

**INSTITUTUL DE GENETICĂ, FIZIOLOGIE ȘI PROTECȚIE A
PLANTELOR**

Cu titlu de manuscris

C.Z.U: 633.88:[57.085.1/2:577.12:577.15:543.42:543:54](043.3)

CĂLUGĂRU-SPĂTARU TATIANA

**ACUMULAREA *IN VIVO* ȘI *IN VITRO* A METABOLIȚILOR
SECUNDARI LA SPECIA *Rhodiola rosea* L.
DIN POPULAȚIA CARPATINĂ**

163.02. Biochimie

Rezumatul tezei de doctor în științe biologice

CHIȘINĂU, 2019

Teza a fost elaborată în cadrul Laboratorului Biochimia Plantelor al Institutului de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor

Conducător științific:

DASCALIUC Alexandru, doctor habilitat în științe biologice, profesor universitar.

Referenți oficiali:

ROTARI Alexandru, doctor habilitat în științe biologice, conferențiar cercetător

ANDRONIC Larisa, doctor în științe biologice, conferențiar cercetător

Componența consiliului științific specializat:

BALAU Nicolae, doctor habilitat în științe biologice, profesor universitar, membru corespondent al AȘM, *Președinte*

CAUȘ Maria, doctor în științe biologice, conferențiar cercetător, *Secretar științific*

ȘIȘCANU Gheorghe, doctor habilitat în științe biologice, profesor universitar, academician

ȘTEFĂRȚĂ Anastasia, doctor habilitat în științe biologice, profesor cercetător

GLIJIN Aliona, doctor în științe biologice, conferențiar universitar

Susținerea va avea loc la **10 decembrie 2019, ora 14⁰⁰**, în ședința Consiliului științific specializat **D 163.02-112** din cadrul Institutului de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor, str. Pădurii, 20, MD 2002, Chișinău, Republica Moldova, tel.: (+37322) 77 04 47, fax: (+37322) 55 61 80, e-mail: institut.gfpp@gmail.com

Teza de doctor și rezumatul pot fi consultate la biblioteca Institutului de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor și pe pagina web a ANACEC (<http://www.cnaa.md/>).

Rezumatul a fost expediat la 8 noiembrie 2019

Secretarul științific al Consiliului științific specializat,

CAUȘ Maria, doctor în științe biologice, conferențiar cercetător

Conducător științific,

DASCALIUC Alexandru, doctor habilitat în științe biologice, profesor universitar

Autor,

CĂLUGĂRU-SPĂTARU Tatiana



©Călugăru-Spătaru Tatiana, 2019

CUPRINS.....	3
REPERELE CONCEPTUALE ALE TEZEI.....	4
CONȚINUTUL TEZEI.....	7
1. METABOLISMUL SECUNDAR LA PLANTE.....	7
2. MATERIALE ȘI METODE DE CERCETARE.....	7
2.1. Obiectele de studiu.....	7
2.2. Metodele și procedeele de cercetare.....	8
3. Analiza compoziției <i>metaboliților secundari</i> în extractele din rizomii plantelor de <i>R. rosea</i> colectate în munții Carpați, România, și celor cultivate în condițiile Republicii Moldova.....	8
3.1. Analiza HPLC a componentilor <i>metaboliților secundari</i> în extractele din rizomi de <i>R. rosea</i>	8
3.2. Analiza RMN a p-tirosolului și diacetatului de p-tirosol.....	11
3.3. Analiza HPLC a uleiului volatil din rizomii de <i>R. rosea</i>	12
3.3.1. <i>Caracteristica fizico-chimică a uleiului volatil din rizomi de R. rosea</i>	13
3.4. Analiza compoziției <i>metaboliților secundari</i> în extractele din rizomii plantelor de <i>R. rosea</i> cultivate în condițiile Republicii Moldova.....	14
4. Influența factorilor chimici și fizici asupra creșterii biomasei și acumulării <i>metaboliților secundari</i> în cultura celulară de <i>R. rosea</i>.....	16
4.1. Influența conținutului fitohormonilor în mediul de cultivare asupra acumulării biomasei calusului și agregatelor celulare de <i>R. rosea</i>	16
4.2. Influența radiației ultraviolete asupra acumulării biomasei, conținutului compușilor fenolici și activității antioxidante totale a extractelor din calusul de <i>R. rosea</i>	17
4.3. Influența <i>temperaturilor joase pozitive</i> asupra creșterii biomasei calusului de <i>R. rosea</i> , precum și a conținutului de H ₂ O ₂ , activității CAT și PO în extractele din celulele acestuia.....	18
4.4. Influența reglatorului natural de creștere <i>RegIalg</i> asupra parametrilor fiziologici și biochimici a calusului și agregatelor celulare de <i>R. rosea</i>	20
4.5. Testarea influenței combinate a factorilor fizici și chimici asupra acumulării <i>metaboliților secundari</i> în agregatele celulare de <i>R. rosea</i>	24
CONCLUZII ȘI RECOMANDĂRI.....	26
BIBLIOGRAFIE.....	27
LISTA LUCRĂRILOR ȘTIINȚIFICE PUBLICATE LA TEMA TEZEI.....	29
ADNOTĂRI (română, engleză, rusă).....	32

REPERELE CONCEPTUALE ALE TEZEI

Actualitatea și importanța temei abordate. Plantele reprezintă o sursă prețioasă de *metaboliți secundari (MS)*, care datorită activității lor biologice se utilizează pe larg în industria alimentară, farmaceutică și cosmetologie. Acumularea *MS* în plante este determinată de specia plantei, țesut, organ sau chiar celulă și reprezintă o expresie a individualității speciei respective. Printre plantele medicinale utilizate în medicină poate fi menționată și *Rhodiola rosea*, care se întâlnește în flora spontană din regiunile muntoase ale diferitor continente, inclusiv în munții Carpați din România și Ucraina. În literatura de specialitate, informațiile privind compoziția chimică a rizomilor de *R. rosea* din populațiile carpatine, mai cu seamă a celor din România, sunt foarte limitate și incomplete.

Habitatele naturale de creștere a speciei se caracterizează prin condiții climaterice dure și accidentale, plantele fiind expuse diferitor condiții de stres, inclusiv a celor caracteristice pentru altitudini înalte (între 1000 și 5000 m, radiații ultraviolete intense, temperaturi extreme și variabile). Componentii activi, caracteristici speciei *R. rosea*, se acumulează preponderent în rizomi.

Deși *R. rosea* se cultiva în mai multe zone ale fostei Uniuni Sovietice, precum și în Suedia, Polonia și Germania, în prezent plantații industriale de *R. rosea* practic lipsesc. Această situație este cauzată de cheltuielile ridicate de cultivare, care includ stabilirea câmpurilor pentru transplantul de material săditor, recoltarea și post-recoltarea producției de rădăcini, ce reprezintă un proces destul de dificil. De asemenea, luând în calcul și faptul că rizomii de *R. rosea* acumulează cantitatea maximă de *MS* abia în al 4-5-lea an de cultivare, recolta de rizomi poate fi compromisă de unii factori (lipsa regimurilor agrotehnice bine elaborate, controlului buruienilor, fertilizării etc.). Conținutul principiilor active în rizomii plantelor cultivate în condiții *in vivo*, de obicei este mult mai scăzut în comparație cu cel caracteristic pentru plantele colectate din flora spontană.

Obținerea tot mai dificilă a compușilor derivați din plante a determinat industria și oamenii de știință de a lua în considerare posibilitatea utilizării culturii *in vitro*, ca metodă alternativă și durabilă de obținere a produselor farmaceutice naturale valoroase. Această metodă face posibilă stabilirea și monitorizarea factorilor de mediu favorabili pentru multiplicarea culturilor celulare și acumularea *MS*. Sporirea acumulării *MS* esențiali în culturile de celule și țesuturi este posibilă prin creșterea cantitativă a biomasei sau prin ameliorarea biosintezei metabolitului dorit. În așa fel, sporirea randamentului în cultura *in vitro* este dependentă în primul rând de optimizarea mediului și condițiilor de cultivare, factori care asigură acumularea în celulele cultivate a unor cantități semnificative de *MS*.

În ultimele decenii au fost efectuate multiple cercetări, privind obținerea *MS* caracteristici rizomilor de *R. rosea* pe cale biotehnologică, utilizând cultura celulelor și țesuturilor. Actualmente există un număr limitat de rapoarte privind biosinteza *MS* în cultura de calus și agregate celulare de *R. rosea*, iar cercetările efectuate au demonstrat că adăugarea unor precursori ai *MS* duce la sporirea acumulării principiilor active în celulele cultivate *in vitro*. Din cele menționate mai sus, putem afirma că atât cultura plantelor de *R. rosea in vivo*, cât și cea *in vitro* rămâne o direcție actuală de cercetări fundamentale cu interes practic la nivel mondial.

Scopul lucrării: Evaluarea particularităților acumulării principiilor active în rizomii plantelor de *R. rosea* din populațiile carpatine (îndeosebi cele din România) și celor din zonele de cultivare *in vivo* privind fundamentarea științifică a interrelațiilor „*genotip-mediu-procese metabolice*” ca bază teoretică de elaborare a căilor și metodelor de optimizare a proceselor de acumulare a *metaboliților secundari* și obținerii lor pe cale biotehnologică.

Obiectivele cercetării au constat în:

- determinarea compoziției *metaboliților secundari* și a uleiului volatil din rizomii plantelor de *R. rosea* din populația carpatină, România, și plantelor cultivate în Rezervația Științifică „*Plaiul Fagului*”, Republica Moldova și Grădina Botanică a Universității Naționale din or. Cernăuți, Ucraina.
- introducerea în cultura *in vitro* a explanților din plante de *R. rosea* și determinarea compoziției chimice a *metaboliților secundari* în cultura calusului și agregatelor celulare de *R. rosea*;
- determinarea efectului aplicării separate și combinate a temperaturii joase, radiațiilor ultraviolete, unor precursori ai biosintezei principiilor active și a regulatorului natural de creștere *Reglg* asupra productivității biomasei și spectrului cantitativ și calitativ de *metaboliți secundari* în cultura calusului și agregatelor celulare de *R. rosea*;
- compararea compoziției *metaboliților secundari* ai rizomilor plantelor de *R. rosea* din populația carpatină, România, a celor obținuți prin cultivare în condițiile *in vivo*, precum și a biomasei celulare obținute *in vitro*, cu cea descrisă în literatura de specialitate privind compoziția chimică a rizomilor de *R. rosea* colectați în Munții Altai, care este considerată cea mai valoroasă și cea mai bine studiată populație de *R. rosea*, privind conținutul de *metaboliți secundari*.

Ipoteza de cercetare:

1. S-a presupus existența unor relații corelative dintre condițiile mediului ambiant (temperatură, fotoperioadă, umiditatea aerului, radiația ultravioletă) și procesele de biosinteză, și acumulare a principiilor active în rizomii plantelor de *R. rosea*;

2. Conținutul de *metaboliți secundari* în celulele calusului și agregatelor celulare de *R. rosea* cultivate *in vitro* poate fi sporit prin introducerea în mediul de cultură a precursorilor acestora, reglatorilor naturali de creștere și prin manipularea intensității și frecvenței unor factori fizici, care influențează creșterea și metabolismul plantelor ce cresc în condiții naturale.

Sinteza metodologiei de cercetare și justificarea metodelor de cercetare alese. Pentru realizarea scopului și obiectivelor stabilite a fost utilizată metodologia aproximației sistemice care presupunea analiza integrată a specificului acumulării *MS* în plantele speciei de *R. rosea* colectate din habitatele naturale și cultivate în condiții *in vivo*, precum și în celulele calusului și biomasei celulare cultivate în condițiile *in vitro*. Aceasta a dat posibilitate de a aprecia separat și în combinație influența condițiilor de creștere, mediului de cultivare, vârstei, nivelului de organizare (celular, organ, plantă integră) asupra viabilității și acumulării *MS* în celulele de *R. rosea*. Utilizând materialul biologic obținut din habitatele naturale, cultivat în condiții *in vivo* și pe cale biotehnologică au fost realizate cercetări biochimice utilizând diferite metode de extragere, purificare și separare a componentelor biochimice caracteristice pentru materialul biologic. Studiul influenței factorilor chimici și fizici asupra culturii *in vitro* de *R. rosea* a fost realizat prin determinarea viabilității celulelor, conținutului de pigmenți fotosintetici, determinarea activității enzimatică, conținutului compușilor fenolici, conținutului total de flavonoide și a activității antioxidante totale etc. utilizând metoda spectrofotometrică UV-VIS. Extragerea proteinelor solubile totale pentru analiza spectrului polipeptidelor a fost realizată prin SDS-electroforeza, iar a izoformelor peroxidazelor prin electroforeza în condiții native. Analiza *MS* din rizomi, calus și agregatele celulare de *R. rosea* a fost efectuată cu utilizarea cromatografiei în strat subțire (CSS), cromatografiei pe coloană (CC), spectrofotometriei UV-VIS, cromatografiei cu lichide de înaltă performanță (HPLC), rezonanței magnetice nucleare (RMN) etc. Utilizarea metodelor contemporane de analiză biochimică și de prelucrare statistică a datelor au asigurat obținerea unor rezultate valoroase din punct de vedere științific și practic.

Sumarul capitolelor tezei

Teza cuprinde: adnotare prezentată în limba română, engleză și rusă, lista tabelor, lista figurilor, lista abrevierilor, introducere, patru capitole, concluzii și recomandări, bibliografie, declarația privind asumarea răspunderii, șaisprezece anexe și CV-ul autorului.

În introducere se argumentează actualitatea și importanța temei abordate, sunt formulate scopul și obiectivele lucrării, se prezintă ipoteza de cercetare, sinteza metodologiei de cercetare și justificarea metodelor de cercetare alese, precum și sumarul capitolelor tezei.

CONȚINUTUL TEZEI

1. METABOLISMUL SECUNDAR LA PLANTE

Primul capitol al lucrării include analiza realizărilor științifice în domeniul studiului biosintezei *MS* în cultura *in vivo* și *in vitro*, mai cu seamă celor din rizomii plantelor de *R. rosea*. În prima parte a capitolului sunt reprezentate reacțiile biochimice implicate în procesele metabolice la plante, în special ciclurile de biosinteza a *MS* precum fenolii și fenilpropanoidele. În partea a doua a capitolului, o atenție deosebită este atrasă posibilității utilizării culturii *in vitro* drept metodă alternativă și durabilă de obținere a produselor farmaceutice naturale valoroase, prin creșterea cantitativă a biomasei sau prin ameliorarea biosintezei metabolitului dorit. Partea a treia a capitolului elucidează rolul *speciilor reactive de oxigen (SRO)* în biosinteza, degradarea și acumularea *MS* din plante. În ultima parte a acestui capitol, fiind și cea mai voluminoasă, este descrisă sursa de *MS* precum *R. rosea* L., care este o plantă medicinală foarte valoroasă. În literatura de specialitate, informație privind compoziția chimică a rizomilor de *R. rosea*, în deosebi cea din populația carpatină, este foarte limitată și incompletă. Cultura *in vitro* de *R. rosea* reprezintă o metodă eficientă de cercetare a influenței diferitor factori chimici și fizici asupra sporirii biomasei și acumulării principiilor active în celule. Numai cunoscând mecanismele de reglaj ale acestor procese devine posibilă elaborarea unor tehnologii avantajoase de obținere a *MS* caracteristici pentru *R. rosea* prin cultivarea în condițiile *in vivo* și *in vitro*, care ar putea asigura eliminarea pericolului dispariției speciei din cauza colectării intensive a plantelor ce cresc în condiții naturale. Acest deziderat a constituit scopul cercetărilor noastre.

2. MATERIALE ȘI METODE DE CERCETARE

2.1. Obiectele de studiu

În calitate de obiect de studiu *in vivo* au servit plantele speciei *R. rosea* L., colectate din populația munților Carpați, masivul Ineu, România, și din alte habitate ale Munților Carpați, precum Ucraina și Polonia. La fel au fost utilizate plante cultivate în condiții *in vivo*, Rezervația Științifică „*Plaiul Fagului*”, raionul Ungheni, Republica Moldova și Grădina Botanică din or. Cernăuți, Ucraina, cultura *in vitro* a calusului și agregatelor celulare de *R. rosea*. În cercetări au fost utilizate și plante de *R. rosea* obținute din semințe și cultivate în condiții de laborator. Rizomii plantelor de *R. rosea* au fost incluși pentru analiza biochimică a *MS* acumulați de plante în condiții naturale și cultivate *in vivo*, iar semințele au servit pentru inițierea culturii *in vitro* din genotipurile respective. Cercetările fiziologice și biochimice au fost realizate utilizând materialul biologic obținut în urma introducerii *in vitro* a speciei *R. rosea*: cultura calusului (1) și agregatele celulare (2) obținute din calus.

2.2. Metodele și procedeele de cercetare

Drept procedee de cercetare au servit metodele de multiplicare și cultivare a plantelor de *R. rosea* în condițiile *in vivo*, inducerea și menținerea culturii calusului și agregatelor celulare de *R. rosea in vitro*, pe mediul nutritiv Murashige-Skoog (MS) de bază [21].

Metodele de determinare a parametrilor fiziologici și biochimici caracteristici materialului vegetal de *R. rosea*, cât și studiul influenței factorilor fizici și chimici asupra dinamicii de creștere a culturii *in vitro* de *R. rosea* [15] și acumulării MS, au fost orientate spre obținerea unor date cantitative și calitative, privind specificul influenței acestor factori asupra parametrilor menționați [25, 26].

Utilizarea tehnicilor rapide precum analiza HPLC, spectrofotometrică, electroforeza în gel de PAAG în condiții native și în prezența SDS-lui, au permis identificarea calitativă și cantitativă a compoziției în extracte a MS, enzimelor implicate în degradarea SRO [3, 20] și a polipeptidelor caracteristice pentru diferite variante a materialului vegetal [18].

Pentru realizarea lucrării au fost utilizate metode de planificare a experimentelor și prelucrare statistică a datelor.

3. ANALIZA COMPOZIȚIEI METABOLIȚILOR SECUNDARI ÎN EXTRACTELE DIN RIZOMII PLANTELOR DE *R. rosea* COLECTATE ÎN MUNȚII CARPAȚI, ROMÂNIA, ȘI CELOR CULTIVATE ÎN CONDIȚIILE REPUBLICII MOLDOVA

3.1. Analiza HPLC a componentelor *metaboliților secundari* în extractele din rizomi de *R. rosea*

Componența MS în extractele de *R. rosea* a fost analizată pe o coloană cu fază inversă, utilizând metoda HPLC. Monitoring-ul conținutului de MS din probele analizate a fost efectuat la lungimile de undă: 222 nm (maximele de absorbție a *p*-tirosolei, salidrozidului și acidului galic) [19, 28] și la 254 nm (absorbția specifică a fenilpropanoidelor: rosavinului, rosinului și rosarinului [13, 19, 28, 33]).

Rezultatele analizei HPLC a extractelor de *R. rosea* sunt prezentate în Figura 3.1, care include cromatogramele extractelor, înregistrate la lungimile de undă menționate. Din figură se observă că componentii (5) și (7) se detectă la cele două lungimi de undă utilizate: 222 nm (Figura 3.1A) și, respectiv, 254 nm (Figura 3.1B). Profilul cromatografic și timpul de retenție a componentelor coincid cu cei ai compușilor de referință și cu valorile indicate în literatura de

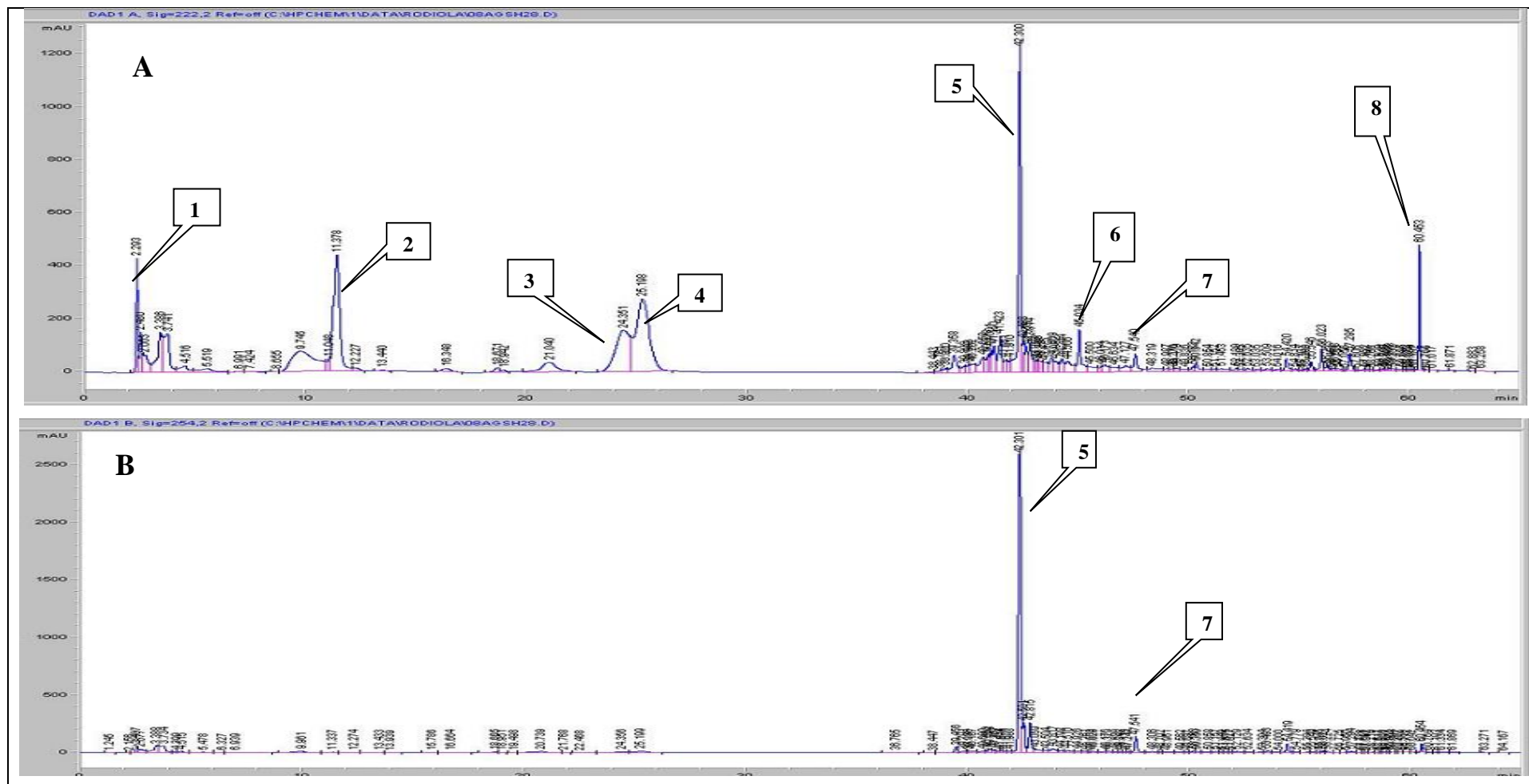


Fig. 3.1. Analiza HPLC a metabolizilor secundari extrași din rizomii de *R. rosea* și detectați la lungimile de undă: A – 222 nm; B – 254 nm. Separarea a fost efectuată pe coloana zorbax XDB C-18 combinată cu coloana de protecție Extend C-18. 1 - metilgalat; 2 – *p*-tirosol; 3 – acid galic; 4 – salidosid; 5 – rosavin; 6 – rosin; 7 – rosarin; 8 – acid cinamic.

specialitate [13, 19, 23, 28]. Valorile relative ale maximelor de adsorbție și cele ale ariei picurilor la lungimea de undă de 222 și 254 nm, precum și ale timpului de retenție sugerează că componenții (5) și (7) reprezintă fenilpropanoide, și anume rosavinul și rosinul. Menționăm că în Figura 3.1 au fost numerotate picurile componenților, care au fost identificate prin comparație cu markerii autentici și elucidate datorită comparației cu cromatogramele prezentate în literatura de specialitate [13, 23, 28]. În baza acestor analize s-a stabilit că componenții 1-8 din Figura 3.1 reprezintă metilgalatul, *p*-tirosolele, acidul galic, salidrozidul, rosavinul, rosinul, rosinul și, respectiv, acidul cinamic.

Analiza cromatogramei prezentate în Figura 3.1 demonstrează că, din punct de vedere cantitativ, componenții de bază extrași din rizomi de *R. rosea* sunt salidrozidul, *p*-tirosolele și rosavinul. Ariile picurilor și intensitatea semnalelor ce caracterizează adsorbția maximă a acestor compuși sunt cele mai pronunțate. Suma ariilor picurilor caracteristice pentru acidul galic (componentul, 3 în Figura 3.1A) și a produsului de transformare a acestuia, metilgalatul (componentul 1 în Figura 3.1A), depășește valoarea ariei picurilor pentru alte componente. Aria picului și intensitatea adsorbției rosinului (componentul 7 în Figura 3.1), unul dintre cei mai importanți compuși biologic activi caracteristici pentru *R. rosea*, sunt la un nivel relativ scăzut.

Rezultatele analizei componenților detectați pe cromatograma prezentată în Figura 3.1, identificați datorită utilizării salidrozidului, *p*-tirosolele și rosavinului, ca markeri, precum și analizei comparative a timpilor de retenție și a caracteristicilor de adsorbție ale componenților la diferite lungimi de undă expuse în literatura științifică [1, 28, 32], au oferit posibilitatea de a compara indicii calitativi ai diferitor componenți din rizomii de *R. rosea* din populația munților Carpați, România. Datele sunt prezentate în Tabelul 3.2.

Tabelul 3.2. Timpul de retenție, aria picului și intensitatea adsorbției metabolitelor secundari principali din rizomii de *R. rosea* identificați prin metoda HPLC la λ_{\max} 222 nm.

Compusul	Timpul de retenție, min	Aria picului, %	Intensitatea de adsorbție, mAU
Metilgalat	2,29	6,61	450
<i>p</i> -Tirozol	11,38	10,05	475
Acid galic	24,35	8,34	150
Salidrozid	25,20	13,45	200
Rosavin	42,30	11,01	2500
Rosin	45,03	0,90	250
Rosarin	47,54	1,40	100
Acid cinamic	60,45	2,40	600

Separarea MS din extractele de *R. rosea* prin metoda HPLC a fost o provocare din mai multe motive. Structura rosavinului (1) și rosinului (8) diferă numai prin fragmentele lor glicozidice: pentru rosavin sunt specifice resturi de glucoză și arabinoză, iar pentru rosin - numai

restul de glucoză. În plus, feniletanoloidele: *p*-tirosolul și glicozidul lui, salidrozidul, sunt mult mai polare decât fenilpropanoidele: rosavinul, rosinul și rosarinul.

Prin urmare, pentru obținerea unei separări acceptabile, a fost necesar de mărit în mod excesiv timpul total de separare. Timpul de retenție și aria relativă (aria picului este legată de zonele integrale ale tuturor ariilor) ale acestor compuși sunt prezentate în Tabelul 3.2.

În concluzie, separarea *MS* prin intermediul analizei HPLC a permis analiza corectă și fiabilă a extractelor de *R. rosea*. De asemenea, s-a dovedit că rizomii de *R. rosea* colectați din populația carpatină, masivul Ineu, România [5, 10], ca și cei din Rusia [31, 34] se caracterizează printr-un conținut bogat de principii active, precum *p*-tirosolul, salidrozidul, rosavinul, rosinul și rosarinul.

3.2. Analiza RMN a *p*-tirosolului și diacetatului de *p*-tirosol

Deși analiza componentei *MS* în extractele de *R. rosea* prin determinarea simultană a mai multor componente prin metoda HPLC este realizabilă, o altă metodă de determinare a componentelor, extrem de fezabilă, este spectrometria de rezonanță magnetică nucleară (RMN). Această metodă prezintă numeroase avantaje în cartografierea metaboliților vegetali. De asemenea, analiza RMN a fost selectată ca principala modalitate analitică privind elucidarea structurii compușilor izolați. Ea se bazează pe fenomenul care apare atunci când nucleele anumitor atomi sunt plasate într-un câmp magnetic static și expuse la o a doua oscilație, câmp magnetic. În prezentele cercetări, nucleele importante de oscilație în câmp magnetic au fost protonii ^1H și atomii de carbon ^{13}C , deoarece rezonanțele lor sunt cele mai însemnate pentru identificarea moleculelor naturale organice.

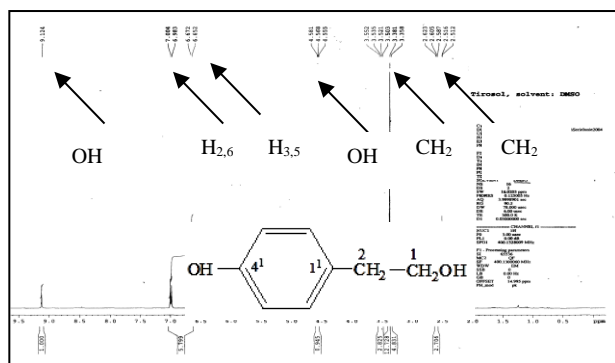


Fig. 3.2. Spectrul protonic al *p*-tirosolului.

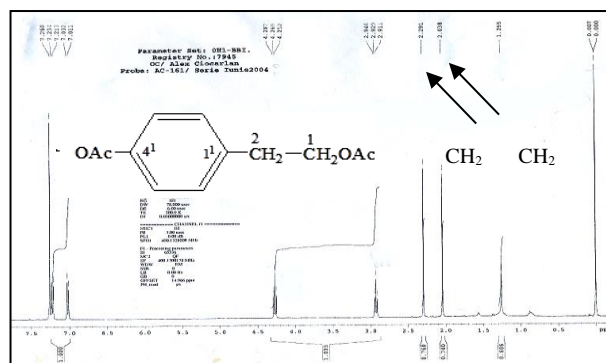


Fig. 3.3. Spectrul protonic al acetatului de *p*-tirosol.

În Fig. 3.2 este prezentat spectrul ^1H RMN al *p*-tirosolului ce conține două semnale ale grupelor metilenice (la 2,62 ppm și 3,54 ppm), semnalele dublet ale celor patru protoni din inelul benzenic (la 6,65 ppm și 6,98 ppm), precum și două semnale (la 4,57 ppm și 9,12 ppm), care indică

prezența a două grupe hidroxil, caracteristice pentru *p*-tirosol. Prin urmare, a fost validat *p*-tirosolul atât după spectrul protonic (Fig. 3.2), cât și după cel carbonic.

Ambele spectre au confirmat structura *p*-tirosolului în extractele de *R. rosea*. Profilul spectrului RMN al protonilor de ^1H și atomilor de carbon ^{13}C al *p*-tirosolului coincide cu cel a compusului de referință și cu valorile indicate în literatura de specialitate. Valorile maximelor de adsorbție sugerează că componentul (2) din Fig. 3.1 reprezintă *p*-tirosolul. Ulterior, datele spectrale a *p*-tirosolului au fost confirmate după acetilare și analiza RMN a formei acetilate, Fig. 3.3. În spectrul ^1H RMN ale diacetatului *p*-tirosolului (Fig. 3.3) sunt prezente două grupări metil la 2,04 ppm și 2,29 ppm, fapt ce confirmă că ambele grupări hidroxil în molecula *p*-tirosolului au fost acetilate. Deci, utilizând metoda RMN, a fost confirmat că componentul din Fig. 3.2 și 3.3 într-adevăr reprezintă *p*-tirosolul, iar caracteristicile de separare a *MS* prin metoda HPLC, efectuată de noi, corespund celor realizate de către alți autori [13, 23, 28].

3.3. Analiza HPLC a uleiului volatil din rizomii de *R. rosea*.

Uleiurile volatile reprezintă *MS*, care în mare măsură determină proprietățile aromate și gustative ale plantelor. Din literatura de specialitate se cunoaște că uleiul volatil din rizomi de *R. rosea* se caracterizează printr-un conținut complex și variat în funcție de sursa materialului vegetal, precum și de metoda de extracție [24].

În cercetările efectuate la hidrodistilarea rizomilor uscați de *R. rosea*, au fost obținute mostre ale uleiului volatil de culoare gălbuie. Ele au constituit circa 0,05% din masa rizomilor supuși extracției. Acest conținut este mai mare față de cel citat în rizomii plantelor din Nordul Finlandei, ce atinge valoarea de 0,027% și comparabil cu cel menționat din rizomii de origine norvegiană, în care conținutul uleiului volatil constituie 0,04%. Totodată, conținutul uleiului volatil în rizomii plantelor colectate în Carpați este mai mic decât cel raportat pentru rizomii din Altai [34], Bulgaria, China și India, care conțin 0,2%, 0,1% și, respectiv, 0,25% ulei volatil [12].

Cromatograma uleiului volatil din rizomi de *R. rosea*, obținută prin metoda HPLC, este prezentată în Figura 3.4. Printre compușii detectați în uleiul volatil din rizomii de *R. rosea* din populația carpatină pot fi menționați linaloolul, geraniolul, timolul, cariofilena, *p*-cimenul, limonenul, alcoolul feniletic, carvacrolul și carvona.

Analiza cromatogramei prezentate în Figura 3.4 demonstrează că, din punct de vedere calitativ, cei mai reprezentativi compuși extrași din rizomii de *R. rosea* de origine carpatină sunt *p*-cimenul, geraniolul și limonenul. Picurile și intensitatea semnalelor acestor compuși, conform analizei HPLC, au dominat în comparație cu cele ale altor componenți. În așa fel geraniolul, componentul responsabil pentru aroma caracteristică florilor de trandafir, a fost identificat ca

component caracteristic nu numai pentru rizomii de *R. rosea* de origine din Finlanda, Norvegia, China, Mongolia și India, ci și pentru cei colectați din populația carpatină, România.

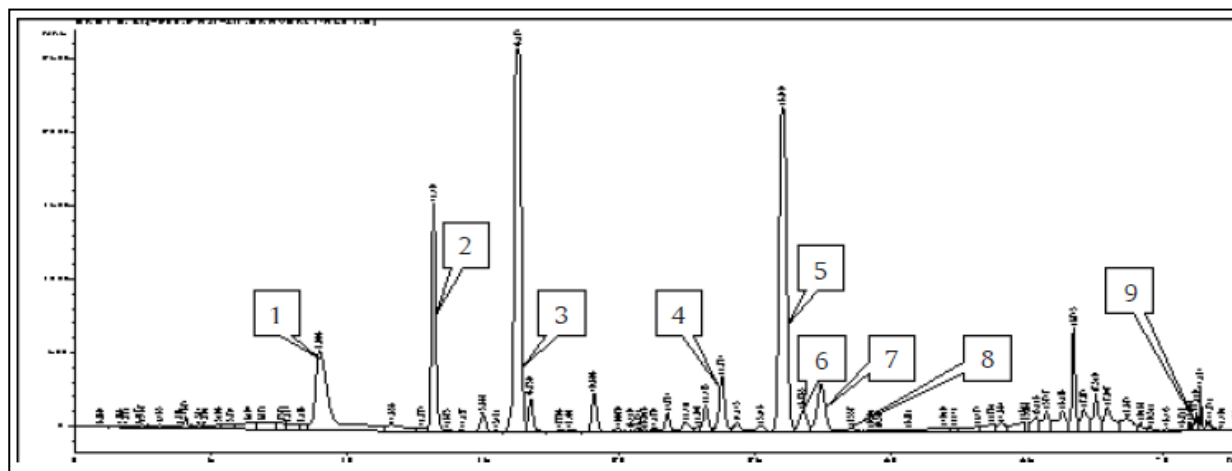


Fig. 3.4. Analiza HPLC a uleiului volatil din rizomii de *R. rosea* la λ_{\max} 195 nm. Separarea a fost efectuată pe zorbax XDB C-18 cu coloana de protecție Extend C-18. 1 – limonen, 2 - alcool feniletic, 3 - *p*-cimen, 4 – carvona, 5 – geraniol, 6 – linalool, 7 – carvacrol, 8 – timol, 9 – cariofilena. Sunt indicați doar componenții, care au fost identificați prin comparare cu markerii autentici.

Rezultatele obținute confirmă datele privind compoziția uleiului volatil din rizomi de *R. rosea*, publicate și de alți autori, ceea ce încă odată confirmă apartenența probelor colectate speciei *R. rosea*.

3.3.1. Caracteristica fizico-chimică a uleiului volatil din rizomi de *R. rosea*

Pentru a aprecia caracteristicile fizico-chimice ale uleiurilor volatile au fost determinate densitatea, indicele de refracție, activitatea optică și valoarea tehnologică a preparatului.

Densitatea relativă a uleiului volatil din rizomi de *R. rosea* a fost determinată prin metoda picnometrică la temperatura de 20°C. Ca rezultat al analizei a fost demonstrat că densitatea uleiului obținut, este $d^{20} = 0,8385 \text{ g/cm}^3$.

Indicele de refracție a uleiului volatil de *R. rosea* a fost determinat cu ajutorul refractometrului „*ИРФ – 22*” (URSS). Valoarea acestui parametru (n_d^{20}) fiind egală cu 1,512.

Activitatea optică $[\alpha]_D^{25}$ a fost determinată folosind polarimetrul circular „*CM-2*” (URSS), în soluție de cloroform, valoarea rotației specifice fiind egală cu +0,61°. De aici rezultă că uleiul volatil de *R. rosea* conține componenți optic activi.

De asemenea, a fost efectuată *testarea organoleptică* a uleiului volatil din rizomi de *R. rosea* de către Consiliul de degustare al S.A. „*Viorica-Cosmetic*”, care a apreciat Nota parfumerică cu 4,8 puncte din 5 posibile și a recomandat utilizarea acestuia în compoziția cremelor.

Datele obținute oferă posibilitatea de a menționa că cei mai importanți componenți a uleiului volatil extrași din rizomi de *R. rosea* colectați în Munții Carpați corespund celor caracteristici rizomilor plantelor colectate în alte regiuni geografice. Conținutul lor este redus, ceea ce este caracteristic speciei date (0,05% din masa uscată a rizomilor), dar care totuși este comparabil cu cel caracteristic rizomilor plantelor colectate în Munții Altai. Spectrul principiilor active și conținutul relativ al lor corespunde datelor din literatura de specialitate și este caracteristic pentru rizomii de *R. rosea*. Cu toate că Nota parfumerică a uleiului volatil din rizomi de *R. rosea* este foarte înaltă, conținutul redus al acestora, în comparație cu cel caracteristic pentru plantele aromatice, la care valoarea atinge 0,1 - 1%, sugerează că obținerea uleiurilor volatile din *R. rosea* în scopuri practice ar fi foarte costisitoare. Datele obținute demonstrează că compoziția și conținutul diferitor *MS* din rizomii de *R. rosea* din populația carpatină sunt comparabile cu parametrii caracteristici pentru rizomii plantelor colectate în Munții Altai. Ultimele se consideră ca plante-etalon după conținutul *MS*, de aceea putem concluda că plantele de *R. rosea* din Carpații României la fel reprezintă o sursă valoroasă de *MS*.

3.4. Analiza compoziției metaboliților secundari în extractele din rizomii plantelor de *R. rosea* cultivate în condițiile Republicii Moldova

Plantele de *R. rosea* cresc spontan în Carpații din România [14] și Ucraina, dar populațiile de acolo sunt relativ mici și în pericol de dispariție din cauza colectării excesive. Cultivarea plantelor de *R. rosea* în condițiile Republicii Moldova și Ucrainei a fost inițiată cu utilizarea rizomilor de *R. rosea* în vârstă de un an, colectați din Munții Carpați, România, și cultivați ulterior în Rezervația Științifică „Plaiul Fagului”, raionul Ungheni, Republica Moldova, și Grădina Botanică a Universității Naționale din or. Cernăuți, Ucraina. Este important de menționat că rizomii plantați au supraviețuit și au crescut intensiv în aceste condiții.

Analiza calitativă a componenților extrași din rizomii plantelor de *R. rosea* cultivate în condiții de câmp a confirmat prezența principiilor active specifice pentru această specie. Cu toate acestea, indicii calitativi și activitatea antioxidantă a extractelor din rizomii plantelor au fost semnificativ diferiți. Astfel, în extractele din plantele în vârstă de 6 ani, furnizate de către cercetătorii de la Grădina Botanică a Universității Naționale din or. Cernăuți, conținutul compușilor fenolici (CCF) a fost de 3,6 ori mai mic decât în cazul extractelor din rizomii plantelor din mediul natural de creștere. Capacitatea antioxidantă totală (Cat) a extractelor din aceste probe a fost mai mică și a constituit $415,50 \pm 48,74 \mu\text{M GAE/g}$ de reziduu uscat [17]. Extractele din rizomii plantelor de *R. rosea* colectate din Munții Carpați, România, au prezentat activitate antioxidantă egală cu $1312,84 \pm 285,04 \mu\text{M GAE/g}$ de reziduu uscat. Rizomii cultivați de noi

conțineau de 6,9 ori mai puține substanțe fenolice, iar extractele din ei au demonstrat activitate antioxidantă egală cu $238,24 \pm 22,04 \mu\text{M GAE/g}$ de reziduu uscat (Figura 3.5).

Modificări similare privind indicatorii cantitativi, și anume descreșterea conținutului de salidrozyd (de aproximativ de două ori comparativ cu condițiile naturale în cercetările efectuate de noi), au fost descrise și de alți cercetători din Rusia [2], Polonia, Bulgaria etc. Trebuie remarcat faptul că nu numai prezența salidrozydului determină activitatea antioxidantă a extractelor din rizomii plantelor de *R. rosea*, ci și alte substanțe fenolice similare quercetinului [12]. De asemenea, s-a constatat că, din punct de vedere al activității biologice, extractele din biomasa culturii celulare de *R. rosea* obținute prin metoda biotehnologică au fost inferioare extractelor din materia primă din habitatele naturale de aproximativ 2 ori [2].

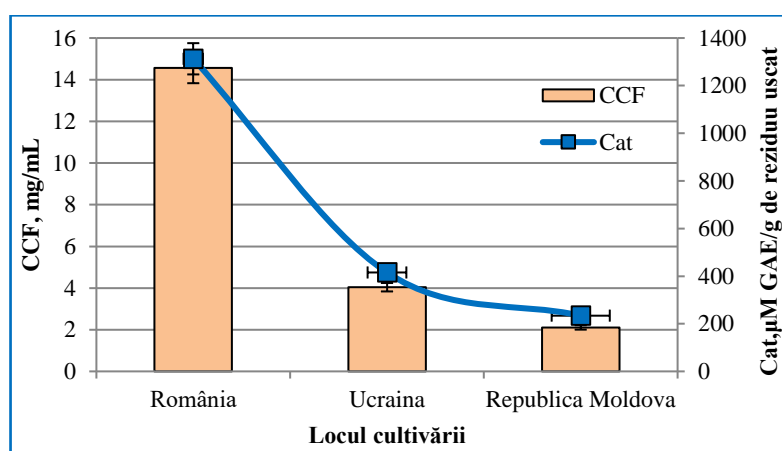


Fig. 3.5. Analiza compoziției metaboliților secundari ale extractelor din rizomii plantelor de *R. rosea* cultivate în condiții *in vivo*

Cercetările noastre au demonstrat că datorită specificului biologic al speciei, cultivarea în condiții de câmp a plantelor de *R. rosea* are perspective foarte reduse, iar crearea artificială a condițiilor comparabile cu cele din munți ar fi foarte costisitoare și fără avantaj economic. Aceste neajunsuri pot fi depășite prin posibilitatea investigării culturilor *in vitro*, fiind considerată o cale alternativă și durabilă de obținere a produselor farmaceutice naturale valoroase.

Deci, datele analizei HPLC a extractelor și a uleiului volatil din rizomii plantelor de *R. rosea* colectați în Munții Carpați, România, confirmă prezența *MS* și a unor compuși terpenici caracteristici pentru această specie, iar conținutul acestora este comparabil cu cel descris pentru plantele originare atât din munții Altai, cât și din alte regiuni geografice. Totodată, datele analizei HPLC a extractelor din rizomii de *R. rosea* colectați în Munții Carpați, România, și cultivați ulterior în Rezervația Științifică „*Plaiul Fagului*”, raionul Ungheni, Moldova, și Grădina Botanică a Universității Naționale din or. Cernăuți, Ucraina, confirmă prezența *MS* caracteristici pentru

această specie, iar conținutul acestora este redus în comparație cu cele colectate din habitatele naturale.

4. INFLUENȚA FACTORILOR CHIMICI ȘI FIZICI ASUPRA CREȘTERII BIOMASEI ȘI ACUMULĂRII *METABOLIȚILOR* *SECUNDARI* ÎN CULTURA CELULARĂ DE *R. rosea*

4.1. Influența conținutului fitohormonilor în mediul de cultivare asupra acumulării biomasei calusului și agregatelor celulare de *R. rosea*

Cea mai intensivă creștere a celulelor calusului de *R. rosea* s-a înregistrat pe mediul nutritiv ce conține fitohormonii BA (6-benzilaminopurina) și ANA (acid α -naftilacetic) în concentrație de 1,5 și 0,5 mg/L, în raport de 3:1. Intensitatea proliferării este mult mai joasă pe mediul nutritiv ce conține fitohormonii Kn (chinetină) și 2,4-D (acid 2,4-diclorfenoxiacetic) în concentrație de 0,5 mg/L și 1,0 mg/L, în raport de 1:2, sau pe mediul nutritiv ce conține ANA (în locul 2,4-D), raportul fiind de 1:2. O proliferare destul de scăzută se observă pe mediul nutritiv cu raportul fitohormonilor BA și AIB (acid indolil-3-butiric) egal cu 1:1. Prezintă interes faptul că suplimentarea mediului optimal de cultivare cu Kn în concentrația 0,5 mg/L nu a asigurat sporirea proliferării celulelor calusului [7]. Aceeași legitate s-a menținut și în cazul cultivării agregatelor celulare pe mediul nutritiv lichid (Tabelul 4.1).

Tabelul 4.1. Influența compoziției fitohormonilor introduși în mediul nutritiv Murashige-Skoog asupra acumulării biomasei în cultura calusului și agregatelor celulare de *R. rosea*

№ probei	Concentrația fitohormonilor, mg/L					Masa proaspătă, 6 săptămâni de cultivare, g	Creșterea masei calusului, g	Creșterea relativă
	BA	Kn	ANA	2,4-D	AIB			
Mediul nutritiv agarizat								
1	1,5	-	0,5	-	-	16,16±0,19	14,16±0,2	7,08
2	-	0,5	1,0	-	-	11,57±0,11	9,57±0,15	4,78
3	0,5	0,5	1,5	-	-	13,45±0,15	11,45±0,2	5,72
4	0,5	-	-	-	0,5	9,76±0,12	7,76±0,18	3,88
5	0,5	-	-	1,0	-	12,34±0,22	10,34±0,19	5,17
6	-	0,5	-	1,0	-	10,12±0,22	8,12±0,18	4,06
Mediul nutritiv lichid								
1	1	-	2	-	-	13,52±0,11	11,52±0,13	5,76
2	1	-	-	-	1	3,48±0,09	1,48±0,1	0,74

Pentru a determina perioada minimă necesară de cultivare a calusului și agregatelor celulare în vederea obținerii biomasei maxime, a fost determinată cinetica creșterii biomasei proaspete, Figura 4.1.

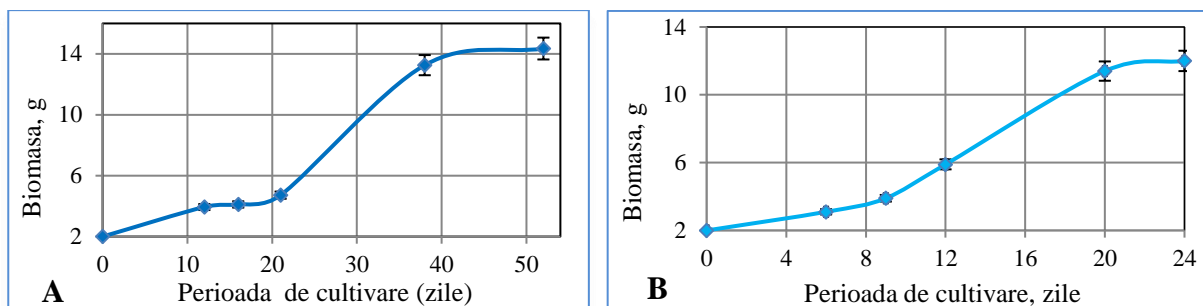


Fig. 4.1. Dinamica creșterii biomasei proaspate a calusului (A) și agregatelor celulare (B) de *R. rosea* în dependență de durata de cultivare.

În conformitate cu legitățile descrise pentru alte culturi, observăm că creșterea culturii calusului și agregatelor celulare sunt reprezentate de curbe sigmoide, cu trei faze distincte: *lag*, *exponențială* și *staționară*. Analizând curbele de creștere putem stabili timpul optim de replantare a calusului pe un mediu proaspăt și cel al perioadei de cultivare necesar pentru obținerea unui volum maxim de biomasă [7].

4.2. Influența radiației ultraviolete asupra acumulării biomasei, conținutului compușilor fenolici și activității antioxidante totale a extractelor din calusul de *R. rosea*

Culturile celulare *in vitro*, care sintetizează *MS* după expunerea la radiații *UV-B*, sunt slab studiate și oferă perspectivă de extindere a investigațiilor privind rolul razelor *UV-B* în acumularea *MS*. Ținând cont de aceasta, am atras o atenție deosebită cercetării influenței radiației *UV* asupra creșterii biomasei și acumulării *MS* în cultura *in vitro* de *R. rosea*.

Mărirea duratei zilnice de expoziție a calusului de *R. rosea* la radiațiile *UV-B* duce la diminuarea acumulării biomasei în timp, practic proporțional cu durata de expoziție (Figura 4.2). Din cultura de calus obținută la diferite perioade de expoziție la *UV-B* au fost extrași *MS* și supuși analizei activității antioxidante, concomitent apreciind conținutul compușilor fenolici și relațiile posibile dintre activitatea antioxidantă și acumularea relativă a biomasei (Figura 4.3 și 4.4). Analizând aceste date concluzionăm că creșterea duratei de expoziție cu raze *UV-B* ca regulă asigură atât sporirea activității antioxidante a extractelor, cât și a conținutului compușilor fenolici. Astfel, calusul tratat pe parcursul a 18 zile cu raze *UV-B* pentru o perioadă mai îndelungată de 30 min manifestă o activitate antioxidantă mai sporită. Paralel cu aceasta, în extractul din calus a fost determinată o concentrație mai înaltă de substanțe fenolice. Activitatea antioxidantă a extractelor din celulele calusului de *R. rosea* poate fi ridicată de 1,24-1,44 ori prin tratarea zilnică a lui cu raze *UV-B* timp de 30-180 min (Figura 4.3). Analizând datele prezentate în Figura 4.4 menționăm tendința evidentă de sporire a activității

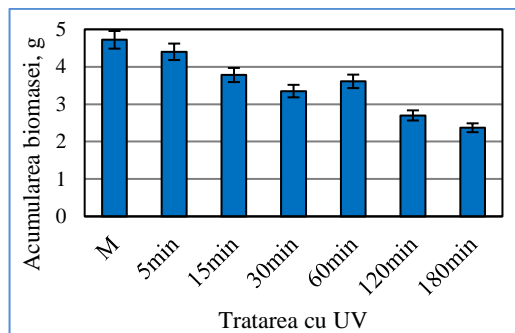


Fig. 4.2. Acumularea biomasei calusului de *R. rosea* tratat zilnic cu razele UV-B pe parcursul a 0 (martor-M), 5, 15, 30, 60, 120 și 180 min începând cu ziua a 12-a după inoculare și terminând cu ziua 30 de cultivare.

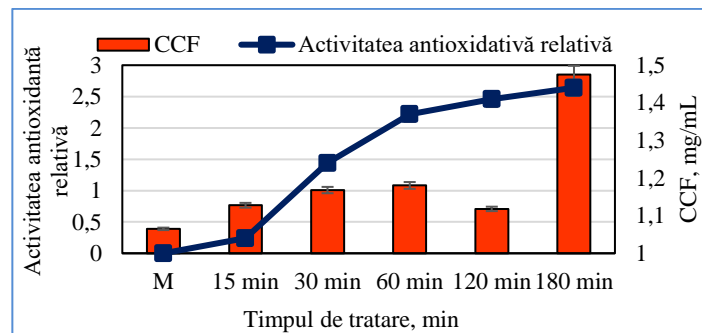


Fig. 4.3. Influența radiației UV-B pe parcursul a 0 (martor-M), 5, 15, 30, 60, 120 și 180 min, aplicate în ziua a 12-a de cultivare, asupra activității antioxidante relative și conținutul compușilor fenolici (CCF) în extractele din calusul de *R. rosea* la sfârșitul perioadei de cultivare (în ziua a 30-a).

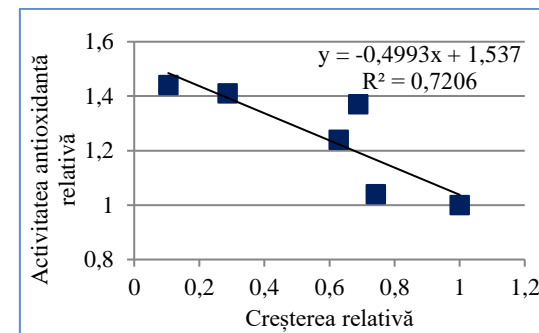


Fig. 4.4. Dependența dintre valorile activității antioxidante relative a extractelor și creșterea relativă a calusului de *R. rosea* tratat cu razele UV-B.

antioxidante a extractelor din probele de calus obținute în cazul sporirii duratei de expoziție la radiația UV, care concomitent diminuează dinamica de acumulare a biomasei [4].

4.3. Influența temperaturilor joase pozitive asupra creșterii biomasei calusului de *R. rosea*, precum și a conținutului de H₂O₂, activității CAT și PO în extractele din celulele acestuia

Multiple cercetări au fost efectuate privind efectul acțiunii temperaturilor joase asupra creșterii diferitor specii de plante atât în cultura *in vivo*, cât și în cultura *in vitro*. Totuși, cercetări în această direcție cu cultura de *R. rosea* nu au fost efectuate. Utilizând cultura *in vitro* de *R. rosea* a fost testată influența temperaturilor joase pozitive de +4°C, +8°C pe parcursul a 3 și 6 ore asupra acumulării biomasei și MS.

Din rezultatele obținute s-a observat că valoarea procentuală a indicelui de creștere al calusului de *R. rosea*, la a 40-a zi de la inoculare pe mediul MS solid, a înregistrat o majorare în toate variantele experimentale. De menționat și faptul, că sporirea duratei de expoziție de la 3 ore până la 6 ore a dus la diminuarea nivelului de majorare a valorii indicelui de creștere. De aici rezultă că stimularea creșterii calusului sub influența

expunerii la *temperaturi joase pozitive* depinde nu numai de temperatură, dar și de durata de expunere. Rezultatele aprecierii influenței temperaturii de +4°C pe parcursul a 3 și 6 ore, aplicată în ziua a 20-a de cultivare, asupra conținutului de H₂O₂ în calusul de *R. rosea* la sfârșitul perioadei de cultivare (în ziua a 40-a) (Figura 4.6) au relevat că conținutul minim al peroxidului de hidrogen a fost înregistrat în calusul cultivat în varianta martor (7,15 mM H₂O₂/g biomasă), care nu a fost tratat cu *temperaturi joase pozitive*, iar cea mai mare cantitate de H₂O₂ a fost determinată la varianta calusului tratat cu temperatura de +4°C pe parcursul a 3 ore (13,73 mM H₂O₂/g biomasă) și, respectiv, 6 ore (10,84 mM H₂O₂/g biomasă).

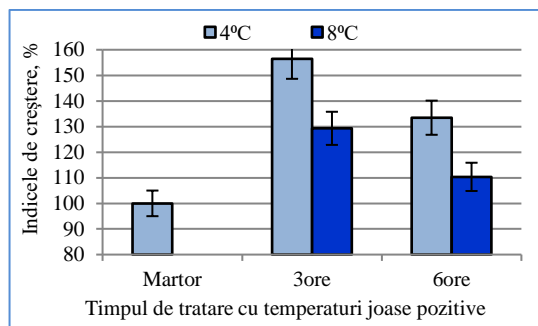


Fig.4.5. Influența temperaturilor de +4°C și +8°C pe parcursul a 3 și 6 ore, aplicate în ziua a 20-a de cultivare, asupra acumulării biomasei calusului de *R. rosea* determinate la sfârșitul perioadei de cultivare (în ziua a 40-a).

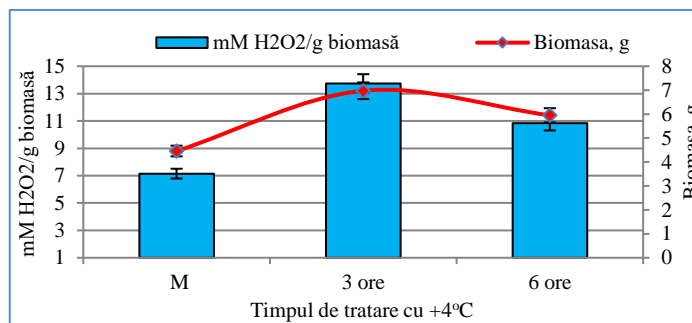


Fig.4.6. Influența temperaturii de +4°C pe parcursul a 3 și 6 ore, aplicată în ziua a 20-a de cultivare, asupra biomasei calusului și conținutului de H₂O₂ în extractele din celulele calusului de *R. rosea*, determinate la sfârșitul perioadei de cultivare (în ziua a 40-a).

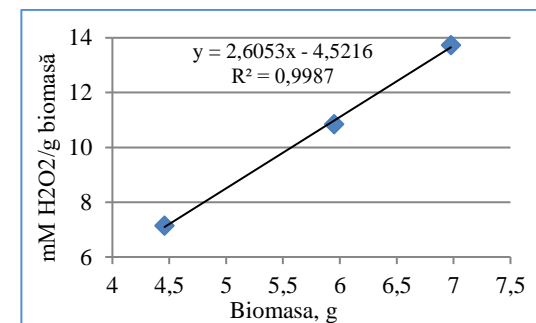


Fig.4.7. Dependența dintre valorile biomasei calusului și conținutului de H₂O₂ în extractele din celulele calusului de *R. rosea*, tratat cu temperaturii de +4°C pe parcursul a 3 și 6 ore în ziua a 20-a de cultivare, determinate la sfârșitul perioadei de cultivare.

Cantitatea înregistrată în aceste variante experimentale a crescut cu 92% și, respectiv, 52% față de varianta martor. În așa fel se observă că conținutul relativ al peroxidului de hidrogen în celulele calusului de *R. rosea* în general este mai înalt în variantele cu acumulare mai intensivă a biomasei calusului (Figura 4.6). Aceste date demonstrează existența corelației pozitive dintre conținutul peroxidului de hidrogen într-un gram de extract și biomasa calusului acumulată în ziua a 40-a de cultivare (Figura 4.7).

Analizând valorile activității catalazei (CAT) în extractele din calusul de *R. rosea* după 40 de zile de cultivare (Figura 4.8A) observăm că maximul de biosinteză a CAT a fost înregistrat la varianta calusului supus șocului cu temperatura de +4°C pe parcursul a 3 ore, valoarea

activității fiind egală cu 0,32 unități/mL față de 0,24 unități/mL la martor. În varianta calusului obținut în urma expunerii la șocul cu temperatura de +4°C pe parcursul a 6 ore activitatea CAT s-a diminuat până la 0,23 unități/mL.

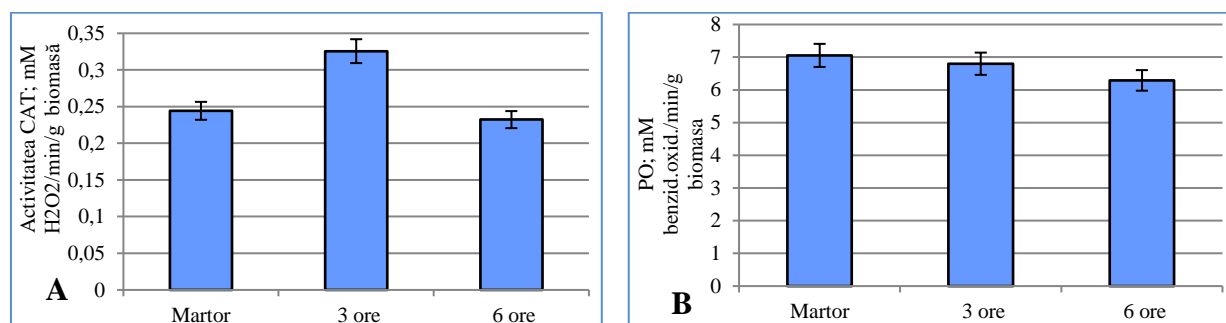


Fig.4.8. Influența temperaturii de +4°C pe parcursul a 3 și 6 ore, aplicate în ziua a 20-a de cultivare, asupra activității catalazei (CAT) (A) și peroxidazei (PO) (B) în extractele din calusul de *R. rosea* determinate la sfârșitul perioadei de cultivare (în ziua a 40-a).

Activitatea mai înaltă a CAT în varianta expusă *temperaturilor joase pozitive* pe parcursul a 3 ore demonstrează rolul principal al CAT în lichidarea H₂O₂ produs intens în cazul dat (Figura 4.8A) și este determinat atât de condițiile de temperatură, cât și de procesele intensive de formare și acumulare a biomasei. În acest context, putem remarca că activitatea enzimelor antioxidante se poate modifica diferit: în unele cazuri are loc creșterea activității enzimelor, iar în altele - diminuarea, ceea ce depinde de intensitatea și durata acțiunii factorului de stres.

Tendința de diminuare a activității peroxidazei (PO) (Figura 4.8B) a fost înregistrată în extractele din calusul de *R. rosea* după 40 de zile de cultivare, de la 7,05 unități benzid.oxid./min/g biomasă la martor la 6,80 și 6,29 unități benzid.oxid./min/g biomasă în varianta expusă șocului cu temperatura de +4°C pe parcursul a 3 ore și, respectiv, 6 ore. Analiza activității enzimatică a PO în extractele din calusul de *R. rosea* tratat cu +4°C pe parcursul a 3 și 6 ore demonstrează că PO, fiind enzimă multifuncțională [22], participă nu numai la detoxifierea H₂O₂, dar și în alte procese importante pentru dividerea și diferențierea celulelor [22].

4.4. Influența regulatorului natural de creștere *Reglalg* asupra parametrilor fiziologici și biochimici a calusului și agregatelor celulare de *R. rosea*

Spre deosebire de fitohormoni, regulatorii naturali de creștere (*RNC*) ca regulă sunt complecși și demonstrează activitate biologică în concentrații mai mari, influența biologică a lor fiind armonioasă, asigurând adaptarea și menținerea stării de homeostază a plantelor în diferite condiții ale mediului [11]. Aplicarea *RNC Reglalg* în mediul de cultivare a asigurat sporirea biomasei calusului și agregatelor celulare de *R. rosea* și acumularea clorofilei în ele, eficacitatea maximală a preparatului fiind atinsă la diluția acestuia cu mediul de cultivare în raport de 1/1000

[6, 9]. Din Figura 4.9 observăm, că atât valorile CCF, cât și valorile capacității antioxidante totale (Cat) a extractelor din toate variantele experimentale depășesc datele caracteristice pentru varianta martor. Aplicarea *Reglalgului* în raport de 1/1000 în mediul de cultivare a provocat cel mai pronunțat efect asupra CCF, depășind martorul cu 2%.

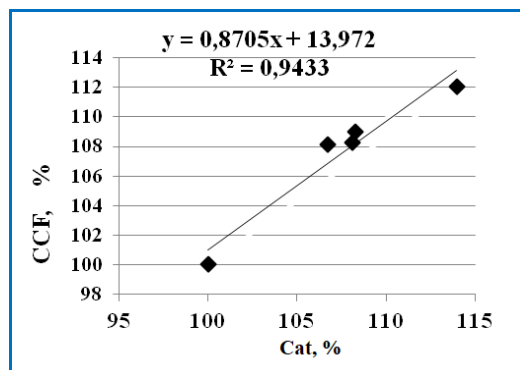
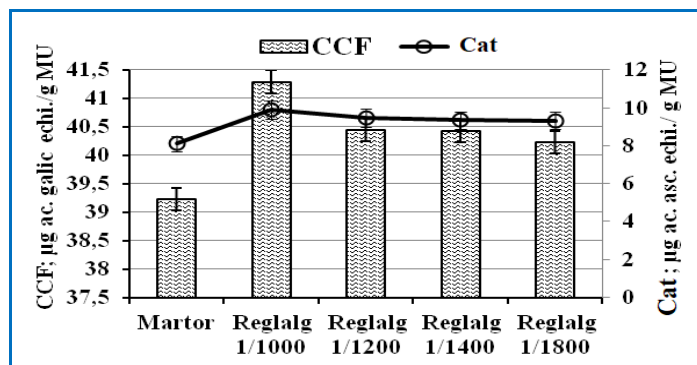


Fig. 4.9. Influența preparatului *Reglalg* diluat cu mediul MS în raport de 1/1000, 1/1200, 1/1400, 1/1800, aplicat în ziua a 12-a de cultivare, asupra conținutului compușilor fenolici (CCF) și capacitatea antioxidantă totală (Cat) în extractele din calusul de *R. rosea* la sfârșitul perioadei de cultivare (în ziua a 40-a).

Figura 4.10. Dependența dintre valorile conținutului CCF și Cat a extractelor etanolice din calusul de *R. rosea* la sfârșitul perioadei de cultivare (în ziua a 40-a).

Totodată, datele prezentate în Figura 4.10 demonstrează faptul, că Cat corelează pozitiv cu CCF. Luând în considerație influența benefică a *Reglalgului* asupra acumulării biomasei calusului de *R. rosea* [6, 9], menționăm că aplicarea preparatului în mediul de cultivare influențează favorabil asupra stării calusului, ceea ce contribuie la sporirea acumulării compușilor fenolici cu 44,9%. Aceasta demonstrează înalta eficacitate a preparatului *Reglalg* asupra acumulării CCF. Evaluarea Cat a extractelor etanolice din biomasa calusului de *R. rosea* la varianta martor și variantele experimentale a demonstrat (Fig. 4.9 și 4.10), că modificările Cat corelează cu CCF în extractele din calusul de *R. rosea*. Aceasta sugerează, că stimularea creșterii biomasei sub influența *Reglalgului*, demonstrată anterior [6, 9], poate avea loc datorită sporirii potențialului oxidoreducător a substanțelor din celulele calusului cultivat în prezența *Reglalgului*.

Metabolismul compușilor fenolici din plante se desfășoară datorită implicării unui număr mare de enzime, inclusiv izoformelor polifenoloxidazei (PFO) [27]. În acest context, s-a propus stabilirea efectului aplicării *Reglalgului* asupra spectrului izoenzimatic al PFO din culturile calusului de *R. rosea*. Modificările spectrului izoenzimatic al PFO sub influența preparatului *Reglalg*, reprezentate pe electroforegramele extractelor din calusul de *R. rosea* (Figura 4.11), indică delimitarea unor zone de localizare a izoformelor PFO. Sub influența *Reglalgului* are loc intensificarea unor izoforme ale PFO și dispariția unei izoforme sub influența *Reglalgului* diluat

în raport de 1/1000. Totodată, la această variantă se manifestă trei zone de activitate a PFO, care după intensitate depășesc semnificativ benzile caracteristice pentru varianta martor și cea experimentală cu diluția *Reglalgului* de 1/1400. După cum a fost menționat mai sus, valoarea indicilor de acumulare a biomasei calusului, precum și a CCF (Figura 4.9), de asemenea, a fost cea mai înaltă pentru varianta cu aplicarea diluției de 1/1000 a preparatului *Reglalg*.

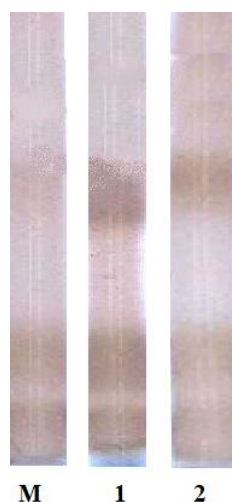


Fig. 4.11. Separarea formelor izoenzimice ale PFO din calusul de *R. rosea*, cultivat pe mediu MS: M-martor; 1 și 2 - suplimentat cu RCN *Reglalg* diluat în raport de 1/1000 și 1/1400 cu mediul MS.

În așa fel, influența benefică a preparatului *Reglalg* asupra creșterii biomasei calusului de *R. rosea* este asociată cu stimularea activității unor componente ai PFO implicați în metabolismul substanțelor secundare din celule [30] și cu acumularea mai activă a componentelor fenolici, substanțe ce determină activitatea biologică a extractelor din *R. rosea*.

Compușii fenolici caracteristici plantelor includ mai multe grupe de MS, inclusiv flavonoidele, care de asemenea influențează potențialul antioxidant, cu implicarea în diferite reacții fiziologice, precum anihilarea speciilor reactive de oxigen (SRO). Datele cantitative privind conținutul total de flavonoide (CTF) din calusul de *R. rosea* în dependență de prezența *Reglalgului* diluat cu mediul de cultură în raport diferit, demonstrează că conținutul flavonoidelor a depășit semnificativ valorile variantei martor doar în celulele

calusului cultivat pe mediul suplimentat cu *Reglalg* în raport de 1/1000 (Figura 4.12).

Aceasta este o diferență esențială dacă comparăm datele acțiunii *Reglalgului* asupra CTF și asupra CCF (Figura 4.9 și 4.12). Anume din această cauză nu se manifestă o corelație semnificativă dintre CTF și Cat a extractelor (Figura 4.13). În variantele de cultivare a calusului în prezența *Reglalgului* diluat cu mediul nutritiv în raport de 1/1200, 1/1400 și 1/1800 a fost stabilită creșterea Cat a extractelor, care se datorează sporirii CCF, CTF în extractele din aceste variante rămânând la nivelul extractelor din calusul variantei martor. Aceste date relevă faptul, că alte grupe de compuși fenolici, cu excepția flavonoidelor, contribuie la sporirea proprietăților antioxidante totale a extractelor etanolice din calusul de *R. rosea*, cultivat pe mediu nutritiv suplimentat cu preparatul *Reglalg* în diferite diluții. Datele din literatura de specialitate [29] confirmă rolul antioxidant al flavonoidelor la plante prin aceea, că conținutul lor sporește în perioada expunerii plantelor la diferiți factori de stres.

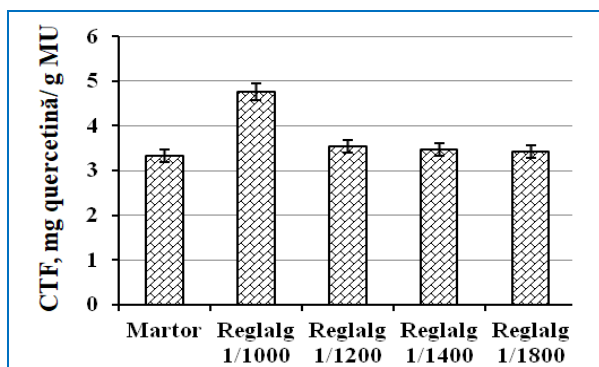


Fig. 4.12. Influența preparatului *Reglalg* diluat cu mediul MS în raport de 1/1000, 1/1200, 1/1400, 1/1800, aplicat în ziua a 12-a de cultivare, asupra conținutului total de flavonoide (CTF) în extractele din calusul de *R. rosea* la sfârșitul perioadei de cultivare (în ziua a 40-a).

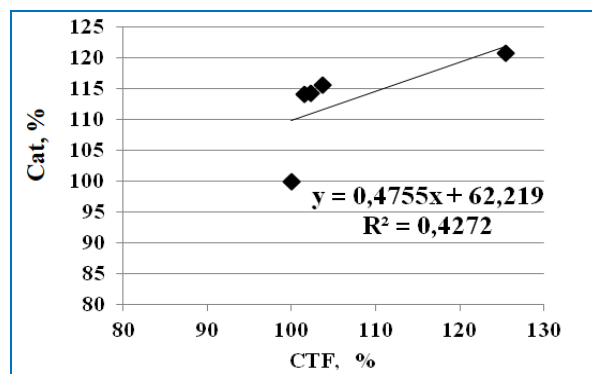


Fig. 4.13. Dependența dintre valorile conținutului total de flavonoide (CTF) și ale capacității antioxidante totale (Cat) a extractelor etanolice din calusul de *R. rosea* la sfârșitul perioadei de cultivare (în ziua a 40-a).

Totodată, biosinteza flavonoidelor cu capacitate antioxidantă în condiții de stres se desfășoară mai intens la speciile de plante, care sunt mai sensibile la factorii de stres. Se presupune că în modificarea balanței redox sunt implicate și flavonoidele prin reglajul activității metabolismului lor. Conținutul majorat de flavonoide în varianta cu aplicarea preparatului *Reglalg* diluat în mediul de cultivare în raport de 1/1000 se poate explica prin faptul că procesele proliferative în celulele calusului din această variantă decurg mai intensiv, în comparație cu celulele calusului din alte variante, deoarece se știe că aceasta contribuie la sporirea formării *SRO* și inducția acumulării flavonoidelor [25].

Metabolismul compușilor fenolici implică un șir de enzime, inclusiv PO, ce este considerată un marker molecular al creșterii și dezvoltării culturii țesuturilor vegetale, iar apariția unor izoenzime ale PO a fost stabilită în procesul organogenezei și diferențierii tisulare. Rezultatele cercetărilor efectuate susțin cele menționate (Fig. 4.14).

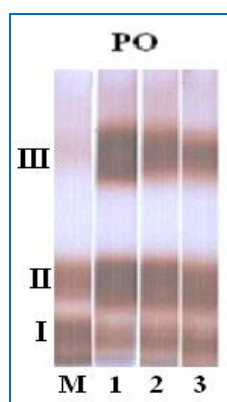


Fig.4.14. Separarea formelor izoenzimatic ale PO a extractelor din calusul de *R. rosea* în vârstă de 32 zile, cultivat pe mediu MS: M-martor și

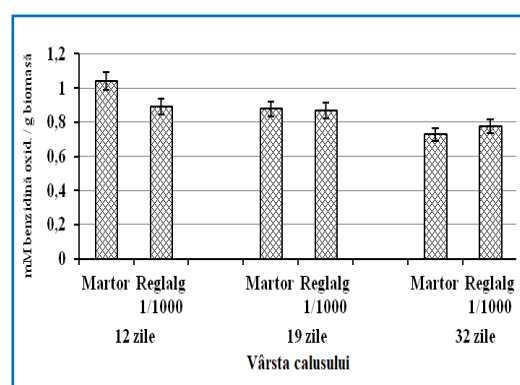


Fig. 4.15. Influența preparatului *Reglalg* diluat cu mediul MS în raport

suplimentat cu preparatul *Reglalg* diluat în raport de 1/1000(1), 1/1200(2) și 1/1400(3) cu mediul MS; I, II și III – zonele de localizare a izoformelor PO.

Activitatea PO în extractele din calusul de *R. rosea* diminuează concomitent cu vârsta celulelor. Cel mai înalt nivel al activității PO a fost observat în extractele din calusul variantelor în vârsta de 12 zile, pe când, cele extrase din calusul de 19 și respectiv 32 zile activitatea enzimatică diminuează (Fig. 4.15). Cu toate că deosebirile dintre varianta martor și cea experimentală erau ne semnificative, spectrul PO din extractele calusului din varianta martor și cele experimentale diferă semnificativ (Fig.4.14). La varianta martor componentul III a PO practic lipsește, pe când la variantele experimentale activitatea acestui component este cu atât mai pronunțată, cu cât concentrația *Reglalgului* în mediul de cultivare este mai joasă, iar acumularea biomasei mai înaltă [6, 9]. Schimbarea activității componentului III al PO demonstrează că efectul aplicării *Reglalgului* corelează pozitiv cu acumularea biomasei calusului [6, 9]. Astfel, datele obținute demonstrează că aplicarea preparatului *Reglalg* influențează benefic creșterea calusului de *R. rosea* și sporește calitatea biomasei, datorită stimulării proceselor de acumulare a fenolilor și flavonoidelor.

4.5. Testarea influenței combinate a factorilor fizici și chimici asupra acumulării metaboliților secundari în agregatele celulare de *R. rosea*

În continuare, scopul cercetărilor a constat în determinarea MS în cultura agregatelor celulare de *R. rosea* supusă anumitor factori de stres (radiației UV, temperaturii joase pozitive și precursorului – alcoolul cinamic (AC) [16]). Inițial, 5 compuși caracteristici speciei *R. rosea* (p-tirosolul, salidrozydul, rosavinul, rosinul și rosaridinul) au fost studiați prin HPLC-ESI-MS, în vederea determinării timpilor de retenție, elucidării structurii și evaluării masei moleculare. Cromatograma extractului din rizomi de *R. rosea* din populația carpatină a fost înregistrată la $\lambda = 254$ nm și prezentată în Figura 4.16, care conține 13 semnale bine definite.

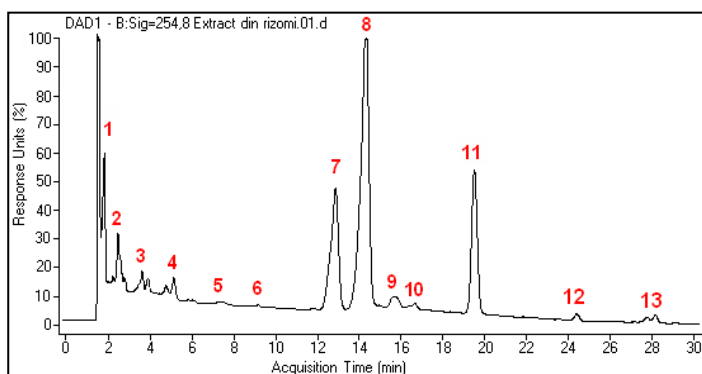


Fig. 4.16. Analiza HPLC-ESI-MS a metaboliților secundari extrași din rizomii de *R. rosea* și detectați la lungimea de undă 254 nm. Separarea a fost efectuată pe coloana cromatografică cu fază inversă (Agilent 300 Extended C₁₈, 4.6 x 150 mm, 5 μm). 1 – acid galic; 2 – salidrozyd; 3,4 – 4-metoxi-cinamil-(6'-O-α-arabinopiranozil) -O-β-glucopiranozidă; 5,6 – derivați de

tipul compușilor 3,4; 7 – rosarin; 8 – rosavin; 9 – cinamil-(6'-O-β-xilopiranozil) -O-β-glucopiranozidă; 10 – rosiridin; 11 – derivați de tipul compușilor 3,4; 12, 13 – derivați de tipul compușilor 3,4.

Comparând timpii de retenție obținuți pentru extractul din rizomi cu cei ale probelor martor și din spectrele de masă (MS) s-a reușit atribuirea semnalelor care corespund următorilor compuși: **1** – acid galic; **2** – salidrohid; **3,4** – 4-metoksi-cinamil-(6'-O- α -arabinopiranosil)-O- β -glucopiranosid; **5,6** – derivați de tipul compușilor **3,4**; **7** – rosarin; **8** – rosavin; **9** – cinamil-(6'-O- β -xilopiranosil)-O- β -glucopiranoside; **10** – rosiridin; **11** – derivați de tipul compușilor **3,4**; **12, 13** – derivați de tipul compușilor **3,4**.

Cromatogramele extractelor din probele de agregate celulare de *R. rosea*, supuse expoziției radiației UV, temperaturilor joase pozitive și precursorului AC sunt prezentate în Figura 4.17 (cromatogramele A, B, C și D).

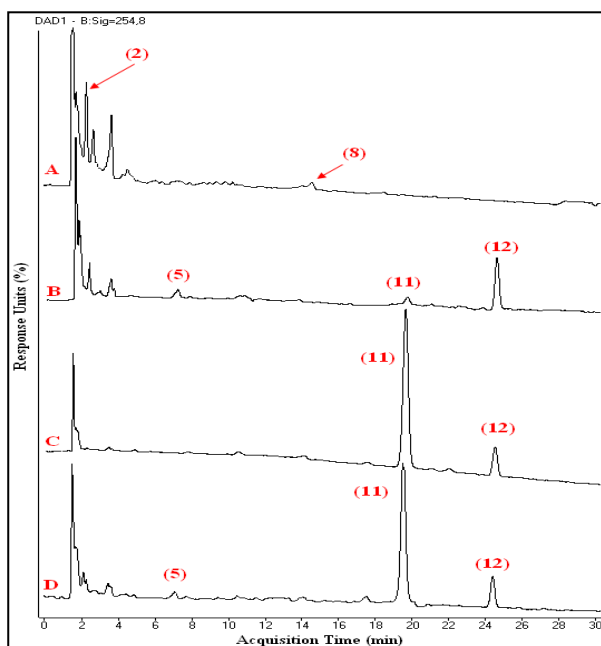


Fig. 4.17. Analiza HPLC-ESI-MS a metaboliților secundari extrași din agregatele celulare de *R. rosea*: unde A – proba martor, B – proba supusă radiației UV, C – proba supusă temperaturii joase, D – proba supusă acțiunii radiației UV, temperaturii joase și alcoolului cinamic. 2 – salidrohid; 3,4 - 4-metoksi-cinamil-(6'-O- α -arabinopiranozil)-O- β -glucopiranozilă; 5,6 – derivați de tipul compușilor 3,4; 8 – rosavin; 11, 12– derivați de tipul compușilor 3,4.

Din Figura 4.17 se poate observa că în cromatograma extractului din agregatele celulare – proba martor (Figura 4.17A), este prezent un număr mai mic de semnale și cu o intensitate mai redusă în comparație cu extractul din rizomi (Fig. 4.16). Este importantă însă prezența compușilor caracteristici speciei *R. rosea*, salidrohidul **1** și rosavinul **8**. Influența temperaturii joase pozitive și prezența AC în mediul de cultură a agregatelor celulare (Figura 4.17C), a favorizat acumularea atât a salidrohidului și rosavinului, cât și a altor componente, cum ar fi **11** și **12**.

Influența radiației UV în combinație cu prezența AC în mediul de cultivare a influențat și mai pronunțat compoziția biochimică a culturii agregatelor celulare (Fig. 4.17B). A apărut componentul **5** derivat din aceeași categorie cu componentii **11** și **12**. Combinația influenței celor trei factori: AC, radiația UV și temperatura joasă pozitivă (Fig. 4.17D) a favorizat acumularea tuturor compușilor apăruiți și în celelalte probe. Este evidentă intensitatea sporită a componentului **11** în comparație cu ceilalți

Datele obținute demonstrează că proliferarea celulară, spectrul *MS* și acumularea lor în cultura *in vitro* de *R. rosea* sunt semnificativ influențate de diferiți factori chimici și fizici. Printre factorii fizici, care influențează acumularea și spectrul *MS* menționăm cei asociați cu creșterea plantelor de *R. rosea* în condiții naturale și, anume radiația *UV* și variația temperaturilor [24]. Cu toate că efectele finale ale influenței acestor factori asupra acumulării *MS* în experimentele efectuate au fost relativ joase, însuși prezența lor sugerează posibilitatea obținerii unor rezultate semnificative realizând cercetări complexe cu variația largă a dozelor și periodicității aplicării acestor factori. Aceste date indică posibilitatea obținerii pe cale biotehnologică a principiilor active caracteristice pentru specia *R. rosea*. În așa fel, ar deveni posibilă nu numai obținerea unor efecte financiare, dar și asigurarea unor premise de protecție a habitatelor naturale a speciei *R. rosea*.

CONCLUZII ȘI RECOMANDĂRI

Concluzii

1. Conținutul și componența *metaboliților secundari* extrași din rizomii plantelor de *R. rosea* colectați din Munții Carpați, România, sunt asemănătoare cu cele descrise pentru plantele din habitatele Munților Altai, Rusia, cercetați multilateral și considerați ca etalon al calității, atunci când în rizomii plantelor de *R. rosea* cultivate în Rezervația Științifică „*Plaiul Fagului*”, raionul Ungheni, Republica Moldova și Grădina Botanică a Universității Naționale din or. Cernăuți, Ucraina, conținutul acestora este mult mai redus în comparație cu cel caracteristic pentru rizomii plantelor colectate din habitatele naturale [5, 10].

2. Expunerea culturii celulare de *R. rosea* acțiunii separate și în combinație a radiației *UV*, temperaturilor joase pozitive și introducerea în mediul de cultivare a alcoolului cinamic favorizează acumularea biomasei celulare, sporirea conținutului compușilor fenolici asociați cu creșterea capacității antioxidante a extractelor din biomasa obținută *in vitro* [4, 8]

3. Termoperiodismul zilnic și sezonier, precum și radiația *UV* reprezintă factorii importanți ce determină acumularea *metaboliților secundari* în rizomii plantelor de *R. rosea*, care cresc spontan în zonele montane. Sporirea randamentului *metaboliților secundari* în cultura *in vitro*, cât și cea de cultivare a *R. rosea* în condiții *in vivo*, poate fi realizată prin elaborarea regimurilor optime de expunere a culturii la temperaturi joase pozitive și radiații *UV*.

4. Introducerea *RNC Reglalg* în mediul de cultivare a dus la intensificarea activității unor izoforme ale peroxidazei și polifenoloxidazei în extractele din biomasa celulară, totodată a demonstrat influență benefică asupra acumulării biomasei calusului și agregatelor celulare de *R. rosea*; a asigurat majorarea conținutului pigmentilor fotosintetici și a substanțelor fenolice, inclusiv a flavonoidelor [6, 9].

5. Obținerea practică a *metaboliților secundari* caracteristici pentru specia *R. rosea* poate fi realizată pe cale biotehnologică din biomasa calusului și agregatelor celulare de *R. rosea* aflate la etapa inițială de trecere de la *faza logaritmică* de creștere la cea *staționară* (marcată prin schimbarea spectrului de polipeptide în extractele din biomasa celulară) [7].

Recomandări

Obținerea practică și economic avantajoasă a materiei prime de *R. rosea* ca sursă prețioasă de *metaboliți secundari* poate fi realizată pe două căi alternative:

- prin metoda relativ rapidă de obținere în condiții *in vivo* a unor plante viguroase de *R. rosea* și transferul lor la vârsta de 3-4 ani pentru menținerea pe parcursul a 1-2 ani în condiții naturale, caracteristice pentru plantele spontane. În așa fel va fi asigurată obținerea rapidă și înalt productivă a materiei prime cu un conținut bogat de *metaboliți secundari*, caracteristici pentru specia dată;

- utilizarea procedurii de cultivare a calusului de *R. rosea* în mediu artificial ce conține *RNC Reglalg* și expunerea suplimentară a culturii aflate în faza logaritmică de creștere la condiții cu termoperiodism și radiație *UV* caracteristice habitatelor naturale de creștere ale plantelor, favorizează obținerea pe cale biotehnologică a *metaboliților secundari* caracteristici pentru această specie.

BIBLIOGRAFIE

1. AVULA, B., WANG, Y., ALI, Z et al. RP-HPLC determination of phenylalkanoids and monoterpenoids in *Rhodiola rosea* and identification by LC-ESI-TOF. In: *Biomed Chromatogr.* 2009, nr 23(8), pp. 865–872. ISSN 1099-0801.
2. BYKOV, V.A., ZAPESOCHNAYA, G.G., KURKIN, V.A. Traditional and biotechnological aspects of obtaining medicinal preparations from *Rhodiola rosea* L. (a review). In: *Pharm. Chem. J.* 1999, nr 33(1), pp. 29–40. ISSN 0091-150X.
3. CAUȘ, M., DASCALIUC, A. Peroxidase activity in cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings obtained from seeds treated with natural growth regulator Reglalg. In: *J. Botany. Ch.*, 2015, vol. VII, nr. 1(10), pp. 10-16.
4. CALUGĂRU, T., DASCALIUC, A., IVANOVA, R. Total polyphenolic content and radical scavenging activity of extracts from *Rhodiola rosea* L. callus. In: *Plante medicinale – prezent și perspective. Symposium*, Romania, Peatra-Neamț, 2007, Vol. V, № 1-2, pp. 23-24. ISSN 1584-0158.
5. CĂLUGĂRU, T., DASCALIUC, A., ABRAMOV, V., CIOCĂRLAN, A., NICOLESCU, A., COSTAN, O., CĂLIN, D. Biochemical analysis of *Rhodiola rosea* roots. In: *XXIX Conferința Internațională de Chimie*, România, Căciulata, 2006, pp. 71. ISBN 10 973-750-049-0.
6. CĂLUGĂRU-SPĂTARU, T. Influența *Reglalgului* asupra acumulării biomasei și pigmentilor fotosintetici în celulele calusului și agregatelor celulare ale rădăcinii aurii (*Rhodiola rosea* L.). In: *Buletinul Acad. de Științe a Moldovei. Științele vieții*. 2017, nr. 1, pp 39-47. ISSN 1857-064X. <http://bsl.asm.md/article/id/52247>
7. CĂLUGĂRU-SPĂTARU, T. Optimizarea mediului de cultivare a calusului de *Rhodiola rosea* L. și marcarea proteică a etapei de dezvoltare a lui. In: *Conservarea diversității plantelor. Materialele simpozionului științific internațional consacrat aniversării a 60-a de*

- la fondarea Grădinii Botanice (Institut) a AȘM*, 7-9 octombrie 2010, Chișinău, pp. 50-55. ISBN 978-9975-105-42-2.
8. CĂLUGĂRU-SPĂȚARU, T.; IVANOVA, R.; DASCALIUC, A. Inducerea acumulării compușilor fenolici în calusul de *Rhodiola rosea* L. cu ajutorul radiației ultraviolete. In: *Genetica și fiziologia rezistenței plantelor. În memoria academicianului Anatolie Jacotă: Conf. șt., Teze*. 21 iunie 2011: Chișinău, pp. 129. ISSN 978-9975-78-994-3.
 9. CĂLUGĂRU-SPĂȚARU, Tatiana, CAUȘ, Maria, DASCALIUC, Alexandru. *Procedeu de obținere a biomasei calusului de Rhodiola rosea L. in vitro*. Brevet de invenție 894 (13) Z, A 01 H4 /00 (2006.01) A 01 H 5/12 (2006.01). Institutul de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor al Academiei de Științe a Moldovei. Nr. depozit: s 2014 0133. Data depozit: 2014.10.20. Data publicării: 2015.04.30. In: BOPI. 2015, nr. 4, pp. 32-33. http://agepi.gov.md/sites/default/files/bopi/BOPI_04_2015.pdf
 10. DASCALIUC, A., CĂLUGĂRU-SPĂȚARU, T., CIOCÂRLAN, A., COSTICA, M., COSTICA, N., KRAJEWSKA, A., DREGER, M, MSCISZ A., FURMANOWA, M., PRZEMYSŁAW, M. Chemical composition of golden root (*Rhodiola rosea* L.) rhizomes of Carpathian origin. In: *Herba Polonica*, Poznan, 2008, vol. 57, nr. 4, pp.17-27. ISSN 0018-0599. http://www.herbapolonica.pl/magazines-files/1687607-02_Chemical.pdf
 11. DASCALIUC, A.P. The use of natural preparation Reglalg for plant protection in organic farming. In: *Mater. Int. Scient. Symp. "Biological plant protection in the ways of innovation"*, Inf.byull. IOBC. Chernivtsi, 2012, vol. 43, pp. 84-87.
 12. EVSTATIEVA, L., TODOROVA, M., ANTONOVA, D. Chemical composition of the essential oils of *Rhodiola rosea* L. of three different origins. In: *Pharmacogn Mag.* 2010, nr 6(24), pp. 256–258. ISSN 0976-4062. DOI: [10.4103/0973-1296.71782](https://doi.org/10.4103/0973-1296.71782)
 13. GANZERA, M., YAYLA, Y., KHAN, IA. Analysis of the marker compounds of *Rhodiola rosea* L. (golden root) by reversed phase high performance liquid chromatography. In: *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2001, nr 49(4), pp. 465-7. ISSN 1347-5223.
 14. GHIORGHITĂ, G., MAFTEI, D.I., NICUȚĂ, D., MAFTEI, D.E., BĂDĂLUȚĂ, N. The study of several morpho-physiological indices of *in vitro* regenerants of *Rhodiola rosea* L. and *Stachys sieboldii* Miq. In: *An. Șt. Univ. "Al. I. Cuza" Iași, Ser. Biol. Veget.* 2011, nr 57(2), pp. 53-60. ISSN 2247-2711.
 15. GODOY-HERNÁNDEZ, G., VÁZQUEZ-FLOTA, F. A. Growth Measurements: Estimation of Cell Division and Cell Expansion. In: *Plant Cell Culture Protocols*. 2006, pp. 51-58. ISSN 1940-6029. DOI: [10.1385/1-59259-959-1:051](https://doi.org/10.1385/1-59259-959-1:051)
 16. GYÖRGY, Z., TOLONEN, A., NEUBAUER, P., HOHTOLA, A. Enhanced biotransformation capacity of *Rhodiola rosea* callus cultures for glycosid production. In: *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2005, vol. 83, nr 2, pp. 129-135. ISSN 1573-5044.
 17. IVANOVA, R., DASCALIUC, A., MROZIKIEWICZ, P., CASIAN, I. Evaluation of peroxy radical scavenging activity and phenolics content in root extracts from Rhizomes of *R.rosea* L. În: *Probleme actuale ale geneticii, fiziologiei și ameliorării plantelor*. Chisinau 2008, pp. 372-376. ISBN 978-9975-78-667-6.
 18. LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4. In: *Nature*, 1970, vol. 227, nr 5259, pp. 680-685. ISSN 1476-4687.
 19. LIU, Z., LIU, Y., LIU, C., SONG, Z., LI, Q., ZHA, Q., LU, C., WANG, C., NING, Z., ZHANG, Y., TIAN, C., LU, A The chemotaxonomic classification of *Rhodiola* plants and its correlation with morphological characteristics and genetic taxonomy. In: *Chem Cent J.* 2013, nr 7/1/118. ISSN 1752-153X. Disponibil: DOI: [10.1186/1752-153x-7-118](https://doi.org/10.1186/1752-153x-7-118)
 20. MONTAVON, P., KUKIC, K.R., BORTLIK, K. A simple method to measure effective catalase activities: optimization, validation, and application in green coffee. In: *Anal. Biochem.* 2007, vol. 360, nr 2, pp. 207–215. ISSN:0003-2697.

21. MURASHIGE, T., SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. In: *Physiol. Plant.* 1962. vol. 15, nr 3, pp. 473–497. ISSN 1399-3054.
22. PASSARDI, F., COSIO, C., PENEL, C., DUNAND, C. Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. In: *Plant Cell Reports.* 2005, vol. 24, nr 5, pp. 255-265. ISSN 1432-203X.
23. PESCHEL, W.; PRIETO, J.M.; KARKOUR, C.; WILLIAMSON, E.M. Effect of provenance, plant part and processing on extract profiles from cultivated European *Rhodiola rosea* L. for medicinal use. In: *Phytochemistry.* 2013, vol. 86, pp. 92–102. ISSN 0031-9422.
24. ROHLOFF, J. Volatilis from rhizomes of *Rhodiola rosea* L. In: *Phytochemistry.* 2002, vol. 59, nr 6, pp. 655-661. ISSN 0031-9422. DOI: [10.1016/S0031-9422\(02\)00004-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00004-3)
25. ROSALIND, T.H., DUTTA, B.K., PAUL, S.B. Evaluation of *in vitro* antioxidant activity, estimation of total phenolic and flavonoid content of leaf extract of *Eurya japonica* thumb. In: *Asian J. Pharmac. Clin., Res.* 2013, vol. 1, suppl.1, pp. 152-155. ISSN - 0974-2441.
26. SINGLETON, V.L., ORTHOFER, R., LAMUELA-RAVENTOS, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. In: *Methods Enzymology*, 1999, vol. 299, pp. 152-178. ISSN 0076-6879.
27. SULTANA, M., GANGOPADHYA, Y.G. Looking for isoforms of enzymes related to *in vitro* morphogenesis in *Nicotiana tabacum* L. In: *Int.Res.J. Biol. Sci.* 2014, vol. 3, nr 1, pp. 11-16. ISSN 0974 3073. Disponibil: http://www.irphouse.com/ijgeb-spl/ijgebv5n2_09.pdf
28. TOLONEN, A., HOHTOLA, A., JALONEN, J. Liquid chromatographic analysis of phenylpropanoids from *Rhodiola rosea* extracts. In: *Chromatographia.* 2003, vol. 57, nr 9-10, pp. 577-579. ISSN 1612-1112. Disponibil: DOI: [10.1007/BF02491732](https://doi.org/10.1007/BF02491732)
29. WILLIAMS, R.J., SPENCER, J.P.E., RICE-EVANS, C.A. Flavonoids: antioxidants or signaling molecules. In: *Free Radic. Biol. Med.* 2004, vol. 36, pp. 838–849. ISSN 1873-4596.
30. YORUK, R., MARSHALL, M.R. Phyzochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: A review. In: *Journal of Food Biochemistry.* 2003, vol. 27, pp. 361-422. ISSN 1745-4514. Disponibil: DOI: [10.1111/j.1745-4514.2003.tb00289.x](https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2003.tb00289.x)
31. ЗАПЕСОЧНАЯ, Г.Г., КУРКИН, В.А. Гликозиды коричневого спирта корневищ *Rhodiola rosea*. In: *Химия природных соединений.* 1982, Т 6, сс. 723-727. ISSN 0023-1150.
32. КИРЬЯНОВ, А.А., БОНДАРЕНКО, Л.Т., КУРКИН, В.А., ЗАПЕСОЧНАЯ, Г.Г., ДУБИЧЕВ, А.Г., ВОРОНЦОВ, Е.Д. Определение биологически активных компонентов корневищ *Rhodiola rosea*. В: *Химия природных соединений.* 1991, Т. 3, сс. 320-323. ISSN 0023-1150.
33. КУРКИН, В.А., ЗАПЕСОЧНАЯ, Г.Г., ЩАВЛИНСКИЙ, А.Н., НУХИМОВСКИЙ, Е.Л., ВАЙДЫШЕВ, В.В. Методы определения подлинности и качества корневищ родиолы розовой. В: *Химико-фармацевтический журнал.* 1985, Т. 19, № 3, сс.185-190. ISSN 0023-1134.
34. КУРКИН, В.А., ЗАПЕСОЧНАЯ, Г.Г. Химический состав и фармакологические свойства растений рода родиола. В: *Химико-фармацевтический журнал.* 1986, № 10, сс. 1231-1244. ISSN 0023-1134.

LISTA CELOR MAI IMPORTANTE LUCRĂRI ȘTIINȚIFICE PUBLICATE LA TEMA TEZEI

Articole în reviste științifice

în reviste din bazele de date Web of Science și SCOPUS

1. CALUGARU-SPATARU, T., SILION, M., CIOCARLAN, A., DASCALIUC, A. Study of biotransformation compounds in callus culture of *Rhodiola rosea* specie. In: *Agronomy Series of Scientific Research.* Lucrări șt. Univ. de Științe Agricole și Medicină Veterinară „Ion Ionescu de la Brad”. 2013, Vol. 56 nr 2, pp. 57-60. ISSN 1454-7414.
2. DASCALIUC, A., CALUGĂRU-SPĂTĂRU, T., CIOCÂRLAN, A., COSTICA, M., COSTICA, N., KRAJEWSKA, A., DREGER, M., MSCISZ A., FURMANOWA, M.,

PRZEMYSŁAW, M. Chemical composition of golden root (*Rhodiola rosea* L.) rhizomes of Carpathian origin. In: *Herba Polonica*, Poznan, 2008, vol. 57, nr. 4, pp. 17-27. ISSN 0018-0599.

în reviste din Registrul Național al revistelor de profil, cu indicarea categoriei

1. CĂLUGĂRU-SPĂTARU, T., CIOCĂRLAN, A., DASCALIUC, A. Compoziția chimică a extractelor și uleiului volatil din rizomii de *Rhodiola rosea* L. de origine Carpatină In: *Buletinul AȘM. Științele vieții*. 2017, nr. 3(333), pp. 76-83. ISSN 1857-064X. <http://bsl.asm.md/article/id/57334>. (Categorii B).
2. CĂLUGĂRU-SPĂTARU, T. Influența Reglialgului asupra acumulării biomasei și pigmentilor fotosintetici în celulele calusului și agregatelor celulare ale rădăcinii aurii (*Rhodiola rosea* L.). In: *Buletinul AȘM. Științele vieții*. 2017, nr. 1(331), pp 39-47. ISSN 1857-064X. <http://bsl.asm.md/article/id/52247>. (Categorii B).
3. CAUȘ, M., CĂLUGĂRU-SPĂTARU, T., DASCALIUC, A. Influența regulatorului natural de creștere Reglalg asupra potențialului oxidoreducător al celulelor calusului de *Rhodiola rosea* L. In: *Buletinul AȘM. Științele vieții*. 2016, nr. 2(329), pp. 40-48. ISSN 1857-064X. <http://bsl.asm.md/article/id/47017>. (Categorii B)
4. CĂLUGĂRU-SPĂTARU, T. Effects of Natural Growth Regulator Reglalg on the *Rhodiola rosea* L. callus growth rate. In: *Journal of Botany*. Chișinău. 2015, vol. VII., nr. 1(10), pp. 5-9. ISSN 1857-095X. (Categorii B).
5. CĂLUGĂRU-SPĂTARU, T. Acumularea metaboliților secundari în *Rhodiola rosea* L. în funcție de condițiile mediului. In: *Buletinul AȘM. Științele vieții*. 2015, nr. 1(325), pp. 85-92. ISSN 1857-064X. <http://bsl.asm.md/article/id/37175> (Categorii B.)
6. CĂLUGĂRU, T. Inducerea organogenezei celulelor calusului de *Rhodiola rosea*. In: *Analele științifice ale Universității de Stat din Moldova. Seria: Științe Chimico-biologice*, Chișinău, 2004, pp. 20-22. ISSN 1811-2617. (Categorii C).

Articole în culegeri științifice

în lucrările conferințelor științifice internaționale (peste hotare)

1. CALUGARU-SPATARU, T., CIOCARLAN, A., SILION, M. The chemical composition of callus culture and roots of *Rhodiola rosea* L. of Carpathian origin. In: *International scientific conference and School for young scientists „Plant physiology as a theoretical basis for innovative agriculture and Phytobiotechnologies”*, (Russia, Kaliningrad, 2014): Proceedings in 2 vol., ed. E.S. Ronizhina. – Kaliningrad: Axios, 2014, vol. II, pp. 537-539. ISBN 978-5-9172-6076-1. <http://ofr.su/assets/files/annual/proceedingsvoedition.pdf>.

în lucrările conferințelor științifice internaționale (Republica Moldova)

1. CAUȘ, M., CĂLUGĂRU-SPĂTARU, T., DASCALIUC, A. Influența preparatului Reglalg asupra acumulării biomasei, conținutului compușilor fenolici și spectrului izoenzimatic al polifenoloxidazei în celulele calusului de *Rhodiola rosea* L. In: *Genetica, fiziologia și ameliorarea plantelor: materialele conf. șt. intern., 23-24 oct. 2014. Ed. V-a. Ch.*, 2014, pp. 48-52. ISBN 978-9975-56-194-5.
2. CĂLUGĂRU-SPĂTARU, T. Optimizarea mediului de cultivare a calusului de *Rhodiola rosea* L. și marcarea proteică a etapei de dezvoltare a lui. In: *Conservarea diversității plantelor: mater. simp. șt. intern. consacrat aniversării a 60-a de la fondarea Grădinii Botanice (Institut) a AȘM, Chișinău, 7-9 oct. 2010*, Chișinău, 2010. pp. 50-55. ISBN 978-9975-105-42-2.

în lucrările conferințelor științifice naționale cu participare națională

1. DASCALIUC, A., GANG, D., CĂLUGĂRU, T., MALINOC, A., TOMA, S. *Rhodiola rosea* L. a valuable medicinal plant: problems of introduction. In: *Advanced Biological Technologies and their Impact on Economy, Natural products: Technologies for their Capitalization in Agriculture, Medicine and Food, Industry. Materials of the II-nd Symposium. March 22-24, AGEPI, Chișinău 2005*, pp. 112-117. ISBN 9975-62-125-2.

2. CĂLUGĂRU, T., MALINOC, A., DASCALIUC, A. Inducerea și micropropagarea *in vitro* a speciei *Rhodiola rosea* L. In: *Fiziologia și biochimia plantelor de cultură (aspecte ecologice). Lucrările științifice ale Simpozionului III al Societății de Fiziologie și Biochimie Vegetală a Republicii Moldova*, Chiș., 2004, pp. 76-81. ISBN 9975-9814-0-2.

Teze în culegeri științifice

în lucrările conferințelor științifice internaționale (peste hotare)

1. CĂLUGĂRU-SPĂTARU, T. Specificul biologic și introducerea speciei *Rhodiola rosea* L. în agricultura Moldovei. În: *Conservarea diversității plantelor in situ și ex situ: volum de rezumate: simpozion științific. Iași*, 2011, pp. 52-53. ISBN 978-973-640-677-5.
2. CALUGARU, T., DASCALIUC, A., IVANOVA, R. Total polyphenolic content and radical scavenging activity of extracts from *Rhodiola rosea* L. callus. In: *The Xth Edition of the National Symposium "Medicinal plants – present and perspectives", 6-8 June 2007, Piatra-Neamt, Romanian Biological Sciences*, vol. V, № 1-2, 2007, pp. 23-24. ISSN 1584-0158.

în lucrările conferințelor științifice internaționale (Republica Moldova)

1. CALUGARU-SPATARU, T., CIOCARLAN, A., DASCALIUC, A. Comparative study of the productivity of callus biomass and cell aggregates of *R. rosea in vitro*. In: *International Conference: Achievements and Perspectives of Modern Chemistry*, dedicated to the 60th anniversary from the foundation of the Institute of Chemistry, 9-11 october 2019, Chisinau, p. 210. ISBN 978-9975-62-428-2.
2. CALUGARU-SPATARU, T., CAUȘ, M. Studiul acțiunii de scurtă durată a temperaturilor joase pozitive asupra acumulării biomasei și H₂O₂ în cultura *in vitro* de *Rhodiola rosea* L. In: *Teze. Simpozionul Științific Internațional „Biotehnologii Avansate – Realizări și Perspective” (Ediția V-A)*, Chișinău, MD, 21-22 octombrie 2019, p. 28.
3. CAUȘ, M.; CĂLUGĂRU-SPĂTARU, T.; DASCALIUC, A. Antioxidative potential of *in vitro* cultivated callus of *Rhodiola rosea* L., an endangered medicinal plant, in relation to *Reglalg* application. In: *Conservation of plant diversity: international sci. sympos*, Chișinău, 1-3 June 2017. Chișinău, 2017, p. 71. ISBN 978-9975-4182-1-8.
4. CAUȘ, M., CĂLUGĂRU-SPĂTARU, T. Total polyphenols content and antioxidant capacity of *Rhodiola rosea* L. callus biomass in the presence of plant growth regulator *Reglalg* in culture medium. In: *Abstract Book, Conferința științifică (cu participare internațională) Life sciences in the dialogue of generations: "Connections between universities, Academia and Business Community" March 25, 2016, Ch.*, p. 160. ISBN 978-9975-933-78-0.

în lucrările conferințelor științifice naționale cu participare națională

1. CĂLUGĂRU-SPĂTARU, T., IVANOVA, R., DASCALIUC, A. Inducerea acumulării compușilor fenolici în calusul de *Rhodiola rosea* L. cu ajutorul radiației ultraviolete. In: *Genetica și fiziologia rezistenței plantelor. În memoria academicianului Anatolie Jacotă: Conf. șt., Chișinău, 21 iunie 2011: Teze*. Ch., 2011, p. 129. ISSN 978-9975-78-994-3.

Brevete de invenții

1. CĂLUCĂRU-SPATARU T., DELEAN T., DASCALIUC A. *Procedeu de micropropagare a plantelor de Rhodiola rosea L. in vitro*. MD 3375 G2 2007.08.31.
2. CĂLUGĂRU-SPATARU, T., CAUȘ, M., DASCALIUC, A. *Procedeu de obținere a biomasei calusului de Rhodiola rosea L. in vitro*. MD 894 2015-11-30.

ADNOTARE

Călugăru-Spătaru Tatiana, Acumularea *in vivo* și *in vitro* a metaboliților secundari la specia *Rhodiola rosea* L. din populația carpatină, teza de doctor în științe biologice, Chișinău, 2019. Teza este constituită din compartimentul introductiv, patru capitole, concluzii generale și recomandări, bibliografie cu 333 titluri, 18 anexe, 135 pagini text de bază, 58 figuri, 13 tabele. Rezultatele obținute sunt publicate în 36 lucrări științifice.

Cuvintele cheie: *Rhodiola rosea*, calus, agregate celulare, HPLC, RMN, *metaboliți secundari (MS)*, *p*-tirozol, salidrohid, rosavin, flavonoide, terpen, peroxidaza, catalaza.

Scopul lucrării: evaluarea particularităților acumulării principiilor active în rizomii plantelor de *R. rosea* din populațiile carpatine (îndeosebi cele din România) și celor din zonele de cultivare *in vivo* privind fundamentarea științifică a interrelațiilor „*genotip-mediul-procese metabolice*” ca bază teoretică de elaborare a căilor și metodelor de optimizare a proceselor de acumulare a *metaboliților secundari* și obținerii lor pe cale biotehnologică.

Obiectivele lucrării: determinarea compoziției *MS* și a uleiului volatil din rizomi plantelor de *R. rosea* din populația carpatină, România, precum și din cei cultivați în Moldova; introducerea în cultura *in vitro* a explanturilor din plantele de *R. rosea* și determinarea influenței diferitor factori fizici și chimici, izolați și în combinație, asupra productivității biomasei și acumulării diferitor componente ale *MS* în cultura celulară de *R. rosea*; compararea compoziției chimice a rizomilor de *R. rosea* din populația carpatină cu cea a rizomilor obținuți prin cultivarea *in vivo*, precum și a celei acumulate în biomasa celulară obținută în condițiile *in vitro*.

Noutatea și originalitatea științifică: pentru prima dată a fost determinată compoziția *MS*, precum și a uleiului volatil, din rizomi de *R. rosea* din Carpații de Est a României. La fel a fost demonstrat că expunerea de scurtă durată a culturii celulare la acțiunea temperaturilor joase și radiației *UV*, precum și introducerea în mediul de cultivare a alcoolului cinamic și regulatorului natural de creștere (RNC) *Reglalg*, influențează benefic acumularea *MS* în cultura *in vitro* de *R. rosea*, dar compoziția și mai ales conținutul lor este mai redus în comparație cu cel caracteristic pentru rizomii plantelor spontane, colectate din munții Carpați, România.

Rezultatul obținut care contribuie la soluționarea unei probleme științifice importante constă în elaborarea procedurilor de aplicare de scurtă durată a temperaturilor joase, radiației *UV*, introducerea alcoolului cinamic și RNC *Reglalg* în mediul de cultură la începutul fazei exponențiale de creștere a culturii celulare, fapt ce a avut ca efect stimularea acumulării biomasei de *R. rosea* în condiții *in vitro* și sporirea substanțială a conținutului de *metaboliți secundari*, în vederea creării unor regimuri de cultivare în bioreactoare adaptate special pentru obținerea *MS* caracteristici pentru rizomii de *R. rosea*.

Semnificația teoretică: cercetările realizate în condiții de laborator cu expunerea de scurtă durată a materialului biologic la radiația *UV* și la temperaturi joase dau posibilitatea de a concluziona că termoperiodismul zilnic și cel sezonier, radiațiile *UV* intense, schimbul umidității relative a aerului caracteristic pentru condițiile din munți, sunt factori importanți ce determină atât conținutul înalt de *MS* acumulați în rizomi, cât și viabilitatea plantelor de *R. rosea*. Cultura celulară de *R. rosea* reprezintă o metodă alternativă și un model prețios pentru a cerceta influența nivelului de organizare biologică asupra capacității plantelor de a acumula *MS*, precum și a determina influența factorilor fizici și chimici asupra acumulării acestor componente.

Valoarea aplicativă: cercetările în condiții *in vivo* și *in vitro* au demonstrat că pentru obținerea *MS*, caracteristici pentru *R. rosea*, este necesar de a crea unele regimuri de iluminare, umiditate și termoperiodism potrivite pentru plantele acestei specii. În așa fel, cultivarea speciei de *R. rosea* în condiții *in vivo* și *in vitro* ar putea asigura eliminarea pericolului dispariției speciei din cauza colectării intensive a plantelor în condiții naturale.

Implementarea rezultatelor științifice: cultura calusului de *R. rosea* în vârstă de 10 ani este menținută până în prezent în IGFPP și continuă a fi implementată în activitatea de cercetare a mecanismelor de reglare a biosintezei *MS*, inclusiv în procesul didactic la Universitatea de Stat „Dimitrie Cantemir”.

ANNOTATION

Calugaru-Spataru Tatiana, *In vivo* and *in vitro* accumulation of secondary metabolites in the Carpathian population of the *Rhodiola rosea* L. species, doctoral thesis in biological sciences, Chisinau, 2019. The thesis contains an introduction, four chapters, general conclusions, recommendations, and a bibliography of 333 titles, 18 annexes, 143 pages of basic text, 58 figures, and 13 tables. The results are reflected in 36 scientific papers.

Keywords: *Rhodiola rosea*, callus, cell aggregates, HPLC, NMR, *secondary metabolites (SM)*, p-tyrosol, salidroside, rosavin, flavonoids, terpenes, peroxidase, catalase.

Aim of the study: assessment of the accumulation of active components in the rhizomes of plants of the Carpathian population *R. rosea* (Romania), as well as plants grown *in vivo* in order to evaluate the scientific basis of the relationship “*genotype – medium – metabolic processes*” for developing the methods of optimizing the accumulation of secondary metabolites in *R. rosea* cells, cultured *in vitro*.

The objectives of the study: determinization of the composition of *SM* and volatile oils in the *R. rosea* rhizomes collected in Romanian Carpathian Mountains and in rhizomes of plants cultivated in Moldova; introduction *in vitro* of the explants from *R. rosea* plants and determination of the influence of different physical and chemical factors, separately and in combination, on the biomass productivity and as well on the accumulation of various components of *SM*.

Originality and scientific novelty: for the first time, the composition of the *SM* as well as the volatile oil of *R. rosea* rhizomes collected in the Eastern Carpathian Mountains of Romania was determined. It was also demonstrated that the short-term exposure of cell culture to low temperature and *UV* radiation, as well as the introduction in the cultivation medium of cinnamic alcohol and plant growth regulator (PGR) *Reglalg*, has a beneficial effect on the accumulation the *SM*, but their composition and content was lower compared to that characteristic for *R. rosea* rhizomes of spontaneous plants.

The result obtained in solving an important scientific problem consists in the elucidation that short-term application of low temperatures and *UV* radiation, the introduction of cinnamic alcohol and PGR *Reglalg* in the culture medium at the beginning of the exponential phase of cell culture growth, assures the stimulation of the accumulation of *SM* in *R. rosea* biomass under *in vitro* conditions the open the possible ways to optimize the regimens of *in vitro* cultivation the *R. rosea* cells for obtaining the *SM* characteristics for rhizomes of spontaneous growing plants.

Theoretical value: Results of short-term exposure to *UV* radiation and low temperature of *in vitro* culture gives the possibility to conclude that such factors as daily and seasonal thermoperiodicity, *UV* radiation, the diurnal variation of the relative air humidity, characteristic for natural conditions in the mountains, are decisive factors which determines both the composition and the accumulation of active principles in rhizomes, as well as the for viability of the *R. rosea* plants. Cell culture of *R. rosea* represents an alternative method and a model for investigation the influence of the level of biological organization on the plants ability to accumulate *SM* and as well as the influence of physical and chemical factors on these processes.

Application value: *in vivo* and *in vitro* investigations have shown that for obtaining the active components characteristic for *R. rosea*, it is necessary to assure *UV* illumination and thermoperiodicity that are natural for spontaneous growing *R. rosea* plants. Thus, the selection of optimal cultivation conditions of *R. rosea in vivo* and *in vitro* could ensure the preventing the species extinction due to the intensive collection of plants growing in natural conditions.

Implementation of scientific results: *R. rosea* callus culture is maintained during of 10 years in the IGFPP and continues to be used in the scientific researches of the mechanisms of regulation the biosynthesis of *SM*, and also as information used in the teaching programs of the State University „Dimitrie Cantemir”.

АННОТАЦИЯ

Кэлугэру-Спэтару Татьяна, Накопление *in vivo* и *in vitro* вторичных метаболитов в растениях вида *Rhodiola rosea* L. карпатского происхождения, диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук, Кишинев, 2019. Диссертация состоит из введения, четырех глав, общих выводов и рекомендаций, библиографии из 333 наименований, 143 страниц основного текста, 58 рисунков, 13 таблиц и 18 приложений. Полученные результаты опубликованы в 36 научных работах

Ключевые слова: *Rhodiola rosea* (родиола розовая), каллус, клеточные агрегаты, ВЭЖХ, ЯМР, вторичные метаболиты (ВМ), п-тирозол, салидрозид, розавин, флавоноиды, терпены, пероксидаза, каталаза.

Задача работы: оценка особенностей накопления активных компонентов в корневищах растений Карпатской популяции *R. rosea* (Румыния), а также растений, выращенных в условиях *in vivo*; для выявления взаимоотношений «генотип-среда-метаболические процессы» для практической разработки методов оптимального накопления вторичных метаболитов в клетках *R. rosea*, культивируемых *in vitro*.

Цели работы: определение содержания и состава ВМ и эфирных масел в корневищах растений *R. rosea*, собранных в Карпатах, Румыния, а также искусственно выращенных в Молдове; введение в культуру *in vitro* эксплантов растений *R. rosea* и определение влияния различных физических и химических факторов, отдельно и в комбинации, на образование биомассы и накопление ВМ в культуре клеток *in vitro*; сравнение химического состава корневищ растений *R. rosea* карпатской популяции и тех, которые получены путем культивирования *in vivo*.

Научная новизна, оригинальность и теоретическая значимость: впервые был определен состав ВМ и эфирных масел корневищ растений *R. rosea* собранных в Восточных Карпатах Румынии. Было показано, что кратковременное воздействие на клеточную культуру *R. rosea* выращиваемую *in vitro*, а также введение в питательную среду коричневого спирта и препарата *Reglalg*, приводит к повышению содержания ВМ, хотя состав и особенно содержание указанных соединений оставались ниже по сравнению с теми, которые характерны для корневищ спонтанных растений. Таким образом, суточный и сезонный термопериодизм, интенсивное УФ излучение, вариация относительной влажности воздуха, которые характерны для горных условий, являются решающими факторами, определяющие состав и содержание активных веществ, накопленных в корневищах *R. rosea*. Культура клеток *R. rosea* представляет собой альтернативный метод и перспективную модель для исследования влияния уровня организации на способность растений накапливать ВМ, а также влияния физических и химических факторов на их накопление.

Полученный результат, который способствует решению важной научной проблемы, заключается в выявлении того факта, что кратковременная экспозиция при низких температурах и УФ излучении, а также введение в питательную среду коричневого спирта и препарата *Reglalg* в начале экспоненциальной фазы роста клеточной культуры, приводит к стимуляции накопления биомассы *R. rosea* в условиях *in vitro* и к существенному увеличению содержания ВМ, что является важной предпосылкой для создания искусственных режимов культивирования клеток в биореакторах, специально адаптированных для получения ВМ характерных для корневищ *R. rosea*.

Практическая значимость работы: исследования *in vivo* и *in vitro* показали, что для получения активных компонентов, характерных для растений *R. rosea*, необходимо создать специфические условия освещения и температуры, подходящие для растений этого вида. Таким образом, подбор оптимальных условий культивирования *R. rosea in vivo* и *in vitro* может обеспечить устранение угрозы исчезновения вида из-за интенсивного сбора спонтанно растущих растений.

Внедрение научных результатов: культура каллуса *R. rosea* в возрасте 10 лет поддерживается до настоящего времени в ИГФЗР и применяется в исследованиях механизмов регуляции биосинтеза ВМ, а также в учебном процессе государственного университета „Дмитрий Кантемир”.

CĂLUGĂRU-SPĂTARU TATIANA

**ACUMULAREA *IN VIVO* ȘI *IN VITRO* A METABOLIȚILOR
SECUNDARI LA SPECIA *Rhodiola rosea* L.
DIN POPULAȚIA CARPATINĂ**

163.02 Biochimie

Rezumatul tezei de doctor în științe biologice

Aprobat spre tipar: 01.11.2019
Formatul hârtiei 60x84 1/16 Hârtie ofset. Tipar ofset.
Tiraj 50 ex. Coli de tipar.: 2,25 Comanda nr. 01/11
Tipar executat: Tipocart Print SRL