004. 400 p.
187. 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.
188. Moretti M.D.L., Peana A.T., Satta M.A. A study of anti-inflammatory and peripheral analgesic actions of *Salvia sclarea* oil and its main constituents. In: Essential Oil Research J., 1997, vol. 9, p. 199-204.
189. Morrell P.L., Buckler E.S., Ross-Ibarra J. Crop genomics: advances and applications. In: Nature Reviews, Genetics, 2012, vol. 13, p. 85-96.
190. Mossi A.J., Cansian R.L., Paroul N. et al. Morphological characterisation and agronomical parameters of different species of *Salvia* sp. (*Lamiaceae*). In: Braz J. Biol, 2011, vol. 71, nr. 1, p. 21-29.
191. Mufti F.U., Aman S., Banaras S., et al. Actin gene identification from selected medicinal plants for their use as internal controls for gene expression studies. In: Pak. J. Bot., 2015, vol. 47, nr. 2, p. 629-635.
192. Mukherjee P. K., Wahile A. Integrated approaches towards drug development from Ayurveda and other Indian system of medicines. In: J. of Ethnopharmacology, 2006, vol. 103, nr. 1, p. 25-35.
193. Murray M.G., Thompson W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. In: Nucleic Acids Res. 1980, vol. 8, nr.19, p. 4321-4325, PMID: PMC324241.
194. Nei M. Genetic distance between populations. In: Am. Nat., 1972, vol. 106, p. 283-292.
195. Newman D.J., Cragg G.M., Snader K.M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. In: J Nat Prod, 2003, vol. 66, p. 1022-1037.
196. Newman D.J., Cragg G.M., Snader K.M. The influence of natural products upon drug discovery. In: Nat Prod Rep, 2000, vol. 17, p. 215-234.
197. Nickavar B., Kamalinejad M., Izadpanah H. In vitro free radical scavenging activity of five salvia species. In: Pak. J. Pharm. Sci., 2007, vol 20, nr. 4, 291-294.

198. Noori S., Hassan Z.M., Mohammadi M. et al. Sclareol modulates the Treg intra-tumoral infiltrated cell and inhibits tumor growth in vivo. In: Cell Immunol., 2010, vol. 263, nr. 2, p. 148-153.
199. Nunez A., Strahan G., Soroka D. S., et al. United States Department of Agriculture/Agricultural Research Service (USDA-ARS) Eastern Regional Research Center Core Technologies. In: J Biomol Tech, 2011, vol. 22, p. 33.
200. 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.
201. Ogutcu H., Sokmen A., Sokmen M., et al. Bioactivities of the various extracts and essential oils of *Salvia limbata* C.A.Mey. and *Salvia sclarea* L. In: Turk J Biol, 2008, vol. 32, p. 181-192.
202. Oldfield E., Lin F.Y. Terpene biosynthesis: Modularity rules. Angewandte Chemie International 2012, Edition, 51, p. 1124-1137.
203. Olmstead R.G., Palmer J.D. Chloroplast DNA systematics: a review of methods and data analysis. In: Am J Bot, 1994, vol. 81, p. 1205-1224.
204. Ostell J. The NCBI handbook, 2nd edition, Chapter 15, The Entrez Search and Retrieval System, 2002.
205. Pan I. Plant Genomics and Proteomics Yale. In: J Biol Med, 2003, vol. 76, nr. 4-6, p. 198-199.
206. Pan S.Y. Historical Perspective of Traditional Indigenous Medical Practices: The Current Renaissance and Conservation of Herbal Resources Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2014, vol. 2014, p. 1-20
207. Passinho-Soares H., Felix D., Auxiliadora K. M. Authentication of medicinal plant botanical identity by amplified fragmented length polymorphism dominant DNA MARKER: Inferences from the *Plectranthus* Genus. In: Planta Med, 2006, vol. 72, p. 256-257
208. Patel D., Shukla S., Gupta S. Apigenin and cancer chemoprevention: progress, potential and promise. In: Int J Oncol, 2007, vol. 30, p. 233-245.
209. Paun O., Schönswetter P. Amplified fragment length polymorphism: an invaluable fingerprinting technique for genomic, transcriptomic, and epigenetic studies. In: Methods Mol Biol., 2012, nr. 862, p. 75-87.
210. Peana A.T., Moretti M.D., Juliano C. Chemical composition and antimicrobial action of the essential oils of *Salvia desoleana* and *S. sclarea*. In: Planta Med., 1999, vol. 65, nr. 8, p. 752-754.
211. Percifield R.J., Hawkins J.S., McCoy J.A. et al. Genetic diversity in *Hypericum* and AFLP markers for species-specific identification of *H. perforatum* L. In: Planta Med., 2007, vol. 73, p. 1614-1621.
212. Petersen M., Simmonds M.S. Rosmarinic acid. In: Phytochemistry, 2003, vol. 62, nr. 2, p. 121-125.
213. Phansawana B, Pongsabangphob S. Determination of gallic acid and rutin in extracts *Cassia alata* and *Andrographis paniculata*. In: ScienceAsia, 2014, vol. 40, p. 414-419.
214. Poduri C.D. Medicinal And Aromatic Plants (maps): A Mini-review. In: Biotechnology, 2013, vol. 4, nr. 11, p. 1-5. WMCPLS00292.
215. Quideau S.P., Deffieux D., Douat-Casassus C.L., et al. Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis. Angewandte Chemie International Edition, 2011, vol. 50, nr. 3, p. 586-621.
216. Rajabia Z., Ebrahimia M., Farajpoura M. et al. Compositions and yield variation of essential oils among and within nine *Salvia* species from various areas of Iran. In: Ind Crop Prod, 2014, vol. 61, p. 233-239.

217. Reif J.C., Hahn V., Melchinger A.E. Genetic basis of heterosis and prediction of hybrid performance. In: *Helia*, 2012, vol. 35, nr. 57, p. 1-8.
218. Rhee S.Y. Bioinformatics and its applications in plant biology. In: *Plant. Biol.* 2006. p. 335-360
219. Richman A. Evolution of balanced genetic polymorphism. In: *Mol Ecol*, 2000, vol. 9, p. 1953-1963.
220. Robbins R.J. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. In: *J. of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, vol. 51, p. 2866-2887.
221. Russi L., Moretti C., Raggi L. Identifying commercially relevant Echinacea species by AFLP molecular markers. In: *Genome*. 2009, vol. 52, nr. 11, p. 912-918.
222. Salim K., Khanda J.M., Md T., Malik Z. A. RAPD pro- file for authentication of Medicinal plant *Glycyrrhiza glabra* L. In: *Internet J. of Food safety*, 2009, vol. 11, p. 24-28
223. Savchenko L.F. Production and selection of polyploid forms in varieties of clary sage of different ecological and geographical origin on the basis of indirect characters. *Trudy Vsesoyuznyi Nauch. Issl. Inst. Effir. Kultur.*, 1990, vol. 21, p. 24-33
224. Sawant L., Kachwala Y., Sangave P. et. al. High-performance thin-layer chromatographic quantification of kaempferol and apigenin in the whole-plant powder of *Sida spinose* Linn. In: *Journal of Planar Chromatography, Modern TLC*, 2014, vol. 25, nr. 4, p.
225. Scarpati M.L., Oriente G. Isolamento e costituzione dell'acido rosmarinico (dal *Rosmarinus* off.). *Ric. Sci*, 1958, vol. 28, p. 2329-2333.
226. 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.
227. Seethapathy G.S., Balasubramani S.P., Venkatasubramanian P. nrDNA ITS sequence based SCAR marker to authenticate *Aconitum heterophyllum* and *Cyperus rotundus* in Ayurvedic raw drug source and prepared herbal products. In: *Food Chemistry*, 2014, vol. 145, p. 1015-1020.
228. Semagn K., Bjornstad A. Ndjiondjop M.N. An overview of molecular marker methods for plants. In: *Afr. J. Biotechnol*, 2006, vol. 5, p. 2540-2568.
229. Setzer W.N. Essential oils and anxiolytic aromatherapy. In: *Nat Prod Commun*, 2009, nr. 4, p. 1305-1316.
230. 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.
231. Shinde V.M., Dhalwal K., Mahadik K.R., et al. RAPD analysis for determination of components in herbal medicine. In: *Evid Based Complement Altern Med*. 2007, vol. 4, p. 21-23.
232. Shirasawa K., Ishii K., Kim C., et al. Development of Capsicum EST-SSR markers for species identification and in silico mapping onto the tomato genome sequence. In: *Mol. Breed.*, 2013, vol. 31, nr. 1, p. 101-110.
233. Shirsat R., Kokate P., Surdakar S. Morphological and anatomical characterization of *Salvia plebeia* from Maharashtra (India). In: *Bioscience Discovery*, 2012, vol. 3, nr. 2, p. 165-168.
234. Shukla S., Gupta S. Apigenin: A Promising Molecule for Cancer Prevention. In: *Pharm Res.*, 2010, vol. 27, nr. 6, p. 962-978.
235. Singleton V.L., Rossi J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. In: *American J. of Enology and Viticulture*, 1965, vol. 37, p. 144-158.
236. Sivropoulou A., Nikolaou C., Papanikolaou E. et al. Antimicrobial, cytotoxic and antiviral activity of *Salvia fruticosa* essential oil. In: *J. of Agricultural and Food Chemistry*, 1997, vol 45, p. 3197-3201.

237. Skoczen S., Bussmann R.W. ebDB - Filling the gap for an International Ethnobotany Database. In: *Lyonia*, 2006, vol. 11, nr. 2, p. 71-81.
238. Skoula M., Hilali I.E., Makris A.M. Evaluation of the genetic diversity of *Salvia fruticosa* Mill. clones using RAPD markers and comparison with essential oil profiles. In: *Biochem. Syst. Ecol*, 1999, vol. 27, p. 559-568.
239. Small R.L., Cronn R.C., Wendel J.F. Use of nuclear genes for phylogeny reconstruction in plants. In: *Aust Syst Bot*, 2004, vol. 17, p. 145-170.
240. Srinivasa Rao A., Ahmed M. F., Rasheed N.M.A.. Simultaneous estimation of quercetin and rutin in ethanolic extract of *Melia azedarach*. Linn leaves by HPTLC method. In: *Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*, 2013, vol. 3, nr. 21, p. 56-59.
241. Stevens R., Goble C.A., Bechhofer S. Ontology-based Knowledge Representation for Bioinformatics. In: *Briefings in Bioinformatics*, 2000, vol. 1, nr. 4, p. 398-416.
242. Stevens R., Lord P., Staab S. Application of ontologies in bioinformatics. In: *Handbook on Ontologies in Information Systems*. Second edn, International Handbook on Information Systems, Springer, p. 347-485.
243. Sultan P., Shawl A.S., Rehman S., et al. Molecular characterization and marker based chemotaxonomic studies of *Podophyllum hexandrum* Royle. In: *Fitoterapia* 2010, vol. 81, p. 243-247.
244. Tamhankar S., Ghate V., Raut A., et al. Molecular profiling of “Chirayat” complex using inter simple sequence repeat (ISSR) markers. In: *Planta Med.*, 2009, vol. 75, p. 1266-1270.
245. Taylor D., Hamilton A.C., Lewis S.L., et al. Thirty-eight years of change in a tropical forest: plot data from Mpanga Forest Reserve, Uganda. In: *Afr J Ecol*, 2008, vol. 46, p. 655-667.
246. Tepe B., Donmez E., Unlu M., et al. Antimicrobial and antioxidative activities of the essential oils and methanol extracts of *Salvia cryptantha* (Montbret et Aucher ex Benth.) and *Salvia multicaulis* (Vahl). In: *Food Chem.*, 2004, vol. 84, p. 519-525.
247. Theerakulpisut P., Kanawapee N., Maensiri D. Development of species-specific SCAR markers for identification of three medicinal species of *Phyllanthus*. In: *J. of Systematics and Evolution*, 2008, vol. 46, nr. 4, p. 614-621.
248. Tomek J., Pechova D.A. Note on the Thin-Layer Chromatography of Media in Paintings. In: *Studies in Conservation*, 1992, vol. 37, p. 39-41.
249. Tongnuanchan P., Benjakul S. Essential oils: extraction, bioactivities and their uses for food preservation. In: *J. of Food Science*, 2014, vol. 79, nr. 7, p. 1231-1249.
250. 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.
251. Tripathi N., Saini N., Tiwari S. Assessment of genetic diversity among *Aloe vera* accessions using amplified fragment length polymorphism. In: *Int J Med Arom Plants*. 2011, vol. 1, p. 115-121.
252. Ulubelen A. Cardioactive and antibacterial terpenoids from some *Salvia* species. In: *Phytochem*, 2003, vol. 64, p. 395-399.
253. Um J.Y., Chung H.S., Kim M.S., et al. Molecular authentication of *Panax ginseng* species by RAPD analysis and PCR-RFLP. In: *Biol Pharm Bull*, 2001, vol. 24, nr. 8, p. 872-875.
254. Verma R.S. Chemical investigation of decanted and hydrophilic fractions of *Salvia sclarea* essential oil. In: *Asian J. of Traditional Medicines*, 2010, vol. 5, nr. 3, p. 1-7.
255. Verma R.S., Chauhan A., Laiq ur Rahman et al. Aroma profile of clary sage (*Salvia sclarea* L.): influence of harvesting stage and post-harvest storage in Uttarakhand Hills. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology*, 2011, vol. 5, nr. 2, p. 139-142.
256. Verpoorte R., Choi Y.H., Choi H.K., Botanicals and NMR-based Metabolomics: A Perfect Holistic Match. In: *Planta Med*, 2009, vol. 75, p. 401.

257. Vladimir-Knežević S., Blažeković B., et al. Antioxidant activities and polyphenolic contents of three selected *Micromeria* species from Croatia. In: *Molecules*, 2011, vol. 16, p. 1454-1470.
258. Vos P., Hogers R., Bleeker M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. In: *Nucleic Acids Res.*, 1995, vol. 23, nr. 21, p. 4407-4414.
259. Walencka E., Rozalska S., Wysokinska H. et al. Salvipisone and aethiopinone from *Salvia sclarea* hairy roots modulate staphylococcal antibiotic resistance and express anti-biofilm activity. In: *Planta Med.*, 2007, vol. 73, nr. 6, p. 545-551.
260. Walker J.B., Sytsma K.J., Treutlein J., et al. *Salvia* (Lamiaceae) is not monophyletic: implications for the systematics, radiation, and ecological specializations of *salvia* and tribe *Mentheae*. In: *American J. of Botany*, 2004, vol. 91, nr. 7, p. 1115-1125.
261. Wang M., Li J., Zhang L. et al. Genetic diversity among *Salvia miltiorrhiza* Bunge and related species using morphological traits and RAPD markers. In: *J. Med. Plants Res.*, 2011, vol. 5, nr. 13, p. 2687-2694.
262. Wang X., Yang R., Feng S. Genetic variation in *Rheum palmatum* and *Rheum tanguticum* (Polygonaceae), two medicinally and endemic species in China using ISSR Markers. In: *PLOS ONE*, 2012, vol. 7, nr. 12, p. 1-10.
263. Wang Y., Hill K., Sing S., et al. The spectrum of genomic signatures: from dinucleotides to chaos game representation. In: *Gene* 2005, vol. 346, nr. 173-185.
264. West, S.C. Enzymes and molecular mechanisms of genetic recombination. In: *Annu. Rev. Biochem.*, 1992, vol. 61, p. 603-640.
265. Wheeler T.J., Kececioglu J.D. Multiple alignment by aligning alignments. In: *Bioinformatics*, 2007, vol. 23, nr. 13, p. 559-568
266. Wiemer A.J., Wiemer D.F. Hohl R.J. Geranylgeranyl diphosphate synthase: an emerging therapeutic target. In: *Clinical pharmacology and therapeutics*, 2011, vol. 90, nr. 6, p. 804-812.
267. Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. In: *Nucl. Acids Res*, 1990, vol. 18, nr. 22. p. 6531-6535.
268. Wollenweber B., Porter J.R., Lübberstedt T. Need for multidisciplinary research towards a second green revolution. In: *Curr Opin Plant Biol*, 2005, vol. 8, nr. 3, p. 337-341.
269. Xiao J., Li J., Yuan L., et al. Genetic diversity and its relationship to hybrid performance and heterosis in rice as revealed by PCR-based markers. In: *Theor Appl Genet*, 1996, vol. 92, nr. 6, p. 37-43.
270. Xiao Y., Zhang L., Gao S. et al. 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.
271. Yadav A., Ahmad J., Chaudhary A.A. Development of sequence characterized amplified region (SCAR) marker for the authentication of *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. In: *European J. of Medicinal Plants*, 2012, vol. 2, nr. 3, p. 186-198.
272. Yalcin H., Ozturk I., Tulukcu E., et al. Effect of γ -irradiation on bioactivity, fatty acid compositions and volatile compounds of clary sage seed (*Salvia sclarea* L.). In: *J Food Sci.*, 2011, vol. 76, nr. 7, p. 1056-1061.
273. Yang H.J., Kim K.Y., Kang P. Effects of *Salvia sclarea* on chronic immobilization stress induced endothelial dysfunction in rats. In: *BMC Complement Altern Med.*, 2014, vol. 14, nr. 396, p. 1-5.
274. Ye H., Ye L., Kang H., et al. HIT: linking herbal active ingredients to targets. In: *Nucleic Acids Res* 2011, vol. 39, p. 1055-1059.

275. 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.
276. Yin X.L., Fang K.T., Liang Y.Z. et al. Assessing phylogenetic relationships of *Lycium samples* using RAPD and entropy theory. In: Acta Pharmacol Sin., 2005, vol. 26, nr. 10, p. 1217-1224.
277. Yousefiazarkhanian M., Asghari A., Ahmadi J. et al. Genetic diversity assessment of some *Salvia* sp. ecotypes based on issr markers. In: Biological Forum - An International J., 2015, vol. 7, nr. 1, p. 286-288.
278. Yu F., Takahashi T., Moriya J., et al. Traditional Chinese medicine and kampo: a review from the distant past for the future. In: J Int Med Res. 2006, vol. 34, p. 231-239.
279. Zerega N.J.C., Mori S., Lindqvist C. et al. Using Amplified Fragment Length Polymorphisms (AFLP) to Identify Black Cohosh (*Actaea racemosa*). In: Economic Botany, 2002, vol. 56, nr. 2, p. 154-164.
280. 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.
281. Zheng W., Wang S.Y. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. In: J. Agric. Food Chem., 2001, vol. 49, p. 5165-5170.
282. Zobenko L.A., Vlasova V.S., Ignatov V.S. Annual variety-line hybrid of *Salvia sclarea* and methods used in breeding it. Trudy Vsesoyuznyi Nauch. Issl. Inst. Effir. Kultur., 1989, vol. nr. 20, p. 44-46.
283. Zobenko L.P., Arinshtein A.I. Results and problems of breeding essential oil crops. Trudy Vsesoyuznyi Nauch. Issl. Inst. Effir. Kultur., 1989, vol. 20, p. 10-12.
284. Zutic I., Nitzan N., Chaimovitsh D. et al. Geographical location is a key component to effective breeding of clary sage (*Salvia sclarea*) for essential oil composition. Israel Journal of Plant Sciences, 2016, vol. 63, nr. 2, p. 134-141.
285. <http://bioinfo.ut.ee/primer3/>
286. <http://discoverlife.org/mp/20m?kind=Salvia+sclarea> [*Salvia sclarea* L.]
287. <http://genomes.urv.cat/UPGMA/>
288. http://maia.gov.md/public/files/catalogul%20soiurilor%20de%20plante/Catalog_2015_Text_Tipar.pdf [Catalogul soiurilor de plante pentru anul 2015, 127 p.].
289. http://www.gov.md/sites/default/files/document/attachments/intr02_21.pdf
[Strategia privind diversitatea biologică a Republicii Moldova pentru anii 2015-2020]
290. <http://www.rain-tree.com/plants>
291. <https://imagej.nih.gov/ij/>
292. udacot.unasm.asm.md
293. www.herbalgardenindia.org
294. www.plante.asm.md
295. www.salvaeco.org/plme

DECLARAȚIA PRIVIND ASUMAREA RĂSPUNDERII

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

MARTEA Rodica

07 noiembrie 2016



CURRICULUM VITAE

Rodica MARTEA

Date de contact:

str. Calea Ieșilor 5/2, ap. 32A,
MD-2069 - Chișinău, Republica Moldova,

Tel. (+373) 79 74 33 79

E-mail - rodica.martea@gmail.com

Data și locul nașterii: 30.07.1987, Chișinău, Republica Moldova.

Cetățenia: MD.

Studii superioare:

- 2005-2009 - **studii de licență**, Universitatea de Stat din Moldova, Facultatea Biologie și Pedologie, specialitatea Biologie Moleculară. Diploma seria ALII nr. 000026153.
- 2009-2011 - **studii de masterat**, Universitatea Academiei de Științe a Moldovei, specialitatea Biologie. Diploma seria AMC nr. 000002225.
- 2011-2015 - **studii de doctorat**, IGFPP, specialitatea-03.00.15 Genetică/162.01-Genetică vegetală.

Domeniile de interes științific: Biologie și genetică moleculară, bioinformatică, biologia sistemică, etc.

Stagii:

- Septembrie 2011 - Mai 2012 - *Specializarea profesională în Nano-Bioinginerie* UTM, Centrul de Formare Continuă, FP7 proiect MOLD-ERA, Chișinău, Moldova.
- 3-7 iulie 2011 - Școala de vară *Nano-Bioinginerie-2011*, FP7 proiect MOLD-ERA, UTM, Chișinău, Moldova.
- 1-5 august 2011 - Training anual pentru perfecționarea tinerilor cercetători *Statistics and Econometrics in R* - dr. Tomas Zelinsky, Universitatea Tehnică din Košice, Slovacia), IEEFS al AȘM, Chișinău, Moldova.
- 14 septembrie 2011 - Workshop în Bioinformatică din cadrul conferinței internaționale tinerilor cercetători *Molecular Biology: Advances and Perspectives*, IMBG, Kiev, Ucraina.
- 15 septembrie 2011 - Workshop *Improving Diagnoses of Mental Retardation in Children in Central Eastern Europe and Central Asia through Genetic Characterisation and Bioinformatics/Statistics (CHERISH)* conferința internațională a tinerilor cercetători *Molecular Biology: Advances and Perspectives*, Kiev, Ucraina.
- 15-22 iulie 2013 - Școala de vară *Genetică Moleculară*, Karolinska Institutet, Suedia, Chișinău, Moldova.
- 25-30 septembrie 2013 - Training *Tehnici de Analiză Moleculară*, Laboratorul Genomică, Centrul universitar de Biologie Moleculară, UnAȘM, Chișinău, Moldova.
- 07-14 septembrie 2014 - Stagiul realizat în cadrul Centrului de Cercetări Biologice "Stejarul", Institutului Național de Cercetare - Dezvoltare pentru Științe Biologice, Piatra-Neamț, România.
- 24 noiembrie - 3 decembrie 2014 - Stagiul realizat în cadrul Centrului de Cercetări Biologice "Stejarul", Institutului Național de Cercetare-Dezvoltare pentru Științe Biologice, Piatra-Neamț, România.
- 12-14 octombrie 2015 - Stagiul realizat în *Departamentul de Bioinformatică* din cadrul Institutului Național de Cercetare - Dezvoltare pentru Științe Biologice, București, România.

- 26-29 octombrie 2015 - Stagiul realizat la Centrul *Life Science* din cadrul Universității din Hohenheim, Stuttgart, Germania.
- 14-21 iunie 2016 - Stagiul realizat în cadrul Centrului de Cercetări Biologice “Stejarul”, Institutului Național de Cercetare - Dezvoltare pentru Științe Biologice, Piatra-Neamț, România.
- 27-29 septembrie 2016 - Training *Advancements in Plant Breeding, Trial Design and Analysis Course*, organizat de Institute of Field and Vegetable Crops (IFVCNS) în cooperare cu UC Davis Plant Breeding Academy, Novi Sad, Serbia.

Activitatea profesională:

- **septembrie 2009 - mai 2011** - laborant-superior, Centrul universitar Biologie Moleculară, CBM (actualmente Centrul universitar Genetică Funcțională, CGF), UnAȘM;
- **mai 2011 - decembrie 2012** - cercetător științific stagiar, CBM (CGF), UnAȘM;
- **ianuarie 2013 - prezent** - cercetător științific, CBM (CGF), UnAȘM (*concurs 01.11.2015*);
- **septembrie 2014 - prezent** - lector universitar, Catedra Istorie, Filozofie și Metodologia cercetării, Facultatea Științe Socioumanistice, UnAȘM;
- **septembrie 2016 - prezent** - lector universitar, Catedra Biologie, Facultatea Științe ale Naturii, UnAȘM;
- **ianuarie 2016 - prezent** - șef Secția Relații Internaționale și Informatizare, UnAȘM;

Participări ca executor în proiecte științifice naționale și internaționale.

Proiecte instituționale:

- **09.817.04.001A** Activitatea funcțională a genomului la plante, 2009-2010.
- **11.817.04.19F** Aspecte funcționale și genetico-moleculare ale genomului la floarea-soarelui (*Helianthus annuus* L.), 2011-2014.
- **15.817.05.03F** Rezistența florii-soarelui (*Helianthus annuus* L.) la lupoaie (*Orobanche Cumana* Wallr.): mecanisme genetico-moleculare și fiziologice, 2015-2018.

Proiecte pentru tineri cercetători:

- **11.819.09.15A** UDaCoT - instrument de colectare a datelor biologice elaborat în cadrul UnAȘM, 2011-2012.
- **13.819.14.12A** Expresia genelor implicate în răspunsul defensiv al florii-soarelui la mana (*Plasmopara halstedii* F. Berl et de Toni), 2014.

Proiecte Bilateral moldo-român:

- 13.820.18.06/RoA GECOMAP - Analiza polimorfismului genetic intraspecific pentru elaborarea markerilor moleculari a unor chemotipuri de plante medicinale și aromate, 2013-2014.

Proiecte Bilateral moldo-belarus:

- 15.820.18.04.10/B - Screening-ul proteinelor alergene, prin metode proteomice și genomice, în soiurile de mere create în Belarus și Republica Moldova, 2015.

Lucrări științifice și științifico-metodice publicate: 1 capitol în culegere științifică, 14 articole, 25 comunicări la manifestări științifice în țară și peste hotare.

Participări la foruri științifice în străinătate:

- 21-24 iulie 2011, International Moscow Conference on Computational Molecular Biology. Moscow, Russia. **Articol.**
- 14-17 septembrie 2011, The 4th International Conference for young scientists „Molecular biology: Advances and Perspectives”, Kiev, Ukraine. **Poster, teză.**
- 5-9 noiembrie 2012, III International Vavilov Conference “N.I. Vavilov’s Ideas in the Modern World” Sankt-Petersburg, Russia. **Raport, teză.**
- 21-23 iunie 2013, The Vth Symposium of Ethnopharmacology, Ethnopharmacology, in support of the human health and the environment, Brașov - Șirnea, România. **Raport, teză.**

- 17-18 octombrie 2013, Regional Conference "Young Scientists and Science in the Region", Podgorica, Muntenegro. **Raport, teză.**
- 10-14 noiembrie, 2013, International Plant Breeding Congress, Antalya, Turkey. **2 Postere 2 teze.**
- 26-30 aprilie 2014, Congress of Phytochemicals in Medicine and Pharmacognosy, PSE, Piatra-Neamt, Romania. **2 Postere, 2 teze, premiu PSE.**
- 1-5 noiembrie 2015, II International Plant Breeding Congress & Eucarpia-Oil And Protein Crops Section Conference, Antalya, Turkey. **Poster, teză.**
- 6-8 noiembrie 2015, Conferința Internațională Molecular Biology - Current Aspects and Prospects, Cluj-Napoca, România, 2015. **Teză, poster, premiu cel mai bun poster.**

Participări la foruri științifice în țară:

- 11-12 noiembrie 2010, The IXth International Congress of Geneticist and Breeders, Chisinau, Republic of Moldova. **Teza.**
- 16 martie 2011, Cea de-a 64 Conferință Științifică a studenților și masteranzilor, Universitatea Agrară de Stat din Moldova, Chișinău, Republica Moldova. **Raport.**
- 19 aprilie 2011, Conferința științifică a studenților și masteranzilor "Viitorul începe acum" UnASM, Chișinău, Republica Moldova. **Raport, teză.**
- 21 iunie 2011, Conferința științifică "Genetica și fiziologia rezistenței plantelor" în memoria academicianului Anatolie Jacotă, IGFPP, Chișinău, Republica Moldova. **2 Teze.**
- 25-27 august 2011, International Symposium on Broomrape (*Orobanche* spp.) in Sunflower, UnASM, Chișinău, Republica Moldova. **Teză.**
- 11 noiembrie 2011. International Conference of Young Researchers, IX-th edition, ULIM, Chișinău, Republica Moldova. **Raport, teză.**
- 23 noiembrie 2012, International Conference of Young Researchers, X-th edition, ULIM, Chișinău, Republica Moldova. **Raport, teză.**
- 9-11 octombrie 2013, Simpozionului Științific Internațional „Agricultura Modernă - Realizări și Perspective”, Universitatea Agrară de Stat din Moldova, Chișinău, Republica Moldova. **Articol.**
- 24-25 octombrie 2013, al III-lea Simpozion Național “Biotehnologii avansate - realizări și perspective”. Chișinău, Republica Moldova. **Raport, 2 teze.**
- 20-22 decembrie 2013, Ediția a X a Conferinței Transfrontaliere a Tinerilor, Chișinău, Republica Moldova. **Raport, 2 teze.**
- 10 martie 2014, Conferința Științifică Internațională a doctoranzilor „Tendințe contemporane ale dezvoltării științei: viziuni ale tinerilor cercetători”, UnAȘM, Chișinău, Republica Moldova. **Raport, teză.**
- 22-24 mai 2014, International Scientific Symposium „Conservation of plant diversity”, 3rd edition, GB(I), Chișinău, Republica Moldova. **2 Postere, 2 teze, 2 articole.**
- 23-24 octombrie 2014, Conferința științifică internațională „Genetica, fiziologia și ameliorarea plantelor”, ediția a 5-a, IGFPP, Chișinău, Republica Moldova. **Articol.**
- 10 martie 2015, Conferința Științifică Internațională a doctoranzilor „Tendințe contemporane ale dezvoltării științei: viziuni ale tinerilor cercetători”, UnAȘM, Chișinău, Republica Moldova. **Raport, teză.**
- 28 iunie-1 iulie 2015, The Xth International Congress of Geneticist and Breeders, Chisinau, Republic of Moldova, 2015. **Articol, teza, raport.**

Cunoașterea limbilor: limba română - limba maternă, limba rusă - bine, limba engleză - mediu, franceza - mediu.

Cunoașterea calculatorului: Microsoft Office, InDesign, cunoștințe de începător în programare et